

7 ejes
1074



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

**PRODUCCION Y CARACTERIZACION PARCIAL DE ANTICUERPOS
CONTRA ACTINA DE MUSCULO ESQUELETICO
DE CONEJO**

T E S I S

Para optar por el título de:

B I O L O G O

Que presenta:

RUY HAROLDO GIRARD RUIZ

México, D. F.

1981





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

CONTENIDO

INTRODUCCION	pag. 1
MATERIALES Y METODOS	pag. 21
RESULTADOS	pag. 35
DISCUSION	pag. 49
BIBLIOGRAFIA	pag. 60

INTRODUCCION

El movimiento en sus varias formas es una propiedad fundamental de los seres vivos cuya existencia depende en gran medida de la rapidez y eficiencia con la cual transforman la energía química en trabajo mecánico. Para tal efecto los seres vivos han desarrollado estructuras altamente especializadas y eficientes, como es el caso del músculo esquelético de vertebrados, en donde la dramática y repentina movilización de energía durante la contracción, es tal que este efecto es observable macroscópicamente. Esto ha invitado al hombre desde tiempos remotos (1) a especular y tratar de explicar dicho fenómeno y desde entonces se han aplicado casi todas las técnicas que pudieran dar información sobre este fenómeno. Con el advenimiento de la bioquímica, varios laboratorios se dedicaron a estudiar la composición proteica del músculo, con el fin de entender y explicar el fenómeno de la contracción, demostrando que parte de la proteína podía ser extraída del músculo con soluciones concentradas de sales como el cloruro de potasio (KCl) 0.6M, y que después de agregar agua se precipitaba una sustancia a la cual se le dió el nombre de miosina (2,3). En 1939 Engelhardt y Ljubimova (4) demostraron que esta fracción poseía actividad de - - ATPasa y por otro lado se estaba acumulando evidencia de que

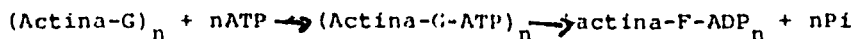
el ATP era el enlace entre las reacciones productoras de energía como la glicólisis y la respiración, con la actividad mecánica - (5). Por otro lado Straub (6) demostró la presencia de otra proteína, la actina, en esta fracción y en el residuo que quedaba - después de la extracción, y Szent Gyorgi (7) encontró que el gel formado de la mezcla de actina y miosina era capaz de contraerse en presencia de ciertas sales y ATP. La demostración de que la - contracción puede ser reproducida in vitro con soluciones relativamente simples, llevó el estudio de la contracción muscular a - los terrenos de la biología molecular. Hasta la fecha se han purificado del músculo al menos 6 proteínas que intervienen en el mecanismo de la contracción: tropomiosina, troponina, proteína-C, proteína de la línea M, y actininas α y β .

La miosina se ha identificado como parte de los filamentos gruesos del músculo esquelético de vertebrados. Por otro lado, Ebashi (6,9) ha propuesto que los filamentos delgados contienen actina, tropomiosina y el complejo de troponina en una relación molar de 7:1:1. Esto ha sido reforzado por un gran número - de experimentos bioquímicos e inmunoquímicos (8 a 12), difracción de rayos X, microscopía electrónica y difracción óptica de micrograffas electrónicas (13 a 18).

CARACTERISTICAS DE LA ACTINA

Formo Molecular y Polimerización.

La actina de músculo estriado, es una proteína globular de aproximadamente 55 Å de diámetro (13) que migra en un gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio, como una molécula de aproximadamente 42,000 daltones, tiene un punto isoeléctrico de aproximadamente 5.4 (actina-a) y constituye aproximadamente el 60% de los filamentos delgados. En la presencia de sales, polimeriza en filamentos largos que se conocen como actina-F para distinguirlos de la forma despolimerizada llamada actina-G. Cada molécula de actina se une a una molécula de ADP o ATP y a un ión divalente, usualmente Ca^{++} o Mg^{++} . En 0.1M KCl o 2mM MgCl_2 la actina-G polimeriza siendo este proceso acompañado por una hidrólisis del ATP unido (19):



La polimerización es un proceso de 2 pasos: nucleación y elongación. La nucleación ocurre sólo por arriba de una cierta concentración, denominada concentración crítica y la actina-F (polímero) estará siempre en equilibrio con actina-G (monómero) a la concentración crítica característica, la cual es la -

constante de equilibrio para la ecuación $(\text{actina})_n \rightleftharpoons (\text{actina})_{n-1} + \text{actina}$. La polimerización de cualquier actina en un determinado solvente y a cierta temperatura está descrita por la concentración crítica y por la viscosidad reducida de la actina-F, es decir la pendiente de la viscosidad específica en función de la concentración de actina (20) (Tabla 1).

Al polimerizarse la actina forma una hélice que se enrolla a la derecha con una periodicidad de 36nm. El filamento terminado tiene la apariencia de dos collares de perlas enrollados uno alrededor del otro (13,14,21).

TABLA 1. Propiedades de Actina de Músculo Esquelético de Conejo (20).

Fuente de Actina	Concentración Crítica, mg/ml								Kaap, μM^*
	<u>2mM MgCl₂</u>		<u>0.1M KCl</u>		<u>0.5M KCl</u> <u>1mM MgCl₂</u>		<u>0.5M KCl</u> <u>1mM MgCl₂</u>		
	25°C	5°C	25°C	5°C	25°C	25°C	5°C		
Músculo Esquelético de conejo.	0.03	0.03	0.03	0.1	0.02	0.15	0.94	7.1	

* Kaap es la concentración requerida de actina-F para alcanzar 1/2 de la máxima activación de la ATPase-Mg^{++} de la meromiosina pesada de músculo esquelético de conejo en 2.5mM MgCl_2 , 2mM ATP, - 2.4mM cloruro de imidazol a 24°C.

Activación de la Actividad de ATPasa-Mg⁺⁺ de la Miosina.

Otra propiedad de la actina-F de músculo de conejo es - la activación de la actividad ATPasa-Mg⁺⁺ de la miosina. La - - ATPasa-Mg⁺⁺ de la miosina activada por actina puede ser caracte_rizada por su velocidad máxima, considerada como la actividad de ATPasa por mol de miosina a concentraciones infinitas de actina y por la Kaap o sea la concentración de actina-F requerida para alcanzar 1/2 de la máxima actividad (Tabla 1). Es importante - usar como enzima cualquiera de los dos fragmentos proteolíticos de la miosina, meromiosina pesada (2 cabezas) ó subfragmento 1 (1 cabeza) los cuales a diferencia de la miosina, son solubles en las fuerzas iónicas bajas usadas para hacer los ensayos y lo mas importante es que son enzimáticamente similares a la miosina entera (20).

De especial importancia fueron las observaciones hechas por Huxley en 1963 (21), quien reportó que los filamentos de actina de músculo de conejo forman complejos característicos denominados puntas de flecha cuando se tratan con meromiosina pesada y se ven al microscopio electrónico, después de teñirlos negativamente. Esta observación dirigió durante un tiempo los esfuerzos tendientes a la localización de actina, tanto en el músculo como en células no-musculares. Mas adelante discutiremos -

con detalle las ventajas y desventajas de la técnica.

Secuencia de Aminoácidos.

La actina de músculo esquelético de conejo es una cadena sencilla y contiene 347 ó 375 residuos de aminoácidos (22) y de acuerdo con los datos de secuencia su peso molecular es de 41,785 y para la actina-G nativa es de 42,300, incluyendo al ATP y un ion Ca^{++} como grupo prostético. La actina de músculo esquelético de conejo contiene en la posición 73 un aminoácido raro, la N^t -Metilhistidina cuya significación biológica no ha sido determinada pero debe ser importante debido a su estabilidad evolutiva (20) y probablemente el grupo metilo es transferido por una enzima específica después de la síntesis in vivo de la cadena completa (23,24). De los estudios de dicroísmo circular (25), se ha observado que la actina tiene un 30% de hélice α , dato que concuerda con las 19 prolínas encontradas en los estudios de secuenciación (22).

Hasta la fecha se han secuenciado totalmente 5 actinas de músculo: 2 de músculo liso, aorta de bovino y molleja de pollo (26,27); 2 de músculo esquelético, de conejo (22) y de bovino (26); y 1 de músculo cardíaco de bovino (26), (Tabla 2).

Tabla 2

Posiciones en la secuencia de aminoácidos de 5 actinas diferentes de músculo. Las posiciones de los aminoácidos en la secuencia están hechos por analogía - con actina de músculo esquelético de conejo. Los aminoácidos subrayados son aquellos en los cuales difieren entre ellas las 5 actinas (26). Los residuos marcados con * son aquellos que difieren de la actina de músculo esquelético de conejo según los datos de Elzinga et al. (22,28,29). De la actina de músculo cardíaco humano de los 79 aminoácidos secuenciados solo es diferente la posición 357 (Thr → Ser) (20).

Número del residuo	Tipos de Actina					
	Músculo esquelético de conejo	Músculo esquelético de bovino (rápido, lento)	Músculo cardíaco bovino	Músculo cardíaco humano	Músculo liso pollo (molleja)	Músculo liso bovino (aorta)
1	Asp	<u>Asp</u>	<u>Asp</u>			Glu
2	Glu	<u>Glu</u>	<u>Asp*</u>		<u>Glu</u>	<u>Glu*</u>
3	Asp	<u>Asp</u>	<u>Glu*</u>		<u>Glu*</u>	<u>Glu*</u>
4	Glu	<u>Glu</u>	<u>Glu</u>		<u>Glu</u>	<u>Asp*</u>
5	Treo	<u>Treo</u>	<u>Treo</u>		<u>Treo</u>	<u>Ser*</u>
6	Treo	<u>Treo</u>	<u>Treo</u>		<u>Treo</u>	<u>Treo</u>
10	Cist	<u>Cist</u>	<u>Cist</u>		<u>Cist</u>	<u>Cist</u>
16	Leu	<u>Leu</u>	<u>Leu</u>		<u>Leu</u>	<u>Leu</u>
17	Val	<u>Val</u>	<u>Val</u>		<u>Cist*</u>	<u>Cist*</u>
76	Isol	<u>Isol</u>	<u>Isol</u>		<u>Isol</u>	<u>Isol</u>
89		<u>Treo</u>	<u>Treo</u>		<u>Ser</u>	<u>Ser</u>
103	Treo	<u>Treo</u>	<u>Treo</u>		<u>Treo</u>	<u>Treo</u>
129	Val	<u>Val</u>	<u>Val</u>		<u>Val</u>	<u>Val</u>
153	Leu	<u>Leu</u>	<u>Leu</u>		<u>Leu</u>	<u>Leu</u>
162	Asn	<u>Asn</u>	<u>Asn</u>		<u>Asn</u>	<u>Asn</u>
176	Met	<u>Met</u>	<u>Met</u>		<u>Met</u>	<u>Met</u>
201	Val	<u>Val</u>	<u>Val</u>		<u>Val</u>	<u>Val</u>
225	Asn	<u>Asn</u>	<u>Asn</u>		<u>Asn</u>	<u>Asn</u>
259	Treo	<u>Treo</u>	<u>Treo</u>		<u>Treo</u>	<u>Treo</u>
266	Isol	<u>Isol</u>	<u>Isol</u>		<u>Isol</u>	<u>Isol</u>
271	Ala	<u>Ala</u>	<u>Ala</u>		<u>Ala</u>	<u>Ala</u>
278	Tir	<u>Treo*</u>	<u>Treo*</u>		<u>Treo*</u>	<u>Treo*</u>
286	Isol	<u>Isol</u>	<u>Isol</u>		<u>Isol</u>	<u>Isol</u>
296	Asn	<u>Asn</u>	<u>Asn</u>		<u>Asn</u>	<u>Asn</u>
298	Met	<u>Met</u>	<u>Leu*</u>		<u>Leu*</u>	<u>Leu*</u>
357	Treo	<u>Treo</u>	<u>Ser*</u>		<u>Ser*</u>	<u>Ser*</u>
364	Ala	<u>Ala</u>	<u>Ala</u>		<u>Ser*</u>	<u>Ala</u>

De los datos de secuencia se puede observar que existen diferencias entre las actinas en lo que respecta a algunos aminoácidos (Tabla 2) aunque la secuencia como un todo está altamente conservada (20). Por ejemplo, las actinas de músculo esquelético y cardíaco de bovino y las de músculo liso de pollo y músculo liso de bovino, difieren en 1,5,6 y 8, residuos respectivamente, de la actina de músculo esquelético de conejo. En lo que respecta a la actina de músculo cardíaco humano, de los 79 aminoácidos secuenciados solo 1 es diferente. Esto lo podemos resumir de la siguiente forma (Tabla 3).

