



UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**EFFECTO MODULADOR DE LAS PROTEÍNAS ASOCIADAS A
MICROTÚBULOS EN LA FORMACIÓN DE MICROTÚBULOS
Y MICROFILAMENTOS**

LORENA CARMONA GUERRA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Patología Animal.

PROFESOR GUIA: GUSTAVO FARIAS ROLDAN

**SANTIAGO, CHILE
2004.**



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



EFFECTO MODULADOR DE LAS PROTEÍNAS ASOCIADAS A MICROTÚBULOS EN LA FORMACIÓN DE MICROTÚBULOS Y MICROFILAMENTOS

LORENA CARMONA GUERRA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Patología Animal.

NOTA FINAL:

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUIA	: GUSTAVO FARIAS ROLDAN
PROFESOR CONSEJERO:	RICARDO MACCIONI BARAHONA
PROFESOR CONSEJERO:	RAQUEL CEPEDA CANALES

SANTIAGO, CHILE

2004

Deseo expresar mis agradecimientos a aquellos que hicieron posible la realización de esta memoria de título:

Dr. Ricardo Maccioni B, que permitió la realización de esta memoria de título en su laboratorio y me integró generosamente a su grupo de trabajo.

A mis compañeros de Laboratorio: Paula, Tomás, Marcela, Juan Pablo, Lorena, Ariadna, Daniel, Claudia, Omar, Elías, Cristian, por su disposición a ayudarme y su amistad.

A Hans por su paciencia infinita para enseñarme las técnicas de laboratorio.

Al Dr. Jorge Garrido, por entrgrme su tiempo en la microscopía electrónica.

Al Dr. Rodrigo Durán de la planta faenadora de carnes SOFACAR.

A Francisco Escobar por su apoyo y consejos.

A mis incondicionales compañeras Runa y Atenea.

A mi familia por su pacencia y confianza en mi.

Un especial agradecimiento al Dr. Gustavo Farías R., por su incondicional apoyo, su constante incentivo y por los conocimientos entregados para la realización de este trabajo.

MUCHAS GRACIAS

A mis padres Alejandro y Victoria.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
El citoesqueleto en células eucariotas.....	3
Microtúbulos y tubulina	5
Formación de microtúbulos <i>in vitro</i>	8
Proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs).....	12
La proteína Tau.....	16
La proteína MAP-2.....	19
Microfilamentos y actina.....	21
3. OBJETIVOS.....	28
Objetivo general.....	28
Objetivos específicos.....	28
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	29
5. RESULTADOS.....	39

6. DISCUSIÓN.....	54
7. CONCLUSIONES.....	64
8. BIBLIOGRAFÍA.....	65

RESUMEN.

En este trabajo de investigación y, en el marco de un estudio estructural y funcional del citoesqueleto celular, se procedió a purificar las proteínas: tubulina, actina, tau y MAP-2. Las tres primeras proteínas se obtuvieron de cerebros de bovino frescos obtenidos en el matadero de SOFACAR S.A. Por otra parte, la actina fue purificada a partir de músculo de pollo. Una vez purificadas las proteínas y conocida su concentración, fueron caracterizadas por medio de electroforesis en PAGE, teñidos con azul de coomassie para ver su grado de pureza y también fueron inmunocaracterizadas, para su identificación molecular.

Cada proteína se concentró y guardó a -80°C hasta su uso. Posteriormente se realizaron experimentos de cinética de polimerización *in vitro* de microtúbulos y microfilamentos, en cuatro ensayos distintos, pero comparativos entre sí, utilizando para ello métodos turbidimétricos en los cuales se registraron las lecturas de los cambios de absorbancia bajo condiciones de pH y temperatura conocidas. Los dos primeros tenían como proteína base la tubulina (1,8mg/ml) a la cual se adicionó una de las diferentes MAPs. En un caso se incubó en presencia de tau (0,3mg/ml) y se registraron los cambios en absorbancia. En otro ensayo se adicionó MAP-2 (0,3mg/ml) a la tubulina pura incubada y se registró la cinética de polimerización. Ambas lecturas se realizaron a 340nm. Otros ensayos se realizaron con actina (0,4mg/ml), que fue incubada en primer lugar en presencia de tau y luego con MAP-2, registrándose los cambios de absorbancia a 232nm de longitud de onda constante.