TABLA 3. Número de intercambios de aminoácidos entre 5 actinas diferentes de vertebrados superiores (26). Los datos del músculo esquelético de conejo son de Elzinga *et al* (22,28,29).

	Esquelético Bovino	Cardíaco Bovino	Liso de pollo (molleja)	Liso de Bovino (aorta)
Músculo esquelético bovino	0	4	6	8
Músculo cardíaco bovino	4	0	4	6
Músculo liso de pollo (molleja)	8	6	3	0
Músculo liso de bovino (aorta)	8	6	3	0
Músculo esquelético de (conejo)	1	5	6	8

CELULAS NO MUSCULARES

A raíz de la identificación de actina en el músculo y con el objetivo de explicarse fenómenos aparentemente contráctiles tales como el flujo citoplásmico, el movimiento ameboido, la división celular e incluso el movimiento flagelar, varios laboratorios empezaron a buscar proteínas análogas a las del músculo en células no musculares, desde protozoarios hasta vertebrados, utilizando diversos enfoques tales como la microscopía electrónica, la inmunquímica y la bioquímica. Los estudios de microscopía electrónica en células eucarióticas revelan microfilamentos (5-7nm ancho), filamentos intermedios (10nm ancho) y microtúbulos (25nm ancho). Por su habilidad específica para unir meromiosina pesada (21,30) los microfilamentos de unas 60 células se han identificado como filamentos de actina (31,32). En estos casos se ha encontrado una proteína que es capaz de activar la $ATPasa-Mg^{++}$ de la miosina, característica típica de la actina (31). La actina ha sido purificada aproximadamente de unos 15 tipos celulares y aproximadamente entre un 20 a un 30% de la proteína total de células móviles, tales como amíbas y plaquetas, y del 1 al 2% de la proteína de tejidos tales como el hígado de mamíferos es actina (20). Los primeros estudios indicaban que la actina de células no musculares era similar a su contraparte en músculo. Actualmente se sabe que existen diferen-

cias cuantitativas pero la molécula como un todo es cualitativamente similar a su homóloga en músculo.

Propiedades Físicas y Químicas

Peso Molecular y Punto Isoeléctrico.

Todas las actinas de células no musculares estudiadas - hasta la fecha, tienen la misma movilidad electroforética en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio y corresponde a un peso molecular de 42,000 (33-44). De los estudios de enfoque isoelectrico se ha visto que las células no musculares presentan dos isoformas beta y gamma (45,46,47) las cuales difieren de la mas ácida actina alfa de músculo de conejo. Recientemente en Physarum se ha identificado una sola especie la cual es ligeramente más ácida que la actina alfa de músculo de conejo (54):

Actina
de $\alpha \gg \beta > \gamma$
Physarum

Polimerización.

La actina de células no musculares polimeriza para formar filamentos helicoidales idénticos en estructura a los forma

dos por la actina de músculo (33-35, 34-41, 44), con una periodicidad de $\approx 36\text{nm}$ (41,43,48-51). Al igual que la actina de músculo de conejo, todas las actinas de células no musculares tienen unida una molécula de ADP o ATP más un ion divalente usualmente Ca^{++} o Mg^{++} (32). Polimerizan a una determinada fuerza iónica: 2mM MgCl_2 ó 1M KCl para formar filamentos. La polimerización de todas las actinas estudiadas es cualitativamente similar a la polimerización de la actina de músculo de conejo, pero existen diferencias cuantitativas. Todas las actinas no musculares parecen tener concentraciones críticas mayores que la de músculo, cuando se polimerizan en la ausencia de Mg^{++} en 0.1M y 0.5M de KCl (Tabla 4).

TABLA 4. Comparación de algunas propiedades de actinas musculares y no musculares (20).

Fuente de Actina	Concentración Crítica, mg/ml							
	<u>2mM MgCl₂</u>		<u>0.1M KCl</u>		<u>0.5M KCl/ 1mM MgCl₂</u>	<u>0.5M KCl/ 1mM CaCl₂</u>		Kaap μM^*
	25°C	5°C	25°C	5°C	25°C	25°C	5°C	
Músculo esquelético de conejo	0.03	0.03	0.03	0.1	0.02	0.15	0.94	
Plaquetas humanas	0.03	0.03	0.09	0.51	0.09	0.32	3.2	9.6
Hígado de rata	0.02	0.2	0.08	0.48				9.6
Cerebro embrión de pollo	0.02	0.02	0.07	0.5	0.01	0.22		9.6
<u>Acanthamoeba</u> <u>Castellani</u>	0.06	0.06	0.09	0.45	0.04	0.39		21.7

* Kaap es la concentración requerida de actina-F para alcanzar 1/2 de la máxima activación de la ATPasa- Mg^{++} de la mercuronina pesada de músculo esquelético de conejo en 2.5mM MgCl_2 , 2mM ATP , 2.4mM cloruro de imidazol a 24°C .

Por ejemplo, en 0.5M KCl/1mM CaCl₂ la concentración crítica de la actina de las plaquetas y la de A. castellani es mayor que la de la actina de músculo de conejo, la cual en estas condiciones es relativamente alta. Esta situación ha planteado lo siguiente: si las actinas de células no musculares se comportaran in vivo igual que lo hacen in vitro éstas estarían completamente polimerizadas a las concentraciones que se encuentran en la célula. De los estudios realizados en extractos crudos de A. castellani y plaquetas, se ha visto que la actina-G se encuentra a concentraciones mayores que la crítica, por lo que se ha postulado que esos extractos contienen sustancias que impiden la polimerización de actina (20). Recientemente se han identificado 2 proteínas que interaccionan con la actina-G e impiden que ésta polimerice: una de ellas es la DNAasa I (52) la cual forma un complejo cristalino que no tiene actividad enzimática de DNAasa y la otra es la profilina que es una proteína purificada de bazo (16,000 daltones), que forma un complejo cristalino 1:1 con la actina (53). El papel fisiológico de estas dos proteínas es desconocido pero interesante. Podrían ser puntos de control en la transición monómero \rightleftharpoons polímero indispensable para la formación de los filamentos de actina, en la distribución celular de actina y en la asociación de la misma con otros organelos como membranas y microtúbulos.

Activación de la Actividad de ATPasa-Mg⁺⁺ de la Miosina.

Todas las actinas no musculares que han sido purificadas activan la ATPasa-Mg⁺⁺ de la miosina aunque se tienen datos cuantitativos en pocos casos. Debido a la sensibilidad del ensayo a cambios en la fuerza iónica o a las diferencias en la preparación de la enzima, la velocidad máxima puede variar un poco pero en general es idéntica para todas las actinas estudiadas. Sin embargo, se requieren concentraciones mayores de actina de células no musculares que de músculo esquelético de conejo, para alcanzar a la mitad de la máxima activación o sea Kaap (Tabla 4). Esto último podemos esquematizarlo de la siguiente forma:

Actina de <u>Acanthamoeba</u>	>	Actina de células	>	Actina de músculo
21.7µM		no musculares		esquelético
		9.6µM		7.1µM

Por lo tanto se requieren 1.3 veces mas actina de células no musculares y 3 veces mas de actina de Acanthamoeba con respecto a la de músculo esquelético de conejo para alcanzar la mitad de la máxima activación de la ATPasa-Mg⁺⁺ de la miosina.

Secuencia de aminoácidos.

Al igual que la actina de músculo esquelético de conejo -

todas las actinas de células no musculares examinadas hasta la fecha tanto de vertebrados como de invertebrados, poseen en posición 73 el aminoácido raro N^t-Metilhistidina (20,31,32,54,55). Sólo en la actina de A. castellani se han detectado residuos de N^E-Metil-lisina (56).

Hasta la fecha se han secuenciado totalmente 4 actinas de células no musculares, la β y γ de células de mamíferos, la de Physarum polycephalum y la de Dictiostelium discoideum (Tabla 5). Las actinas de células no musculares de mamífero β y γ y las de P. polycephalum y D. discoideum difieren de la de músculo esquelético de conejo en 25,24,32 y 31 residuos respectivamente. Las diferencias con la actina de músculo esquelético - así como las diferencias entre ellas, las podemos resumir de la siguiente forma (Tabla 6).

Si calculamos el porcentaje de diferencia (Tabla 7) vemos que las actinas de organismos evolutivamente tan distintos como Physarum polycephalum y conejo, difieren aproximadamente en un 8% de los residuos. Ahora bien, las actinas de P. polycephalum y D. discoideum son más parecidas a las actinas citoplásmicas (4-5%) que lo que éstas últimas son a las musculares (7%).

Los datos de secuencia presentados anteriormente, nos -

Tabla 5

Posiciones en las secuencias de 4 actinas diferentes de células no musculares. Las posiciones de los aminoácidos están obtenidas por analogía con la actina de músculo de conejo. Los aminoácidos subrayados son aquéllos en los cuales difieren entre ellas las 4 actinas. Los residuos marcados con * son aquéllos que difieren de la actina de músculo de conejo. Todos los datos menos los de *D. discoideum* (55) son de (54). En el caso de *D. discoideum* comparándolo con *P. polycephalum* tiene (Leu → Met, 189) y (Gln → Asp, 313). Esas posiciones no están mostradas aquí.

Número del residuo	Tipos de Actina					
	Músculo esquelético de conejo	Actina citoplasmática de mamífero		<i>Physarum polycephalum</i>	<i>Dyctiostelium discoideum</i>	
		β	γ			
1	Asp	*	Ausente	*	<u>Glu</u>	<u>Asp</u>
2	Glu	Asp*		Glu	<u>Glu*</u>	<u>Glu*</u>
3	Asp	<u>Asp</u>		<u>Glu*</u>	<u>Glu*</u>	<u>Glu*</u>
4	Glu	<u>Asp*</u>		<u>Glu</u>	<u>Asp*</u>	<u>Asp*</u>
5	Treo		<u>Isol*</u>		<u>Val*</u>	<u>Val*</u>
6	Treo		<u>Ala*</u>		<u>Gln*</u>	<u>Gln*</u>
10	Cist	<u>Val*</u>		<u>Ile*</u>	<u>Ile*</u>	<u>Ile*</u>
16	Leu		<u>Met*</u>		<u>Met*</u>	<u>Met*</u>
17	Val		<u>Cist*</u>		<u>Cist*</u>	<u>Cist*</u>
41	Gln		<u>Gln</u>		<u>Treo*</u>	<u>Treo*</u>
76	Ile		<u>Val*</u>		<u>Val*</u>	<u>Val*</u>
103	Treo		<u>Val*</u>		<u>Val*</u>	<u>Val*</u>
129	Val		<u>Treo*</u>		<u>Treo*</u>	<u>Treo*</u>
153	Leu		<u>Met*</u>		<u>Met*</u>	<u>Met*</u>
160	Treo		<u>Treo</u>		<u>Ser*</u>	<u>Ser*</u>
162	Asn		<u>Treo*</u>		<u>Treo*</u>	<u>Treo*</u>
176	Met		<u>Leu*</u>		<u>Leu*</u>	<u>Leu*</u>
201	Val		<u>Treo*</u>		<u>Treo*</u>	<u>Treo*</u>
217	Cist		<u>Cist</u>		<u>Ala*</u>	<u>Ala*</u>
225	Asn		<u>Gln*</u>		<u>Gln*</u>	<u>Gln*</u>
228	Ala		<u>Ala</u>		<u>Gln*</u>	<u>Ala</u>
234a	Ser		<u>Ser</u>		<u>Ala*</u>	<u>Ala*</u>
259	Treo		<u>Ala*</u>		<u>Ala*</u>	<u>Ala*</u>
266	Ile		<u>Leu*</u>		<u>Leu*</u>	<u>Leu*</u>
271	Ala		<u>Cist*</u>		<u>Ala</u>	<u>Ala</u>
278	Tyr		<u>Phe*</u>		<u>Tyr</u>	<u>Tyr</u>
286	Ile		<u>Val*</u>		<u>Val*</u>	<u>Val*</u>
294	Ala		<u>Ala</u>		<u>Gly*</u>	<u>Gly*</u>
296	Asn		<u>Treo*</u>		<u>Val*</u>	<u>Val*</u>
298	Met		<u>Leu*</u>		<u>Leu*</u>	<u>Leu*</u>
305	Tir		<u>Tir</u>		<u>Phe*</u>	<u>Phe*</u>
316	Ile		<u>Ile</u>		<u>Leu*</u>	<u>Leu*</u>
357	Treo		<u>Ser*</u>		<u>Ser*</u>	<u>Ser*</u>
359	Gln		<u>Gln</u>		<u>Glu*</u>	<u>Glu*</u>
364	Ala		<u>Ser*</u>		<u>Ser*</u>	<u>Ser*</u>

Tabla 6

Número de intercambios de aminoácidos entre 5 actinas diferentes, 4 de células no musculares y 1 de músculo esquelético de conejo. Datos tomados de -- (54,55).

	Músculo esquelético de conejo	β	γ	<u>Physarum</u> <u>polycephalum</u>	<u>Dyctiostelium</u> <u>discoideum</u>
Músculo esquelético de conejo	0	25	24	32	31
β	25	0	3	18	17-19
γ	24	3	0	17	15-17
<u>Physarum</u> <u>polycephalum</u>	32	18	17	0	4
<u>Dyctiostelium</u> <u>discoideum</u>	31	17-19	15-17	4	0

Tabla 7

Porcentajes de diferencia de los intercambios de residuos de 5 actinas diferentes 4 no musculares y 1 de músculo esquelético de conejo.

	Músculo esquelético de conejo	β	γ	<u>Physarum</u> <u>polycephalum</u>	<u>Dyctiostelium</u> <u>discoideum</u>
Músculo esquelético de conejo	0	6.6	6.5	8.5	8.2
β	6.6	0	.8	4.8	4.5-5
γ	6.4	.8	0	4.5	3.7-4.5
<u>Physarum</u> <u>polycephalum</u>	8.5	4.8	4.5	0	1
<u>Dyctiostelium</u> <u>discoideum</u>	8.2	4.5-5	3.7-4.5	1	0

indican una conservación estricta de la estructura de la actina durante la evolución. Esto también es ilustrado por la ausencia de deleciones o adiciones a la cadena polipeptídica a partir - del residuo 2. Además de la conservación en estructura primaria, en todas las actinas tanto musculares como no musculares, la distribución y número de residuos de prolina (19 residuos) permanece constante y las substituciones de aminoácidos con cadenas laterales cargadas son raras indicando una alta conservación en - la topografía superficial de la molécula de actina.

De los datos presentados anteriormente se nota que existe un alto grado de conservación estructural-funcional de la molécula de actina durante la evolución de las células eucarióticas.

Topografía del Citoesqueleto de Actina en Células no - Musculares.

Arriba mencionábamos que el uso de meromiosina pesada - jugó un papel importante en la localización de actina en células no musculares (30). El uso de meromiosina pesada permite la localización de actina filamentosa (actina-F) en el plano del - corte pero no revela la relación espacial de la actina con otros organelos o la distribución de las pozas de actina globular (ac-

tina-G) (57). La meromiosina pesada no ha sido efectiva en otros casos debido a su incapacidad para unirse a la actina-F organizada en forma de paracrystal o cuando está asociada a otras proteínas (58). Además de que existe la posibilidad de que en algunos casos la adición de meromiosina pesada, puede inducir a la actina-G, distribuida al azar, a que se organice en filamentos (59, 60). Estos problemas han sido resueltos por el empleo de la microscopía de fluorescencia indirecta, usando anticuerpos altamente específicos contra actina. Debido a la naturaleza ubicua y conservada de la molécula de actina y a las dificultades encontradas para purificarla, los intentos dirigidos para obtener un anticuerpo contra esta proteína no han sido siempre positivos.

Los enfoques experimentales usados para la producción de anticuerpos contra actina, han variado según los investigadores en lo que respecta a la fuente del antígeno, al animal usado para la producción, al estado de la molécula, a la ruta y frecuencia de las inmunizaciones, a la cantidad de antígeno inyectado, así como en los métodos y organismos usados para la caracterización del mismo. En la Tabla 8 se resumen algunas de estas variaciones. En otras palabras, no hay un método de uso general que garantice la obtención de anticuerpos y frecuentemente cuando se llegan a producir, los títulos son bajos. Así, Trenchev y Holborow (79) no logran producir anticuerpos utilizando el método descrito por La-

zarides y Weber (61). Lo que es claro, es que la molécula debe de estar alterada de alguna forma pues en su estado nativo no es inmunogénica (Tabla #).

Del uso de estos anticuerpos en inmunofluorescencia se ha observado lo siguiente: los microfilamentos se encuentran distribuidos inmediatamente debajo de la membrana plasmática y en áreas pseudopodiales, extendiéndose en microproyecciones tales como filopodios y microvellosidades. En células en cultivo los microfilamentos presentan dos patrones generales: dispersos a través del citoplasma en el espacio perinuclear y asociados con las áreas de plegamiento de la superficie celular de células móviles, y como paquetes altamente organizados de filamentos, conocidos como fibras de tensión, generalmente submembranosas, formando lo que se conoce como citoesqueleto de actina.

El objetivo del presente trabajo es la producción de anticuerpos contra actina de músculo esquelético de conejo, que puedan ser usados posteriormente para la localización de actina a nivel celular, utilizando técnicas inmunofluorescentes e inmunocitoquímicas.

Tabla 8

Enfoques experimentales usados en la producción, detección y caracterización de anticuerpos contra actina

Fuente del inmunógeno	Producido en	Estado	Detección y reactividad cruzada						Ref.
			DID	IEF	RIE	CNM	ME	ML	
1. Músculo liso									
a) Utero humano	Conejo	Desnaturalizada a 4°C	+ ^{1,2} ₆	NP	NP	+ ¹ ₅	+ ^{1,4} ₄	+ ^{1,4} _{NP}	79
b) Molleja de pollo	Conejo	Nativa adsorbida con alumbre Desnaturalizada con SDS y adsorbida con alumbre Desnaturalizada con SDS	+ ^{5,6}	+ ^{5,6}	NP	+ ^{4,1,5}	NP	+ ⁷	62,64
c) Molleja de pollo	Conejo	Desnaturalizada con SDS	+ ⁸	NP	NP	+ ⁵	NP	NP	66
2. Músculo Esquelético									
a) Bovino	Conejo	Desnaturalizada con SDS	NP	NP	+ ⁵	NP	NP	NP	80
b) Ratón	Conejo	Inmovilizada en Bliacrilamida SDS	- ⁷ _{2,9}	NP	NP	+ ⁵ _{5,10}	+ ⁴ _{2,9}	+ ⁴ _{NP}	62
c) Cerdo	Conejo	Desnaturalizada a 80°C	+ ²	NP	NP	NP	+ ⁴	NP	57
d) Camarón	Conejo	Desnaturalizada con SDS	NP	NP	NP	+ ⁵	NP	NP	81
e) Conejo	Borrego	Oxidada y Carboximetilada	NP	NP	NP	+ ²	NP	NP	76
f) Conejo	Conejo	Desnaturalizada con SDS y tratada con glutaraldehido	NP	NP	+ ²	+ ^{1,5}	NP	NP	83
g) Conejo	Conejo	Desnaturalizada con SDS	+ ¹¹	NP	+ ^{8,11} _{2,6}	+ ¹	- ¹	NP	77
3. Músculo Oblicuamente Estriado									
a) Molusco	Conejo	Desnaturalizada con SDS	NP	NP	NP	+ ⁵ _{5,12}	NP	NP	52
4. Citoplasmática									
a) Timo de ternera	Conejo	Desnaturalizada con SDS	+ ^{5,6}	NP	NP	+ ⁵ _{5,12}	NP	NP	61
b) JTB de ratón	Conejo	Desnaturalizada con SDS							

DID, doble inmunodifusión; IEF, inmunoelectroforesis; RIE radioinmunoensayo; CNM, células no musculares, ME, músculo -- esquelético; ML, músculo liso. En el caso de CNM, ME y ML se caracterizaron por inmunofluorescencia, inmunocitoquímica e inmunohistoquímica. NP, no probado. 1, humano; 2, conejo; 3, Drosophila; 4, rata; 5, ratón; 6, pollo; 7, cerdo; 8, - bovino; 9, camarón; 10, orizo; 11, molusco; 12, hámster.

MATERIALES Y METODOS

PURIFICACION DE ACTINA

La actina se purificó de músculo esquelético de conejo - por 3 ciclos de polimerización-despolimerización (11), a partir de un residuo acetónico preparado esencialmente de acuerdo a Feuer et al (85) con las modificaciones sugeridas por Strazelecka-Golaszewska et al (86). Brevemente, el residuo se extrajo durante 30 minutos a 0°C con 20 volúmenes de amortiguador A (2mM Tris Cl, 0.2mM ATP, 0.5mM β -Mercaptoetanol, 0.2mM CaCl₂ pH 8 a 25°C). El extracto se filtró y el residuo se lavó con 10 volúmenes de - amortiguador A. Los filtrados se juntan y se centrifugan a 10,000g durante 30 minutos. La actina-G se polimerizó a temperatura ambiente durante 2 horas, llevando el sobrenadante a 50mM de KCl y - 2mM MgCl₂. Se le agregó KCl hasta 0.6M, y se agitó lentamente a - temperatura ambiente durante 1.5 horas. Este paso es importante, pues bajo estas condiciones iónicas, la actina se separa de la - tropomiosina, siendo esta última uno de los principales contaminantes de las preparaciones de actina. El extracto se centrifugó - a 80,000g y el precipitado (actina-F) se resuspendió en 3 volúmenes de amortiguador A dializándose contra el mismo amortiguador - durante 3 días, cambiando el dializado cada 24 horas. Esto se repite 2 veces más y la actina-G se almacenó a -20°C en amortiguador

A a una concentración de 6 mg/ml. Debido a que la actina obtenida después de 3 ciclos de polimerización-despolimerización, presentó contaminantes de diferente peso molecular, se purificó en un gel de poliacrilamida-SDS. Este tratamiento además de separar los contaminantes, desnaturaliza la molécula haciéndola antigénica.

PREPARACION DEL ANTIGENO

Para su uso como antígeno se siguieron dos esquemas de purificación y desnaturalización: en un caso después del 3er ciclo de polimerización-despolimerización se tomó entre 0.5 y 1 mg de la preparación de actina-G, se le agregó amortiguador de solubilización y se hirvió durante 2 minutos. La muestra se aplicó en un gel preparativo (1.5mm) de poliacrilamida-SDS al 11% y se corrió a 15mA durante 6-7 horas. El gel se tiñó y se destiñó. La banda correspondiente a la actina se cortó con una navaja, se homogenizó en amortiguador de fosfatos pH 7.2, se emulsificó 1:1 con adyuvante completo de Freund (Difco) y así se usó como antígeno. En el otro caso después de cortar la banda de actina, la proteína se eluyó electroforéticamente dentro de una membrana de diálisis (Thomas, Co. # Catálogo 3787-D10) de acuerdo a la técnica de Anderson (87) con algunas modificaciones. Las columnas de elución (Fig. 1), se prepararon a partir de pipetas de vidrio de

5 ml a los cuales se les cortó aproximadamente 0.5 cm de la punta, con el objeto de que el diámetro interno en esa zona sea mayor y así facilitar el flujo de corriente. Se colocó un colchón de lana de vidrio en la punta de la pipeta, para retener los fragmentos de acrilamida. Por otro lado se amarró con hilo de nylon - un pedazo de membrana de diálisis de 5 cm de largo y 1/4 de pulgada de diámetro en uno de sus extremos, se llenó con el amortiguador de elución (.0198M Tris, .153M glicina, .80% SDS) y se insertó la punta de la pipeta, con 1 ó 2 ml de amortiguador, dentro de la membrana de diálisis, teniendo cuidado de que quede bien asegurada y que no queden burbujas de aire.