Los valores obtenidos en cada lectura fueron graficados en función del tiempo. Las curvas obtenidas fueron comparadas entre sí, para establecer las diferencias y semejanzas entre ellas.

Durante los experimentos de cinética de polimerización, se tomaron alícuotas de cada ensayo a distintos tiempos, para luego procesar estas muestras y observarlas al microscopio electrónico, de modo de corroborar la curva de cinética respectiva con las estructuras formadas. Estas se analizaron comparativamente con los controles y entre sí.

Por otra parte, se procedió a analizar las microfotografías obtenidas al incubar los

microfilamentos con los microtúbulos preformados en presencia de tau o de MAP-2, para observar la presencia de interacciones macromoleculares entre las estructuras.

Estos estudios se orientaron a reproducir *in vitro* un sistema de polimerización y depolimerización de las estructuras del citoesqueleto, de modo de aproximarse y comprender el proceso celular que ocurre normalmente en la célula, además de observar la participación de las MAPs en la formación y regulación de este sistema, y la interacción entre las macromoléculas que se forman, microtúbulos y microfilamentos.

De lo expuesto, se verificó la reproducibilidad de la formación en condiciones *in vitro* de estructuras filamentosas y por medio del estudio comparativo de las MAPs se determinó que la proteína tau fue más eficiente que MAP-2 en promover la polimerización de estructuras del citoesqueleto, así como también se corroboró que ambas MAPs disminuyen fuertemente la concentración crítica necesaria tanto de tubulina como de actina en sus respectivos procesos de polimerización.

En cuanto a las reacciones supramoleculares, al analizar las imágenes en microscopía electrónica se verificó la existencia de interacciones entre ambos componentes del citoesqueleto, observándose pequeños filamentos que conectan ambas macromoléculas, correspondientes a las MAPs estudiadas.

1. INTRODUCCIÓN.

Este trabajo se realizó en el marco de la investigación de la naturaleza estructural y funcional de las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs). Los estudios se han orientado principalmente a avanzar en el conocimiento de la expresión, distribución, regulación y roles celulares de este grupo de proteínas que son fundamentales en la determinación de la arquitectura celular y su fisiología. Al respecto, a pesar del constante avance del conocimiento, incluso a nivel molecular, de las interacciones moleculares entre los componentes del citoesqueleto, aún se presentan muchas interrogantes por dilucidar.

Por ello, es de gran importancia intentar reproducir *in vitro*, este sistema complejo de organización celular y estudiar sus mecanismos regulatorios, para tratar de entender su funcionamiento *in vivo*. Dentro de esta línea de investigación, se enmarca el objetivo central de esta memoria de título, que es estudiar *in vitro* el comportamiento de microtúbulos y microfilamentos, para evidenciar las interacciones que se producen entre estos componentes y las MAPs.

Estos estudios son fundamentales para comprender la organización del citoesqueleto en las células normales, así como también para entender sus alteraciones en diferentes patologías como en la enfermedad de Alzheimer, distintas neoplasias del humano y en algunas enfermedades emergentes, como aquellas producidas por priones: Enfermedad de Creutzfeldt Jakob en humanos, Scrapie (ovinos) y Encefalopatía Espongiforme Bovina (BSE). De acuerdo a lo anterior, este trabajo se enmarca en el estudio de la dinámica normal entre las moléculas constituyentes del citoesqueleto, para así, entender de mejor modo las modificaciones que se producen cuando se instaura una patología. En el caso de la medicina veterinaria y, ante las perspectivas de exportación de productos pecuarios, es necesario conocer y diferenciar las patologías que puedan afectar al citoesqueleto, ya que, en enfermedades de gran relevancia actual, como BSE y Scrapie, se producen modificaciones citoplasmáticas, que involucran las moléculas en estudio. Por otra parte, existen drogas antimetabólicas que son de uso médico veterinario, como la vincristina, que basan su acción en la capacidad de interferir en los procesos de formación del citoesqueleto de las células neoplásicas.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

El citoesqueleto en células eucariotas.