Las pipetas con la membrana de diálisis se montaron en una cámara de electroforésis en disco (Bio-Rad # Catálogo 165-0130) cuyo reservorio inferior se llenó con el amortiguador de elución. La banda de actina se cortó en pequeños trozos y se equilibró durante 30 minutos con el amortiguador de elución, aplicándose a la columna con una jeringa de 5 ml sin aguja, y empacándola con una varilla de vidrio. El reservorio superior se llenó con amortiguador de elución. El ánodo se conectó al reservorio inferior y el cátodo al superior. La proteína se eluyó a 1.5mA por pipeta durante 18-20 horas. La proteína eluida se llevó a 1% SDS y 1% de β -Mercaptoetanol y se hirvió 2 minutos. Se emulsificó 1:1 con adyuvante completo de Freund y de esta forma se usó como anti

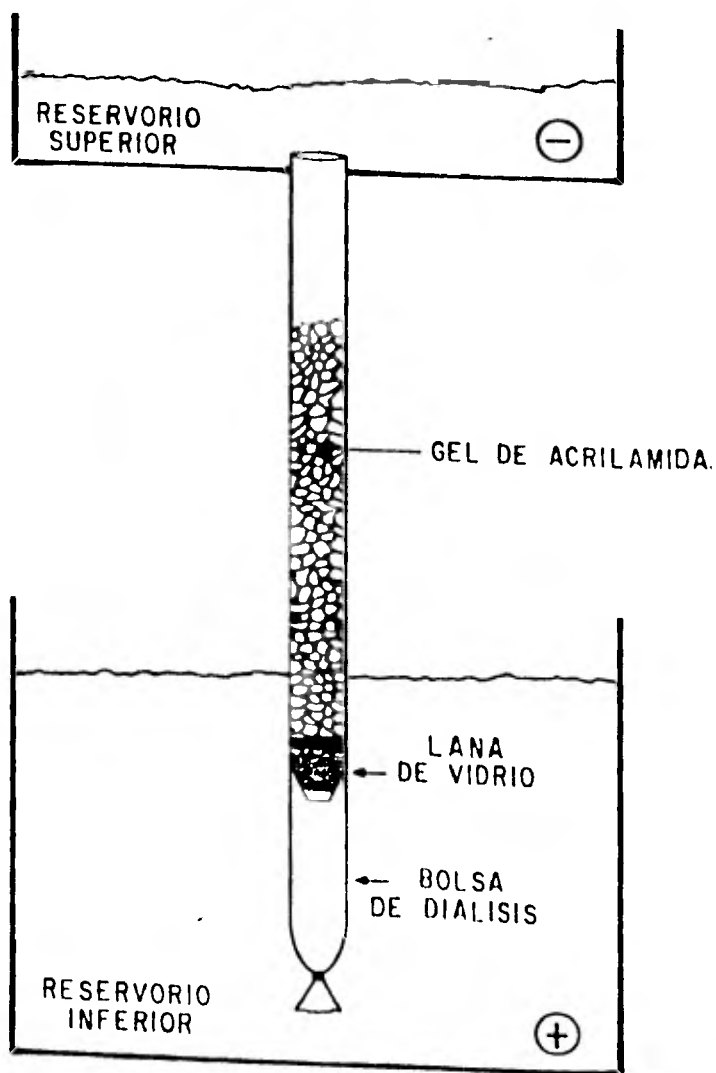


Fig. 1. Sistema para la elución de actina de músculo esquelético de conejo a partir de una banda cortada de un gel preparativo de poliacrilamida-SDS.

geno.

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON DODECILSULFATO DE SODIO

El análisis de polipéptidos se realizó en geles en placa de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio (SDS) al 11% el gel separador y 4% el concentrador de acuerdo a Laemmli (84). Las muestras se solubilizaron en 0.05M Tris pH 6.8, 0.002M EDTA, 1% SDS, 1% β -Mercaptoetanol, 10% Glicerol, calentándolas a ebullición durante 2 minutos. Los geles se tiñen con 0.05% de azul brillante de Coomassie R250 en 10% de ácido acético y 10% de metanol y se destiñen con 10% de ácido acético y 10% de metanol.

INMUNIZACION Y OBTENCION DEL SUERO.

Durante este trabajo se utilizaron un total de 5 conejos de la raza Nueva Zelanda con un peso de entre 2.5 y 3.5 Kgr. Las primeras 4 inmunizaciones se hicieron con el antígeno insolubilizado en acrilamida y las siguientes con el antígeno eluido electroforéticamente. La ruta de inmunización fue variable, así el día 1 se repartió el antígeno en los cojinetes plantares e intradérmicamente en el dorso; el día 8 se repartió intradérmicamente en el dorso; el día 136, 155, 176, 311 y 351 se repartió intramuscularmente en las patas traseras. Los animales se sangraron -

generalmente 8 días después de cada inmunización ya sea por punción cardíaca o de la vena marginal de la oreja. Para separar el suero, la sangre se incubó 1 hora a 37°C y 24 horas a 4°C. El coágulo se separó del suero con un aplicador de madera, se decantó el suero y se centrifugó a 10,000g durante 15-30 minutos. Se guardó a -20°C en alícuotas de 500 μ l.

PURIFICACION DE LOS ANTICUERPOS ANTIACTINA.

En algunos casos los anticuerpos en el suero se separaron por 3 precipitaciones secuenciales de las gamma-globulinas (IgG) con sulfato de amonio a una concentración final de 1/3 de saturación (88). La fracción de gamma-globulinas se dializó contra amortiguador de fosfatos pH 7.2 para eliminar el exceso de sulfato de amonio y se almacenó a -20°C en alícuotas de 500 μ l. Las IgG fueron obtenidas por cromatografía en columna, de DEAE celulosa, de la fracción de sulfato de amonio. La columna se equilibró y se eluyó con 0.01M de fosfato de sodio pH 8.0. Las fracciones correspondientes a IgG se almacenaron a -20°C en alícuotas de 100 μ l. Los anticuerpos monoespecíficos contra actina se purificaron por afinidad de acuerdo a la técnica de Sundovist et al (89) con algunas modificaciones. Se tomó 1 ml de actina-G (6 mg/ml) de músculo esquelético de conejo después de 3 ciclos de polimerización-despolimerización y se indujo a polimerizar a temperatura ambiente por

la adición de KCl a 50mM y $MgCl_2$ a 2mM. A la solución de actina polimerizada (actina-F) se le agregaron 4 ml de suero inactivado a 56°C durante 30 minutos (90,91,92,93) y diluido 1:4 con fosfatos pH 7.2, 50mM KCl y 2mM $MgCl_2$, y se incubó durante 18 horas a 4°C, se centrifugó a 140,000g (Rotor 50.1 Beckman), para sedimentar los complejos de actina-F + antiactina. El precipitado se volvió a incubar con 4 ml de suero diluido 1:4 durante 21 horas a 4°C. Se sedimentó a 140,000g y el precipitado se lavó por centrifugación con fosfatos pH 7.2, 50mM KCl y 2mM $MgCl_2$ hasta que la absorbencia del sobrenadante fue menor de 0.01. El precipitado se incubó con 0.1M glicina pH 3, 50mM KCl y 2mM $MgCl_2$ durante 1 hora a 37°C. Se depositó sobre un gradiente descontinuo de sacarosa 2M y 1M en 0.1M de glicina pH 3, 50mM KCl y 2mM $MgCl_2$, y se centrifugó a 140,000g durante 30 minutos. La actina-F se queda en la interfase 2M-1M y los anticuerpos se recuperaron en la fase superior. Se neutralizó el pH con NaOH, se dializaron contra amortiguador de pH 7.2 y se guardaron a -20°C en alícuotas de 100 μ l a una concentración de 240 μ g/ml.

INMUNODIFUSION E INMUNOELECTROFORESIS.

La presencia de anticuerpos precipitantes se monitoreó por doble inmunodifusión en geles de agarosa al 1% en 2mM Tris-Cl, 0.5mM β -Mercaptoetanol, 0.2mM M $CaCl_2$, 0.1% mertiolate a un -

pH de 8, para evitar la polimerización de la actina (94). Después de 24 a 48 horas de difusión a temperatura ambiente las placas se lavaron durante 3 días a 4°C con amortiguador de fosfatos pH 7.2 con cambios cada 24 horas. Se secaron a temperatura ambiente por evaporación colocándoles una tira de papel filtro humedecido con agua destilada. Después del secado se tiñeron durante 1 hora con 1% de Negro Amido en 10% de ácido acético y se destiñeron con ácido acético al 10%. La presencia de anticuerpos contaminantes se monitoreó por inmunoelectroforé^sis en gel de agarosa al 1% en 0.05M de barbital de sodio a un pH entre 8.6 y 9. El antígeno se corrió a 2mA por placa durante 2 horas. Después de la electroforé^sis se colocaron los anticuerpos y se dejaron difundir durante 24-48 horas a temperatura ambiente. El lavado, secado y tinción de las placas fué igual que en doble inmunodifusión.

CULTIVOS CELULARES

La línea celular VC-6 de fibroblastos humanos usada en este trabajo, se obtuvo a partir de prepucios humanos y fue donada generosamente por Fernando Montiel del Laboratorio de Antonio Velázquez del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M. Las células se mantuvieron en cajas T 75 (Lux Sci Co.) en solución MEM suplementada con 10% de suero bovino fetal (Gibco), 0.011% de piruvato de sodio, 0.005% de ácido ascórbico, 1% de antibiótico -

(10×10^6 U.I. de penicilina G-sódica, 12 gr de sulfato de estreptomicina, 250 mg de tetraciclina por cada 1,000 ml de agua - destilada) a 37°C en una atmósfera con 5 a 7% de CO_2 .

La línea celular de fibroblastos de ratón suizo 3T3 se obtuvo de Waldí Kuri del CINVESTAV del I.P.N., como monocapa en cubreobjetos. Las células se mantuvieron y subcultivaron en MEM modificado por Vogt-Dulbecco suplementado con 10% de suero de Bovino (Gibco).

INMUNOFLUORESCENCIA E INMUNOCITOQUIMICA.

Para los estudios de inmunofluorescencia e inmunocitoquímica las células de un cultivo en fase exponencial de crecimiento, se lavaron con 0.304% Tris, 0.04% KCl, 0.8% NaCl 0.02% EDTA pH 7.7 a 25°C y se incubaron con 0.25% de tripsina (Difco) a 37°C , hasta que las células se despegaron. La suspensión se diluyó con MEM suplementado y se inocularon 0.5 ml de la misma en cajas de Petri - estériles (Vela Plastic S.A.) con 3 ml de medio y 2 cubreobjetos de 18 x 18 mm esterilizados flameándolos con etanol. Los cultivos se incubaron entre 24 y 72 horas a 37°C en una atmósfera con 5 a 7% de CO_2 .

Las células se procesaron de dos formas para visualizar -

los microfilamentos de actina y de acuerdo al tratamiento se les denominó células completas y citoesqueletos:

Preparación de células completas (5).

- a) Lavar los cubreobjetos con amortiguador de fosfatos pH 7.2.
- b) Fijar con 3.5% formaldehído en amortiguador de fosfatos pH 7.2, 2mM KCl durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- c) Lavar con amortiguador fosfatos pH 7.2.
- d) Tratar con metanol a -20°C durante 4 minutos.
- e) Tratar con acetona a -20°C durante 2 minutos.
- f) Lavar con amortiguador de fosfatos pH 7.2.
- g) Usar directamente o guardar a -20°C .

Preparación de citoesqueletos (6).

- a) Lavar los cubreobjetos con TGMC (25mM Tris-Cl, 5mM Glucosa, 0.5mM MgCl_2 , 137mM NaCl, 5mM KCl, 0.025mM CaCl_2 , pH 7.4).
- b) Lavar con 0.5% de Tritón X-100 en TGMC durante 5-10 minutos a temperatura ambiente.
- c) Lavar con TGMC.
- d) Tratar con metanol a -20°C durante 10 minutos.
- e) Fijar en 3.5% formaldehído o 1% glutaraldehído en amortiguador de fosfatos pH 7.2 durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- f) En el caso de fijación con glutaraldehído los cubreobjetos se tratan durante 15 minutos a temperatura ambiente con NaBH_4 -

0.5 mg/ml en amortiguador de fosfatos pH 7.2 para reducir al dehídos libres (97).

- g) Lavar con amortiguador de fosfatos pH 7.2.
- h) Usar directamente o guardar a -20°C .

Inmunofluorescencia.

Las incubaciones con el anticuerpo antiactina se realizaron - de la siguiente manera:

- a) Colocar en un portaobjetos 25 μl de antiactina, como suero total inactivado a 56°C , o como IgG o anticuerpos purificados - por afinidad.
- b) Tomar un cubreobjeto con células previamente fijadas e invertirlo sobre la gota de anticuerpo, tomando precauciones para que no queden burbujas de aire. Incubar entre 30 y 45 minutos a temperatura ambiente.
- c) Se desprende por capilaridad agregando amortiguador de fosfatos pH 7.2, se invierte y se lava con amortiguador de fosfatos pH 7.2 en una caja de Petri 3 veces, cada una durante 10 minutos.
- d) Colocar en un portaobjetos 25 μl de antigammaglobulina contra conejo obtenido en chivo y acoplado a fluoresceína (Hoesch) a una dilución 1/10 e invertir el cubreobjetos sobre la gota. In cubar entre 30 y 45 minutos a temperatura ambiente.

e) Lavar igual que en c).

f) Montar en amortiguador de fosfatos pH 8: glicerol (1:9).

Las preparaciones se observaron y fotografiaron en un microscopio Zeiss, equipado con óptica para epifluorescencia y los filtros adecuados para isotiocianato de fluoresceína. Se fotografieron con película Kodak Ektachrome (ASA 400, DIN 27). El tiempo de exposición fue de 30 segundos. El rollo se procesó comercialmente.

Inmunocitoquímica.

Las reacciones inmunocitoquímicas se efectuaron en cito-esqueletos usando complejos solubles de peroxidasa-antiperoxidasa (PAP), esencialmente como fue descrito por Sternberger et al (98). Las incubaciones con anticuerpos y los lavados se hicieron exactamente igual que en inmunofluorencencia. Brevemente, las células fijadas se incubaron con antiactina entre 30 y 45 minutos, se lavaron con amortiguador de fosfatos pH 7.2 y se incubaron - con antigammaglobulina de conejo obtenido en chivo; se lavaron - con amortiguador de fosfatos pH 7.2 y se incubaron con PAP (Dako) diluida 1/100. La actividad de peroxidasa se reveló incubando los cubreobjetos con una solución al 0.06% de diaminobencidina (Sigma) y 0.03% de H₂O₂ de acuerdo a Graham y Karnovsky (99). Las prepara-

ciones se lavaron con H₂O destilada y se montaron con resina sin tética al 60% en Xilol (Sigma) previa deshidratación en alcoholes. Las preparaciones se observaron en un microscopio Zeiss con campo claro y se fotografiaron con película Kodak Ektachrome - (ASA 400, DIN 27). Los tiempos de exposición fueron dados automáticamente por el microscopio. El rollo se procesó comercialmente. Los controles usados en los experimentos de inmunofluorescencia e inmunocitoquímica fueron los siguientes: 1) Incubar las células con una concentración similar de suero o IgG obtenidos antes de - empezar las inmunizaciones; 2) incubar las células sólo con el an ticuerpo fluorescente a la dilución usada ó en el caso de la inmu nocitoquímica incubar sólo con el anti conejo (chivo) y PAP o sólo con PAP; 3) absorber el antiactina con el antígeno antes de la incubación.

Análisis en gel de poliacrilamida-SDS de las proteínas pre -
sentes en el citoesqueleto de fibroblastos.

Las células se crecieron a confluencia en una caja T75 y se lavaron con TGMC. Se lisaron con 0.5% Tritón X-100 en TGMC durante 5 a 10 minutos y se lavaron con la misma solución. A la caja se le agregó 1 ml del amortiguador de solubilización (electroforéisis) y los citoesqueletos se desprendieron raspando el fondo de la caja con un "gendarme". La suspensión se solubilizó calen-

tándola a ebullición durante 2 min. Se usó directamente o se al macenó a -20°C hasta su uso.

Otros métodos

La determinación de proteínas se realizó colorimétrica-mente usando azul de Coomassie de acuerdo al método de Bradford (100) utilizando el ensayo de proteínas obtenido comercialmente de Bio rad, con gammaglobulina de bovino como estandar.

RESULTADOS

Purificación de Actina

En la Figura 2 se muestra actina de músculo esquelético - de conejo, purificada por 3 ciclos de polimerización-despolimerización (11) a partir de un extracto de músculo esquelético de conejo (86). Como se observa en la Figura 2D,F,H y J, la banda más prominente comigra con actina de músculo esquelético de conejo obtenida comercialmente, pero además hay otras bandas fundamentalmente de peso molecular elevado que persisten en estas preparaciones.

Preparación del Antígeno

La actina de músculo esquelético de conejo después de 3 - ciclos de polimerización-despolimerización (Fig. 2) se corre en - un gel preparativo de poliacrilamida-SDS (Fig. 3) y la banda corespondiente a la actina se cortó con una navaja después de teñir el gel con Coomassie. La banda se homogenizó, se emulsificó y se inyectó a los conejos. Debido a que la acrilamida es un irritante severo que produce inflamación y necrosis en los sitios de inyección, se decidió electroeluir la proteína después de haberla - purificado a través de un gel de poliacrilamida-SDS. La proteína -

electroeluida en bolsas de diálisis se llevó a 1% de SDS y 1% de β -Mercaptoetanol, se hirvió, se emulsificó y se inyectó a los conejos. La Figura 4 es un ejemplo de actina electroeluida y vuelta a correr en un gel preparativo. En la Figura 5 se muestra actina electroeluida (C), comparándola con actina después de 3 ciclos de polimerización-despolimerización (B) y con el extracto a partir del cual se purifica la actina (A). Es evidente la pureza del antígeno usado para la producción de anticuerpos.

Doble Inmunodifusión e Inmunolectroforésis

La presencia, homogeneidad y especificidad de los anticuerpos antiactina se monitoreó por doble inmunodifusión e inmunolectroforésis. En la Figura 6A se muestra unaplaque de doble inmunodifusión en el centro de la cual se pone a difundir el suero contra concentraciones decrecientes de actina de músculo esquelético de conejo alrededor. Como es evidente, sólo se observa una banda de precipitación indicándonos la presencia de una población de anticuerpos dirigidos únicamente contra una molécula. Los anticuerpos precipitantes aparecieron aproximadamente a los 4 1/2 meses después de la primera inyección del antígeno. Los sueros de cada animal se manejaron por separado y en esencia todos dan la misma respuesta. Por otro lado, también se forma banda de precipitación contra actina de músculo esquelético de pollo -



Fig. 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de un extracto de músculo esquelético de conejo y de actina - purificada de ese extracto por 3 ciclos de polimerización-depolimerización A,C,E,G,I 13 μ gr de actina de músculo esquelético de conejo obtenida comercialmente. B, 160 μ gr extracto de músculo esquelético de conejo; D,F,H,J 40,80,160 y 200 μ gr respectivamente de actina de músculo de conejo después de 3 ciclos de polimerización-depolimerización. La banda de actina se señala con una flecha.

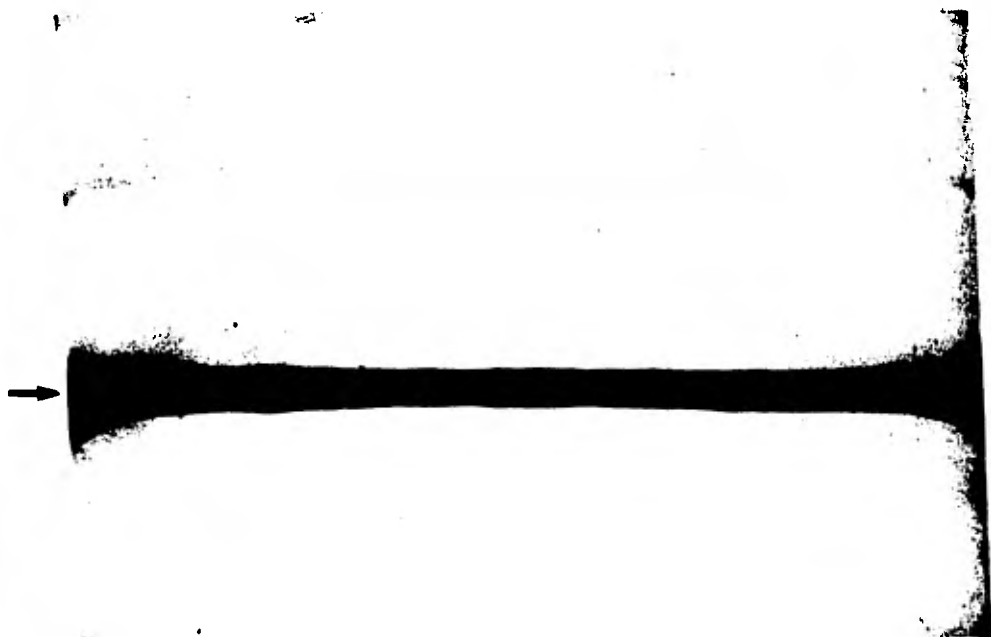


Fig. 3. Gel preparativo de poliacrilamida-SDS de actina de músculo esquelético de conejo después de 3 ciclos de polimerización-despolimerización. Se corrieron 480 μ g en un gel al 11%. La banda correspondiente a actina (flecha) se removió del resto del gel y se usó como antígeno.



Fig. 4. Gel preparativo de poliacrilamida-SDS de actina de músculo esquelético de conejo después de 3 ciclos de polimerización-despolimerización previamente separada y -eluida. Se corren 90 μ g en un gel al 11%. La banda de actina (flecha) se removió del gel, se eluyó y se usó como antígeno.

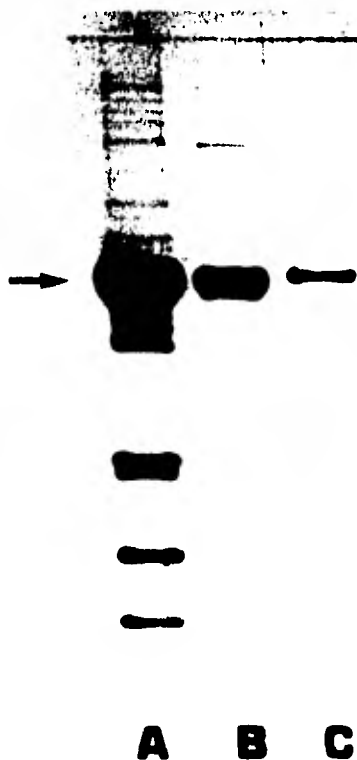


Fig. 5. Gel de poliacrilamida-SDS mostrando varios pasos de purificación del antígeno. A, extracto de músculo esquelético de conejo; B, actina de músculo esquelético de conejo después de 3 ciclos de polimerización-despolimerización; C, actina de músculo esquelético de conejo separada por electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio y posteriormente electroeluida. La banda de actina se señala con una flecha.