El desarrollo de la biología celular moderna, se apoya en el conocimiento y comprensión de los factores que afectan la morfogénesis, diferenciación de la estructura y dinámica del citoplasma, el cual está organizado por polímeros de proteínas fibrosas que se interrelacionan macromolecularmente para formar una trama tridimensional de organización compleja, llamada citoesqueleto (Porter, 1984).

Los principales polímeros que se ensamblan para conformar el citoesqueleto celular corresponden a: microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios (Maccioni y Arechaga, 1987).

Una amplia variedad de procesos intracitoplasmáticos son regulados espacial y temporalmente de acuerdo a las demandas funcionales de la célula. Al respecto, muchas de las funciones celulares que incluyen, entre otras: la determinación de la forma y diferenciación celular, distribución subcelular de los organelos, tráfico intracelular, procesos secretorios, modulación de receptores de superficie, constitución del axonema de cilios y flagelos y en la división celular formando el huso mitótico, las que están estrechamente asociadas al citoesqueleto (Maccioni y Arechaga, 1987). Actualmente se sabe además, que los microtúbulos participan en la generación de las fuerzas de empuje y contracción en los movimientos celulares (Inoue y Salmon, 1995).

Al analizar la naturaleza de las asociaciones que se observan entre los componentes del citoesqueleto, surge la pregunta de cómo contribuye el ensamblaje de los polímeros de proteínas fibrosas en la organización y dinámica del citoplasma, y cuál es la naturaleza de las interacciones entre sus componentes (Maccioni y Cambiazo, 1995). Estas interacciones incluyen: (i) asociaciones homólogas entre proteínas (relaciones monómero-monómero), como las que ocurren en los procesos de polimerización de actina en la formación de microfilamentos o en el autoensamblaje de tubulina para formar microtúbulos; (ii)

asociaciones heteróloga (proteína-proteína), como en el caso de las interacciones entre microtúbulos y proteínas asociadas a ellos, denominadas MAPs (Farías *et al.*, 2002).

Los mecanismos de asociación de proteínas están determinados por el equilibrio monómero-polímero y la interrelación que se establece entre éstos y los distintos componentes celulares.

Inicialmente se comenzó a reconstituir *in vitro* este sistema de polimerización biológica con extractos de cerebros de rata y de cerdo (Maccioni y Arechaga, 1987).

Dentro de estos estudios, se determinaron una serie de factores que participan en la polimerización, y que interactúan de una forma dinámica en el crecimiento y desensamblaje de microtúbulos, de acuerdo a la hipótesis de inestabilidad dinámica. Según ésta, en la célula los microtúbulos pueden variar en su tasa de ensamblaje y desensamblaje, encontrándose ya sea en una fase de elongación lenta o en un rápido acortamiento, causado por la adición o la pérdida de subunidades de tubulina desde los polos dinámicos del microtúbulo. En apoyo a esta idea, se han encontrado transiciones abruptas de microtúbulos individuales entre estas dos fases que se denominan de “rescate”, a la etapa constructiva de crecimiento, y de “catástrofe” a la etapa de desintegración del microtúbulo (Maccioni y Seeds, 1982; Desai y Mitchison, 1997).

Por su parte, los microfilamentos participan en una variedad de procesos celulares, como son: la citokinesis, endocitosis, crecimiento neuronal, quimiotaxis, entre otros. Al igual que con los microtúbulos, los microfilamentos se comportan dinámicamente en la célula y es posible evidenciar filamentos con distinto grado de polimerización, ensamblándose y desensamblándose (Carlier *et al.*, 1999).