(datos no mostrados en este trabajo). Debido a que en la inmuno electroforé sis se separan mezclas antigénicas en función de la carga de cada uno de los componentes, esto nos permitiría detec tar sistemas antígeno-anticuerpo que no se resuelven en doble - inmunodifusión.

En la Figura 6B se muestra una placa de inmuno electrofo résis en donde vemos una sola banda de precipitación con 40 μ g (6B,1) y 120 μ g (6B,2) del antígeno, aunque en este último caso la banda se encuentra a todo lo largo del gel desde el origen.

Purificación de los Anticuerpos Antiactina

En algunos casos se separó del suero la fracción de ga mma globulinas precipitándolas con sulfato de amonio a 1/3 de sa turación y se separó la IgG por cro matografía de intercambio iónico en DEAE celulosa. La Figura 7 es un ejemplo de una precipi tación con sulfato de amonio y purificación de IgG por DEAE celu losa y el análisis en gel de poliacrilamida-SDS. Para los experi mentos de inmuno citoquímica se usó la fracción 4 de la columna. Es evidente la pureza de esta fracción. Sólo se aprecian las ca denas pesadas y ligeras de la IgG. Con el fin de obtener exclusi vamente la población de anticuerpos contra actina, y disminuir - al máximo posible el pegado inespecífico de proteínas en los es-

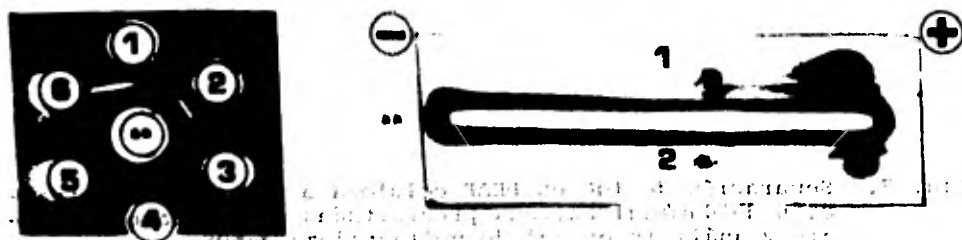
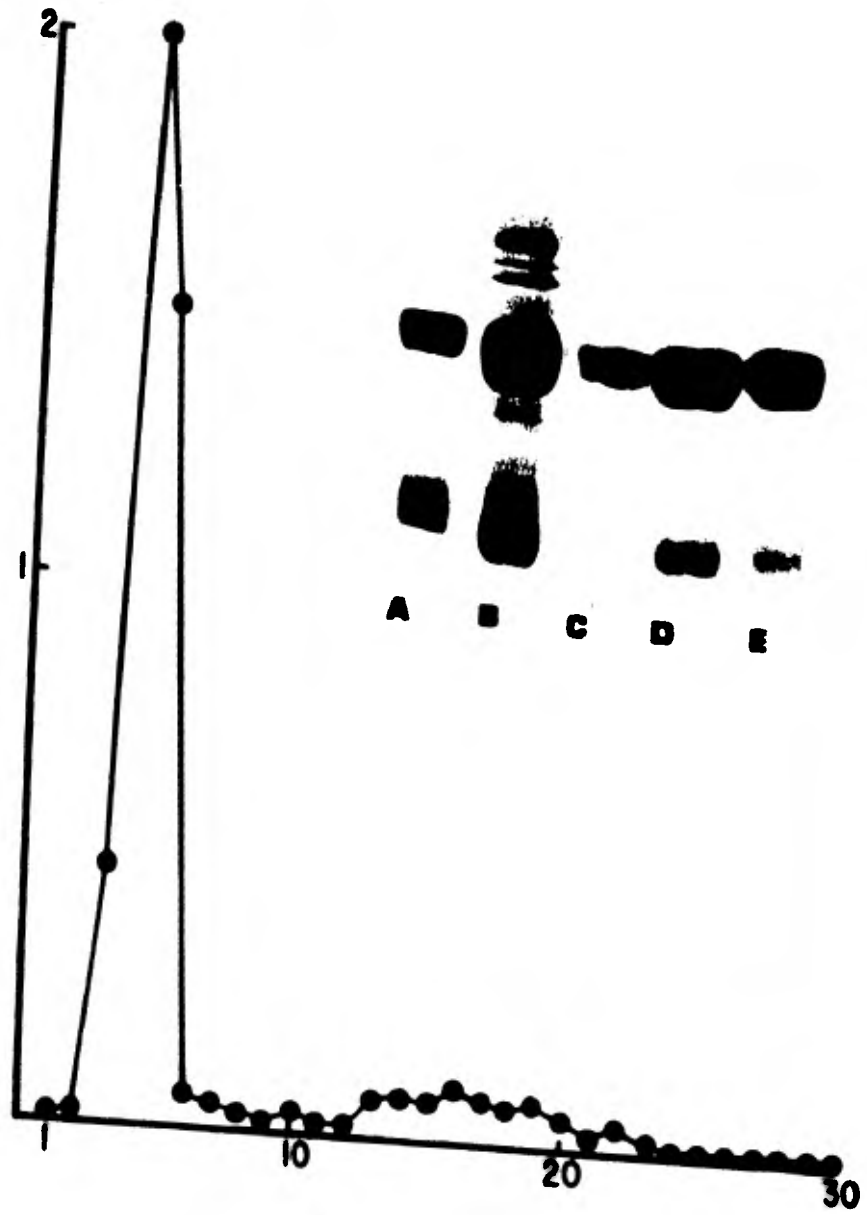


Fig. 6. Doble inmunodifusión e inmunolectroforésis de actina de músculo esquelético de conejo y suero de animales inmunizados contra actina. A Doble inmunodifusión en 1% agarosa aa, suero obtenido 4 1/2 meses después de la primera inyección del antígeno; 1, 6, 90, 45, 22.5, 11.25, 5.625, 2.8 μ gr respectivamente de actina de músculo esquelético de conejo. B Inmunolectroforésis en 1% agarosa, na, fracción de gammaglobulinas precipitadas con sulfato de amonio. 1, 40 μ gr; 2, 120 μ gr de actina de músculo esquelético de conejo.

ABSORBENCIA A 280 nm



DE FRACCION

tudios de inmunofluorescencia, éstos se purificaron por afinidad usando como absorbente actina polimerizada in vitro. Los anticuerpos purificados por afinidad sólo se caracterizaron por su capacidad de decorar el citoesqueleto de actina en fibroblastos de ratón de la línea 3T3.

Inmunofluorescencia e Inmunocitoquímica.

Debido a que este trabajo forma parte de un proyecto tendiente a la localización y caracterización de actina en Trypanosoma cruzi, un requisito indispensable que el anticuerpo debería cumplir, es que pueda ser utilizado en técnicas inmunofluorescentes e inmunocitoquímicas en la célula in situ. Se ha visto que hay anticuerpos precipitantes pero que no son útiles en inmunofluorescencia y viceversa (82,101,102). En este trabajo se utilizó el fibroblasto como sistema de detección de anticuerpos contra actina ya que la topología del citoesqueleto de actina en estas células es bastante conocida (61-78). Además se conocen algunos cambios del mismo bajo condiciones de transformación viral (70,103-106) o espontánea (107) así como en la presencia de ciertos agentes tales como el interferón (108), algunos andrógenos (109), inhibidores del metabolismo (110) y drogas como la citocalasina -- (68) por citar algunos.

En la Figura 8 se muestra el patrón inmunofluorescente e inmunocitoquímico de fibroblastos humanos de la línea VC-6 - teñidos con anticuerpos antiactina. A,B, célula completa teñida con suero total diluido 1:4 y antigammaglobulina (chivo) de conejo fluoresceinado; C, citoesqueleto teñido con IgG purificada por DEAE celulosa y PAP; D, gel de poliacrilamida-SDS del citoesqueleto después de extraer con triton X-100. Nótese la decoración de los cables típicos de actina (61-78, 103-110) que en algunos casos (C) se ve que atraviesan a todo lo largo de la célula. En el caso de A,B, se ven pocos cables fundamentalmente en los extremos de la célula y una tinción no definida en el resto de la célula. Esto podría deberse a la interacción inespecífica de algunas proteínas del suero con la célula. La imagen es diferente cuando la célula se trata con detergente (Fig. 8 C), ya que bajo estas condiciones quedan en el citoesqueleto fundamentalmente dos proteínas; una de ellas es la actina (Fig. 8D,2) y la otra una proteína de 58,000 (Fig. 8D,1) probablemente constituyente de los filamentos intermedios (96).

En la Figura 9 se muestra el patrón inmunofluorescente - de fibroblastos de ratón suizo de la línea 3T3 teñidos con anticuerpos purificados por afinidad. A, citoesqueleto teñido con antiactina absorbido con actina de músculo esquelético de conejo y antigammaglobulina (chivo) de conejo fluoresceinado; B,C,D, ci

Fig. 9. Patrón inmunofluorescente de citoesqueletos de la línea 3T3 de fibroblastos de embrión de ratón suizo. A, citoesqueleto teñido con antiactina purificado por afinidad (7.2 μ gr) absorbido con actina de músculo esquelético de conejo (1 mg) durante 24 horas a 4°C y antigammaglobulina (chivo) de conejo fluoresceinado y diluido 1/10; B,C,D, citoesqueleto teñido con antiactina purificado por afinidad (7.2 μ gr) y antigammaglobulina (chivo) de conejo fluoresceinado y diluido 1/10. Tiempo de exposición, 30", 500 X.

Fig. 8. Patrón inmunofluorescente e inmunocitoquímico de fibroblastos humanos de la línea VC-6 teñidos con anticuerpos antiactina. A, B, célula completa teñida con suero total diluido 1/4 y antigammaglobulina (chivo) de conejo fluoresceinado y diluido 1/10; C, citoesqueleto teñido con IgG purificada por DEAE (fracción 4 de la columna) y PAP diluido 1/100; D, gel de poliácrilamida: dodecilsulfato de sodio del citoesqueleto después de extraer con triton X-100. A, B, tiempo de exposición: 30", 500 X. C, tiempo de exposición dado automáticamente por el microscopio, 500 X.

Fig. 8. Patrón inmunofluorescente e inmunocitoquímico de fibroblastos humanos de la línea VC-6 teñidos con anticuerpos antiactina. A, B, célula completa teñida con suero total diluido 1/4 y antigammaglobulina (chivo) de conejo fluoresceinado y diluido 1/10; C, citoesqueleto teñido con IgG purificada por DEAE (fracción 4 de la columna) y PAP diluido 1/100; D, gel de poliácrilamida: dodecilsulfato de sodio del citoesqueleto después de extraer con triton X-100. A, B, tiempo de exposición: 30", 500 X. C, tiempo de exposición dado automáticamente por el microscopio, 500 X.

toesqueleto teñido con antiactina y antigammaglobulina (chivo) de conejo fluoresceinado. Nótese la decoración de los cables típicos de actina (61-78, 103-110) y al igual que en la línea VC-6 atraviesan la célula a todo lo largo pero son mas gruesas - - (Fig. 9B,C,D). Por otro lado la decoración de los cables de tensión desaparece al absorber el anticuerpo con actina corroborando, la especificidad del mismo. Resultados similares se obtienen cuando las células se incuban con suero preinmune o con el anticuerpo fluoresceinado (datos no mostrados). Por otro lado, los anticuerpos son capaces de teñir las bandas I de músculo esquelético de cerdo (datos no mostrados).