Los microfilamentos, estructuralmente, se localizan en la parte más externa del citoplasma celular y, por lo tanto, también influye y es influida por las señales de la superficie celular. En muchas células, como los glóbulos rojos, filamentos muy cortos de actina se disponen bajo la membrana plasmática, formando una especie de andamiaje que da soporte y a la vez flexibilidad a estas células para su paso por capilares y vasos de distinto diámetro (Weber y Osborn, 1985).

En las células móviles, los microfilamentos se ordenan formando redes muy ramificadas que generan la fuerza física para el movimiento, a medida que se van agregando polímeros hacia la membrana plasmática (Pollard y Borisy, 2003).

Los filamentos intermedios, son polímeros de proteínas muy diversas y que se diferencian según el tipo celular, una de ellas es la queratina de las células epidérmicas (Capote y Maccioni, 1998). También pertenecen a este heterogéneo grupo, la miosina, la elastina y el fibrinógeno. Estas proteínas forman estructuras filamentosas diferentes a los microtúbulos o microfilamentos y se ha demostrado que establecen conexiones entre estos dos sistemas y también con la membrana plasmática. Los filamentos intermedios presentes en las neuronas (neurofilamentos) contribuyen a mantener la organización del axoplasma y proporcionan fuerza mecánica a lo largo del axón (Klymkowski, 1989). Por otro lado, los neurofilamentos serían determinantes en la formación del calibre axonal y en la estabilización mecánica de los axones (Li y Black, 1996).

Microtúbulos y tubulina.

Los microtúbulos son polímeros acídicos formados por heterodímeros de tubulina y constituyen uno de los componentes fundamentales del citoesqueleto.

Estos son organelos celulares de distribución generalizada en los organismos eucariontes (Little *et al.*, 1986), presentan una alta conservación en las distintas especies y, especialmente entre los mamíferos se encuentra un alto porcentaje de similitud en la estructura y naturaleza química de las subunidades de esta proteína (Cleveland, 1990). La subunidad α de la estructura de tubulina es la que presenta un mayor grado de conservación, encontrándose hasta un 99% de similitud entre la subunidad α en la tubulina del cerebro del humano, de rata y cerdo.

Por otra parte, dentro de un mismo organismo, la tubulina constitutiva de los diferentes tejidos también posee un alto grado de homología (Sullivan, 1988). A nivel tisular, la tubulina se encuentra preferentemente distribuida a nivel del sistema nervioso (Maccioni y Arechaga, 1987).

La tubulina es una proteína, definida como heterodímero, ya que está compuesta por subunidades distintas: α y β , cuyo peso molecular es de 50kDa cada una. Ambos monómeros contienen alrededor de 450 aminoácidos y su secuencia completa es conocida, habiéndose establecido un grado de homología de alrededor de 60% entre ambas (Little *et al.*, 1986; Shu y Joshi, 1995).

Los dímeros de tubulina se disponen alternando subunidades globulares, denominadas α y β para formar un túbulo o protofilamento, el cual se dispone paralelamente a otros túbulos en torno a un eje central conformando así polímeros cilíndricos conocidos como microtúbulos que, están formados por 13 protofilamentos. Los microtúbulos formados tienen un diámetro aproximado de 25nm y poseen una alta variabilidad en su largo (Brinkley, 1997). Si bien los microtúbulos son constituyentes del axonema de cilios y flagelos en bacterias y protozoos, estos últimos difieren, principalmente, de los del citoesqueleto por su estabilidad. *In vitro*, el número de protofilamentos que se ensamblan espontáneamente, a partir de tubulina de distintos mamíferos, varía entre 10 y 15 (Desai y Mitchison, 1997).

Una de las características más importantes de los microtúbulos del citoesqueleto es su comportamiento dinámico, el cual permite un constante intercambio de subunidades entre los polímeros que se están formando y el *pool* soluble de tubulina. Esto es, particularmente, importante en procesos como la división celular por mitosis, ya que participan en la formación del huso mitótico en el que existe un constante reordenamiento de los microtúbulos para llevar a cabo la división celular (Wittman *et al.*, 2001).

El descubrimiento de proteínas similares a tubulina en bacterias, da cuenta de su antigüedad en la evolución y de su importancia para la célula.

Otro proceso en el que se demuestra el dinamismo de los microtúbulos es en el crecimiento celular, principalmente a nivel de las neuronas, donde se ha descrito la importancia de esta dinámica para la estructuración de los conos de crecimiento axonal (Shea y Beermann, 1994). Más aún, los microtúbulos se comportan así, incluso en ausencia

de un sistema de ordenamiento celular; la vida media de los microtúbulos en la mayoría de los cultivos celulares es de sólo algunos minutos.

Para la formación de los microtúbulos se requiere del ensamblaje de las subunidades de tubulina. En este proceso se pueden describir tres fases consecutivas para llegar al polímero a partir de los dímeros. En primer lugar se verifica una fase de nucleación o iniciación que ocurre sólo si se ha alcanzado una concentración crítica (Cr) de tubulina para gatillar la formación de los microtúbulos (Job *et al.*, 2003).

De esta forma, la velocidad de crecimiento de los microtúbulos, es proporcional a la concentración de tubulina y al número de estructuras de nucleación (Caudron *et al.*, 2002). Este proceso se da espacialmente en determinadas estructuras citoplasmáticas denominadas centros organizadores de microtúbulos (MTOC), que por ende, se cree que son el sitio blanco de la regulación del proceso. El MTOC más ampliamente estudiado es el centrosoma de células animales (Kellog *et al.*, 1994), y es el responsable *in vivo* de la formación del citoesqueleto tubular de las células eucariontes en la interfase y del huso mitótico en la división celular (Brinkley, 1997; Uzbekov *et al.*, 2002).

Luego de formarse los núcleos de polimerización, viene una fase de crecimiento acelerado del microtúbulo, en que se adicionan subunidades al núcleo preformado. Esta se conoce como fase de elongación (Desai y Mitchison, 1997). Finalmente se llega a una fase de término, en la que se alcanza un equilibrio dinámico en los polímeros formados.

La dinámica del proceso de elongación en el ensamblaje *in vitro* de microtúbulos, está determinada por el balance neto entre la adición sucesiva de heterodímeros de tubulina al polo de crecimiento o *plus* (+) y su disociación desde el extremo opuesto o *minus* (-). Este proceso se conoce como inestabilidad dinámica (Mitchison y Kirshner, 1984). En el proceso de elongación, la velocidad de incorporación de heterodímeros de tubulina al microtúbulo es mayor que la velocidad de disociación de éstos. Así la concentración de tubulina libre disminuye hasta que alcanza la concentración crítica para el ensamblaje (Murray, 1984). De esta forma, el proceso de ensamblaje de los microtúbulos, puede ser descrito como un proceso que se aproxima al estado estacionario.

En este estado de equilibrio ocurren simultáneamente dos reacciones: ensamblaje y desensamblaje que, por verificarse en polos opuestos del microtúbulo, confieren un carácter polar a la adición y depolimerización de subunidades de tubulina al microtúbulo (Li y Black, 1996).

Formación de microtúbulos *in vitro*.

Weisenberg, (1972) fue el primero en demostrar que se podían formar microtúbulos *in vitro*, a partir de extractos de cerebros. Tanto, *in vivo* como *in vitro* existen una serie de mecanismos reguladores que interactúan con tubulina en el ensamblaje de estructuras, definiendo que, para reproducir el sistema en condiciones biológicas, eran necesarios algunos requisitos, como mantener la temperatura de 37°C (temperatura a la cual se verifican los procesos fisiológicos de los mamíferos), además se requería la presencia de Mg^{+2} , como un ión bivalente que cataliza el proceso y también se descubrió el rol de un nucleótido clave, el GTP (guanosine trifosfato), que promovía el ensamblaje y contribuía a estabilizar las estructuras formadas (Maccioni y Seeds, 1982).