DISCUSION

Para la producción "artificial" de anticuerpos contra una molécula, es necesario considerar tanto la pureza del material - usado como antígeno, así como la antigenicidad del mismo. En lo - que respecta a la pureza en el caso particular de actina, es rela - tivamente difícil obtener preparaciones 100% puras por los méto - dos clásicos de purificación (11,85,86) ya que por su íntima aso - ciación con otras proteínas contráctiles de la célula algunas co - purifican con la actina. Los procedimientos generalmente usados - para purificar actina de músculo esquelético de conejo, requieren de un residuo acetónico del mismo, del cual se extrae la actina - monomérica y se purifica por ciclos de polimerización-despolimeri - zación combinados con ultracentrifugación. Los primeros intentos de purificar actina utilizando el método de Spudich y Watt (11) - en este laboratorio, no tuvieron éxito. El patrón electroforético en poliacrilamida-SDS del extracto obtenido del residuo acetónico, mostraba la virtual ausencia de actina, utilizando como criterio la comigración con actina de músculo esquelético de conejo obte - nida comercialmente. En cambio, se veía una banda prominente de - menor peso molecular, probablemente tropomiosina (datos no mostra - dos en este trabajo). Esto podría deberse por un lado, a la forma de preparación del residuo acetónico o a las condiciones de obten - ción del extracto a partir del cual se purifica la actina por po -

limerización-despolimerización. En lo que respecta a la preparación del residuo, después de moler el músculo este se trata con la solución de Guba-Straub (0.3M KCl, 0.15M fosfato de potasio, pH 6.5), con el objeto de remover miosina del mismo. Durante este tratamiento también se remueve actina en la forma de actomiosina por lo que, entre otras cosas, el tiempo de exposición del músculo en esta solución es importante. Por otro lado, Tsao y - Bailey (111) han demostrado que la tropomiosina se encuentra en mayor cantidad en un extracto de músculo de conejo, cuando antes de secar el residuo con acetona este ha sido lavado en soluciones con pH básico. El método de Feuer (85) inicialmente usado en este trabajo para la preparación del residuo acetónico, requiere de un lavado con $\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{Na HCO}_3$. En lo que respecta a la obtención del extracto, se ha visto que la extracción entre 0 y 2°C - minimiza pero no elimina totalmente la extracción de tropomiosina (112). Con esto podríamos pensar en un método de preparación del residuo acetónico en el cual se disminuyera el tiempo de tratamiento con la solución de Guba-Straub y se eliminara el lavado con $\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{Na HCO}_3$. Y con respecto a la extracción sería conveniente realizarla entre 0 y 2°C. Recientemente Strzelecka-Golaszewska et al (86), describen un método para la preparación del residuo acetónico, en donde se contemplan las posibilidades mencionadas arriba, el cual se usó en este trabajo (Fig. 2D, F, H y J). En lo que respecta a la antigenicidad, la molécula de actina,

debido a su alta conservación tanto estructural como funcional (ver introducción) es poco antigénica. De hecho la mayoría de los esfuerzos tendientes a producir anticuerpos contra actina nativa han sido infructuosos. Los geles de poliacrilamida-SDS permiten la separación de proteínas de acuerdo al peso molecular de sus cadenas polipeptídicas, por lo que en el caso de actina ésta se moverá con un peso molecular uniforme en el gel independientemente de su estado de polimerización. Este método además de ser útil en la purificación de proteínas, tiene la ventaja adicional de que el SDS desnaturaliza a las mismas pudiendo eventualmente hacerlas antigénicas. La producción y especificidad de los anticuerpos presentados en este trabajo apoya la utilidad del método para el caso particular de este tipo de proteínas.

La presencia de una banda de precipitación e los experimentos de doble inmunodifusión (Fig. 6A) sugiere la presencia de anticuerpos dirigidos cuando menos contra una proteína. En el caso de la inmunolectroforésis (Fig. 6B,1), la morfología de la banda no es tan concluyente, pero podría ser explicada de varias maneras:

Si observamos la migración del antígeno (Fig. 6B,1) vemos que este migra de una forma no discreta, es decir, se embarra a lo

largo del gel durante la electroforésis, y la banda de precipitación se forma precisamente por toda la zona de barrido del antígeno. Por otro lado, se sabe que la actina bajo ciertas condiciones iónicas y arriba de una cierta concentración crítica, es capaz de formar polímeros (20). Bajo las condiciones tanto de - concentración del antígeno como iónicas utilizadas en la inmunoelectroforésis (Fig. 6B,2) es altamente probable que la actina estuviese polimerizada. Ahora bien, podríamos tener una gama de polímeros en lo que respecta a tamaño y dependiendo del número de monómeros de cada polímero estos tendrán diferente peso y diferente carga neta. La velocidad de migración sería directamente proporcional a la carga neta e inversamente proporcional al tamaño del polímero, siempre y cuando no existan restricciones mecánicas debidas al tamaño del polímero y a los poros del gel. En este caso hay una estrecha relación entre el tamaño del polímero y la carga neta, ya que entre mas grande sea el polímero - tendrá una carga neta mayor y del mismo signo. Esto último condicionado a que durante el proceso de polimerización la conformación en el espacio de los monómeros no cambie de tal forma que - en el polímero se expresen residuos de carga opuesta a los expresados en el monómero, ya que bajo estas condiciones la carga neta no necesariamente sería del mismo signo. En lo que respecta al tamaño del polímero en el caso particular de este campo eléctrico, el papel jugado por la fuerza de gravedad es despreciable y por -

lo tanto la masa no sería importante, siempre y cuando no existan restricciones mecánicas debidas al tamaño de los poros del gel, de tal manera que las moléculas migraran solamente en función de su carga neta y no del tamaño de los mismos. La fuerza de gravedad solo actua sobre objetos cuya masa es grande y aproximadamente la fuerza eléctrica es 10^{39} veces mayor que la de gravedad (113).

Otra posibilidad sería que fuesen 2 bandas de precipitación y se estuviesen detectando por lo menos dos sistemas antígeno-anticuerpo. Esto podría deberse a que al momento de inmunización el antígeno estuviese contaminado con otra proteína, o que existiesen dos proteínas diferentes con determinantes antigénicos comunes o que los animales produjesen autoanticuerpos contra alguna de las proteínas contráctiles presentes en la preparación de actina usada en la inmunoelectroforésis. La probabilidad de contaminación al cortar la banda del antígeno del gel de poliacrilamida-SDS es muy baja (Figs. 3,4,5), ya que la diferencia en pesos moleculares de las proteínas presentes es tal que permite una clara separación. No obstante, cabe la posibilidad de la presencia de una proteína con el mismo peso molecular que la actina, pero diferente en estructura primaria y probablemente en carga. Con el método de purificación de polimerización-despolimerización (11) usado en este trabajo, se ha visto que en la zona de peso molecu-

lar correspondiente a la actina utilizando electroenfoque, solamente se detecta una isoforma en el caso de músculo esquelético de conejo y esta corresponde a la actina (45-47,54). Si la preparación de actina de músculo esquelético de conejo usada para inmunoelectroforé^{sis}, es cualitativamente similar a la usada como fuente de antígeno y la probabilidad de contaminación al cortar la banda es mínima, de tal manera que se inyecta el animal con una preparación homogénea de antígeno, entonces la presencia de dos bandas, tendría que explicarse de otra manera. Otra alternativa sería que en la preparación de actina existiesen dos proteínas con determinantes antigénicos comunes. De las proteínas contractiles estudiadas hasta la fecha como son, miosina, -tubulina, α , β actinina, proteína de la línea M, la proteína C, vimentina, desmina y otras, se sabe que no cruzan con anticuerpos antiactina, es decir, no poseen determinantes antigénicos comunes. Por último, queda la posibilidad de la producción de autoanticuerpos por un fenómeno autoinmune. Osborn et al (114) y Yildiz et al (115), han demostrado la presencia de autoanticuerpos contra los filamentos de 7-10nm en conejos no inmunizados e incluso en algunos libres de patógenos y Karsenti et al (116) han demostrado lo mismo para tubulina. Esta última posibilidad puede descartarse indirectamente ya que aunque no tenemos datos de inmunoelectroforé^{sis} del suero obtenido antes de empezar las inmunizaciones, este mismo suero en doble inmunodifusión

no presenta ninguna banda de precipitación (datos no mostrados). Por otra parte, los experimentos de inmunofluorescencia e inmunocitoquímica que se mencionan más adelante, son claros en lo que respecta a la especificidad de los anticuerpos. Con todo lo anterior la explicación mas probable acerca de la morfología de la banda de precipitación en inmunoelectroforésis, es la de una gradación en tamaño de los polímeros y por ende en la carga neta.

La especificidad de los anticuerpos se corrobora en los experimentos de inmunofluorescencia e inmunocitoquímica, ya que además de la topología del citoesqueleto de actina, se conoce - también la topología del citoesqueleto formado por otras proteínas contráctiles tales como la miosina (117), tropomiosina (63, 64), actinina α (64,118), desmina (119), vimetina (120), y tubulina (121). La presencia en el suero de los conejos inmunizados con actina, de anticuerpos dirigidos contra estas proteínas, podría ser detectada utilizando el fibroblasto completo. Los anticuerpos producidos en este trabajo sólo decoran el citoesqueleto de actina y por lo tanto son específicos para esta proteína, como - lo demuestran los experimentos de absorción del anticuerpo con - el antígeno, así como la incapacidad de decoración del suero preinmune y del anticuerpo fluoresceinado.

El mecanismo por medio del cual el SDS altera la estruc-

tura proteica es desconocido, pero causa que las cadenas polipeptídicas adopten una conformación más "extendida". Las regiones de una proteína reconocidas como determinantes antigénicos, podrían ser segmentos de la secuencia intrínseca de aminoácidos llamados determinantes secuenciales o bien, yuxtaposiciones de aminoácidos no secuenciales inducidos conformacionalmente. El SDS al "extender" a las proteínas provoca la desaparición de las determinantes conformacionales y la expresión de las secuenciales. Los anticuerpos contra actina de músculo esquelético de conejo producidos en este trabajo, reconocen a la forma nativa de la proteína (Fig. 6A,B) a pesar de que el antígeno usado para las inmunizaciones se desnaturalizó con SDS. La explicación de este dato es difícil ya que la actina nativa no es inmunogénica. Recientemente, Dosseto y Goridis (83), producen en conejo, anticuerpos contra actina de músculo esquelético de conejo desnaturalizada con SDS, y los caracterizan por radioinmunoensayo. Estos anticuerpos sólo reconocen a la forma polimérica de la molécula. Ellos concluyen, que de alguna forma durante el proceso de polimerización se expresan determinantes antigénicos no presentes en la forma nativa de la molécula pero sí en la desnaturalizada. Un fenómeno similar podría estar sucediendo en los experimentos de doble inmunodifusión e inmunoelectroforésis presentados en este trabajo, ya que las concentraciones de actina utilizadas están por arriba de la crítica (20) y por lo tanto es altamente proba-

ble la formación de polímeros.

Las inmunizaciones con actina en la mayoría de los casos, han resultado en la producción de anticuerpos que no discriminan entre actinas citoplasmáticas y musculares. Las especificidades de estos anticuerpos generalmente se han demostrado por inmunofluorescencia e inmunocitoquímica. Groschel-Stewart (122) obtiene un anticuerpo que reacciona con actina de músculo pero no con actinas citoplasmáticas. También obtienen después de inmunizar con actina de músculo esquelético o liso de pollo acoplada a agarosa un anticuerpo que reacciona exclusivamente con tejidos de pollo y únicamente con el tipo de músculo del cual se obtuvo el antígeno. Por otro lado, Lubitt y Schwarts (77) utilizando como antígeno actina del molusco Aplysia californica obtienen un anticuerpo que reconoce a las actinas citoplasmáticas pero no a las de músculo esquelético. Los anticuerpos producidos en este trabajo reaccionan con actina de músculo esquelético de conejo y de pollo (actina α) en doble inmunodifusión y con actina de músculo esquelético de cerdo (actina α), de fibroblastos humanos y de ratón (actina β y γ) en inmunofluorescencia. Es decir, no son especie-específicos y no discriminan a las actinas citoplasmáticas de las musculares.

Es difícil la comparación cuantitativa de los anticuerpos

producidos en este trabajo con los reportados en la literatura, por un lado debido a la carencia de datos cuantitativos y por el otro, a las variaciones metodológicas empleadas en su producción. Hasta la fecha sólo existen dos reportes que aparecieron recientemente en el curso de este trabajo, en donde se producen en conejo anticuerpos contra actina de músculo esquelético de conejo; el de Willingham et al (76) y el de Dosseto y Goridis (83). A pesar de que en los dos trabajos se usa la actina desnaturada con SDS estos difieren metodológicamente entre sí. Willingham et al (76) después de separar la proteína en un gel de poliacrilamida SDS, la eluyen y la tratan con glutaraldehído, a diferencia de Dosseto y Goridis (83) quienes después de separar la y eluirla la usan tal cual para inmunizar a los animales. Por otro lado, estos trabajos difieren metodológicamente del presentado en estas páginas en donde el antígeno se usa desnaturado o inmovilizado en poliacrilamida-SDS y desnaturado en solución.

La elucidación del mecanismo de acción del SDS, así como de los cambios conformacionales que debe de sufrir la molécula de actina al acoplarla a soportes tales como poliacrilamida-agarosa, al entrecruzarla con glutaraldehído, al oxidarla y carboximetilarla, al desnaturarla a 4°C, junto con los datos de secuencia y el mapeo fino de la estructura antigénica de la molécula

la utilizando enfoques similares a los usados por Dosseto y Gorides (83) nos permitiría en un futuro usar a los anticuerpos como pruebas conformacionales y entender la dinámica del citoesqueleto de actina en la célula. Por otro lado, la producción de anticuerpos contra ciertas secuencias de la molécula de actina nos permitiría estudiar la distribución de estas a lo largo de la filogenia, así como su papel en la conservación estructural y funcional de la molécula de actina.

BIBLIOGRAFIA

1. Erasistratus (290 B.C.) Citado por Galen, De Loas Affectis. Tomado de Wilson L.G. 1961, William C Roone's Theory of muscular contraction. Notes Roy. Sco. Lnd. 16: 158-178.
2. Von Muralt, A. and J.T. Edsall. 1930, J. Biol. Chem. 89: 315.
3. Von Muralt, A. and J.T. Edsall. 1930, J. Biol. Chem. 69: 351.
4. Engelhardt, V.A. and M.N. Ljubimova. 1939, Nature 144: 668.
5. Lundsguard, E. 1931, Biochem. Z. 233: 322.
6. Straub, F.B. 1943, Stud Szeged 3: 23.
7. Szent-Gyorgyi, A. 1942, Studies Inst. Med. Chem. Univ. Szeged 1: 17.
8. Ebashi, S., Endo, M. 1968, Prog. Biophys. Mol. Biol. 18: 123.
9. Ebashi, S., Endo, M., Ohrsuki, J. 1969, Q. Rev. Biophys. 2: 351.
10. Ohtsuki, J. et al. 1967, J. Biochem. 61: 817.
11. Spudich, J.A., Watt, S. 1971, J. Biol. Chem. 246: 4866.
12. Potter, J.D. 1974, Arch. Biochem, Biophys. 162: 436.

13. Hanson, J., Lowy, J. 1963, J. Mol. Biol. 6: 46.
14. Hanson, J., Lowy, J. 1964, Proc. Roy. Soc. London Ser.
15. Huxley, H.E. and Bown, W. 1967, J. Mol. Biol. 30: 383.
16. Moore, P.B., Huxley, H.E., De Rosier, D.J. 1980, J. Mol. Biol. 50: 279.
17. Ohtsuki, I., Waka, B.A. Yashi, T. 1972, J. Biochem. 72: 369.
18. Hanson, J., et al. 1972, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 37: 251.
19. Perry, S.V. et al. 1972. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 37: 251.
20. Korn, E.D. 1978. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 588.
21. Huxley, H.E. 1963, J. Mol. Biol. 7: 281.
22. Elzinga, M., et al. 1973, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70: 2687.
23. Asatov, A.M., Armstrong, M.D. 1967, Biochem. Biophys. Res. Commun. 26: 168.
24. Hardy, M.F., Perry, S.V. 1969, Nature 233: 300.
25. Nagy, B., Jencks, W.O. 1962, Biochemistry 1: 987.
26. Vandekerckhove, J. 1979, Differentiation 14: 123.
27. Vandekerckhove, J. 1979, FEBS Letters 102: 219.

28. Collins, J.H., Elzinga, M. 1975, J. Biol. Chem. 250: 5915.
29. Lu, R.C., Elzinga, M. 1977, Biochemistry 16: 312.
30. Ishikawa, H. et al. 1969, J. Cell. Biol. 43: 312.
31. Pollard, T. D. & Wehing, R.R. 1974, CRC Crit. Rev. Biochem. 2: 1.
32. Wehings, R.R. 1976, en Cell Biology, Eds. Altam, P.C.P., Dittmer, D.S. (FASEB, Bethesda, Md.) pp. 341.
33. Tilney, L.G., Detmers, P. 1975, J. Cell. Biol. 66: 508.
34. Sheetz, M.P. et al. 1976, Biochemistry 15: 4486.
35. Hartwig, J.H., Stogsel, T.P. 1975, J. Biol. Chem. 250: 5696.
36. Jackson, P., Crawford, N. 1976, Biochem. Soc. Trans. 4: 333.
37. Boxer, L.A., Stossel, T.P. 1976, J. Clin. Invest. 57: 964.
38. Moring, S. et al. 1975, J. Neurobiol. 6: 245.
39. Kane, R. E. 1975, J. Cell. Biol. 66: 305.
40. Mabuchi, I. 1976, J. Mol. Biol. 100: 509.
41. Tilney, L.G. 1975, J. Cell. Biol. 64: 289.

42. Tilney, L. G. 1976, J. Cell. Biol. 69: 73.
43. Lestourgeon, W. M. et al. 1975, B. B. Acta 379: 529.
44. Spudich, J. A. 1974, J. Biol. Chem. 249: 6013.
45. Zechel, K., Weber, K. 1978, Eur. J. Biochem. 89: 105.
46. Zechel, K. 1980, Eur. J. Biochem. 110: 343.
47. Whalen, R. G. et al. 1976, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73: 2018.
48. Senda, N. et al. 1975, Exp. Cell. Res. 91: 393.
49. Bettex-Galland, M. et al. 1972, J. Mol. Biol. 68: 533.
50. Spudich, J. A. 1973, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 37: 585.
51. Yang, Y. Z. Perdue, J. F. 1972, J. Biol. Chem. 247: 4503.
52. Lazarides, E., Lindberg, U. 1974, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71: 4742.
53. Carlsson, L. et al. 1976, J. Mol. Biol. 105: 353.
54. Vandekerckhove, J. Weber, K. 1978, Nature 276: 720.
55. Vandekerckhove, J. Weber, K. 1978, Nature 284: 475.
56. Weihing, R. R., Korn, E. D. 1971. Biochemistry 10: 590.
57. Kleve, M. G. et al. 1979, J. Exp. Zool. 204: 21.
58. Sanger, J. W. 1975, Cell Tiss. Res. 161: 431.

59. Forer, A., Behnke, O. 1972, J. Cell. Sci. 11: 491.
60. Chang, C. M., Goldman, R. D. 1973, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71: 2268.
61. Lazarides, E., Weber, K. 1974. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71: 2268.
62. Miller, F., et al. 1976, Clin. Immunol. Immunopathology 5: 416.
63. Lazarides, E. 1975, J. Cell. Biol. 65: 549.
64. Lazarides, E. 1975, J. Histochem. Cytochem. 23: 507.
65. Lazarides, E. 1976, en Cell Motility, Eds. Goldman, R. et al. (Cold Spring Harbor Conferences on cell proliferation, 3: 347.
66. Karsenti, E. et al. 1978, J. Histochem. Cytochem. 26: 934.
67. Osborn, M., Weber, K. 1977, Exp. Cell. Res. 106: 339.
68. Weber, K. et al. 1976, Exp. Cell. Res. 102: 285.
69. Rama & Kors, F. et al. Exp. Cell Res. 127: 309.
70. Brinkley, B. R., Fuller, G. M. 1978, Texas Rep. Biol. Med. 37: 26.
71. Bretscher, A., Weber, K. 1978, J. Cell. Biol. 79: 839.
72. Meza, I. et al. 1980, J. Cell. Biol. 87: 746.

73. Kleve, M. G., Clark, W. H. 1980, J. Cell. Biol. 86: 87.
74. Bussolati, G., et al. 1980, J. Histochem. Cytochem. 28: 169.
75. Ramaekers, F.C.S. et al. 1980, Exp. Cell. Res. 127: 309.
76. Willingham, M. C. 1981, J. Histochem. Cytochem. 29: 17.
77. Lubit, B. W., Schwartz, J. H. 1980, J. Cell. Biol. 86: 891.
78. Jockusch, B.M. et al. 1978, Histochemistry 85: 177.
79. Trenchev, P., Holborow, E.J. 1976, Immunology 31: 509.
80. Lessard, J. L. et al. 1979, Anal. Biochem. 94: 140.
81. Benyamin, Y. et al. 1979, FEBS Letters 102: 69.
82. Owen, M. J. et al. 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 4484.
83. Dosseto, M., Goridis, C. 1980, Molec. Immunol. 17: 1219.
84. Laemmli, U. K. 1970, Nature 227: 680.
85. Feuer, G. et al. 1948. Hung. Acta Physiol. 1: 150.
86. Strzelecka-Golaszewska, H. et al. 1980, Eur. J. Biochem. 104: 41.
87. Anderson, C.W. et al. 1973. J. Virol. 12: 241.

88. Garvey, J. S. 1977, *Methods in Immunology*. W. A. Benjamin, Inc. Massachusetts.
89. Sundovist, K. K. et al. 1980, *Exp. Cell. Res.* 130: 327.
90. Harris, H. E., Weeds, A. G. 1980, *Cell. Biol. Int. Rep.* 4: 741.
91. Norberg, R. et al. 1979, *Eur. J. Biochem.* 100: 575.
92. Bamberg, J. R. et al. 1980. *FEBS Letters* 121: 178.
93. Harris, H. E. 1980, *FEBS Letters* 121: 175.
94. Utter, G. 1976, *Exp. Cell. Res.* 114: 127.
95. Weber, K. et al. 1975. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72: 459.
96. Brown, S. et al. 1976, *J. Supramolec. Struct.* 5: 119.
97. Weber, K. et al. 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75: 1820.
98. Sternberger, L. A. et al. 1970, *J. Histochem. Cytochem.* 18: 315.
99. Graham, R. C., Karnovsky, M. J. 1966, *J. Histochem. Cytochem.* 14: 291.
100. Bradford, M. M. 1976, *Anal. Biochem.* 72: 248.
101. Toh, B. H. et al. 1979, *Clin. Immunol. Immunopathol.* 14: 11.

102. Trenchev, P. et al. 1974, Clin. Exp. Immunol. 16: 125.
103. Verderame, M. et al. 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77: 6624.
104. Edelman, G. M., Yahara, I. 1976, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73: 2047.
105. Willingham, M. C. 1977, Cell, 10: 375.
106. McClain, D. A. et al. 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 2750.
107. Tucker, R. W., et al. 1978, Cell. 13: 629.
108. Pfeffer, L. W. et al. 1980, J. Cell. Biol. 85: 9.
109. Couchman, J. R. 1981, Cancer Res. 41: 263.
110. Bershadsky, A. D. et al. 1980, Exp. Cell. Res. 127: 421.
111. Tnno, T. C., Bailey, K. 1953, Biochim. Biophys. Acta 11: 102.
112. Drabiwowski, W., Gergely, J. 1962, J. Biochem. 237: 3412.
113. Feynman, R.P. et al. The Feynman Lectures on Physics, mainly electromagnetism and matter. II. Addison-Wesley Publishing Co. U.S.A.
114. Osborn, M. et al. 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74: 2490.
115. Yildiz, A. et al. 1980, Clin. Immunol. Immunopathol. 16: 279.

116. Karsenti, E. et al. 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74: 3997.
117. Weber, K., Groschel-Stewart, V. 1974, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71: 4561.
118. Lazarides, E., Burridge, K. 1975, Cell. 6: 289.
119. Gard, D. L. et al. 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76: 3394.
120. Franke, W. W. et al. 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 5034.
121. Weber, K. et al. 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72: 459.