El GTP proporciona, por medio de su hidrólisis, la energía necesaria para que se establezca el balance dinámico entre la polimerización y depolimerización en el dímero de tubulina. Así, existen dos sitios de unión a GTP, que son llamados “el sitio-E” (intercambiable), que se encuentra en la molécula de β -tubulina, y “el sitio-N” (no intercambiable), que está asociado a la molécula de α -tubulina (Mitchison, 1993).

La formación de microtúbulos es acompañada de la hidrólisis del GTP unido a β -tubulina, que al agregarse al túbulo en formación, se hidroliza, quedando la molécula de GDP fuertemente unida al núcleo en formación. El GTP, que posee α -tubulina, no se hidroliza, ni es intercambiable por el GTP libre, por lo que se le puede considerar como parte de la estructura de la molécula de tubulina. Así, se ha demostrado el papel esencial, que cumple este nucleótido en el ensamblaje y la estabilización de la estructura en formación (Valle *et al.*, 1994). Por otra parte, la hidrólisis del GTP sería necesaria para la desestabilización de la estructura microtubular (Caplow y Shanks, 1996; Cowan y Lewis, 1999).

El papel del GTP en la polimerización de microtúbulos ha sido estudiado, usando análogos de GTP y se ha demostrado que además de su especificidad con el sistema, es fundamental en mantener los enlaces entre las subunidades de tubulina y, por lo tanto, participa en la estabilidad del microtúbulo. Sobre este punto es importante explicar la hipótesis de la inestabilidad dinámica que se verifica en este sistema de polimerización (Maccioni y Seeds, 1982).

Durante la fase de elongación, existe una agregación rápida de subunidades al núcleo preformado, hasta que se alcanza el estado de equilibrio, caracterizado porque el microtúbulo no sigue creciendo, ya que al mismo tiempo que se van adicionando moléculas a la estructura, se van desensamblando otras constantemente, y así se establece el equilibrio dinámico (Weisenberg *et al.*, 1986).

Por otra parte, como se mencionó anteriormente, se sabe que los dos extremos del microtúbulo difieren en su tasa de crecimiento, encontrándose así un polo de crecimiento rápido o “*plus-end*” y el polo opuesto, que es de crecimiento lento o “*minus-end*” (Borisov *et al.*, 1974; Sauders, 1999). Así, la rápida polimerización que ocurre en un extremo se compensa con la del polo opuesto, manteniendo el tamaño del microtúbulo. La transición de crecimiento a acortamiento, se denominó “catástrofe” y el paso de acortamiento a crecimiento se denominó “rescate”. Estas características explican la capacidad de estos polímeros de irradiarse a distintos lugares de la célula y posicionarse según los requerimientos de ésta. Además, el complejo GTP-tubulina, actúa como señal molecular en el control de la elongación, determinando la coexistencia de ambas poblaciones de microtúbulos.

Se han estudiado otros compuestos que promueven o dificultan el ensamblaje *in vitro*. Entre los promotores se encuentran el glicerol, la sacarosa, el dimetilsulfóxido (DMSO) y el taxol, entre otros. Este último presenta una doble función, ya que a bajas concentraciones facilita la polimerización, pero en altas concentraciones, estabilizan el sistema e impiden la formación de nuevas estructuras (Amos y Lowe, 1999; Nogales *et al.*, 1999).

En la Figura N°1 se muestra un esquema de la estructura de un microtúbulo, su asociación con el GTP y la forma en que se produce el ensamblaje de protofilamentos para formar el microtúbulo.

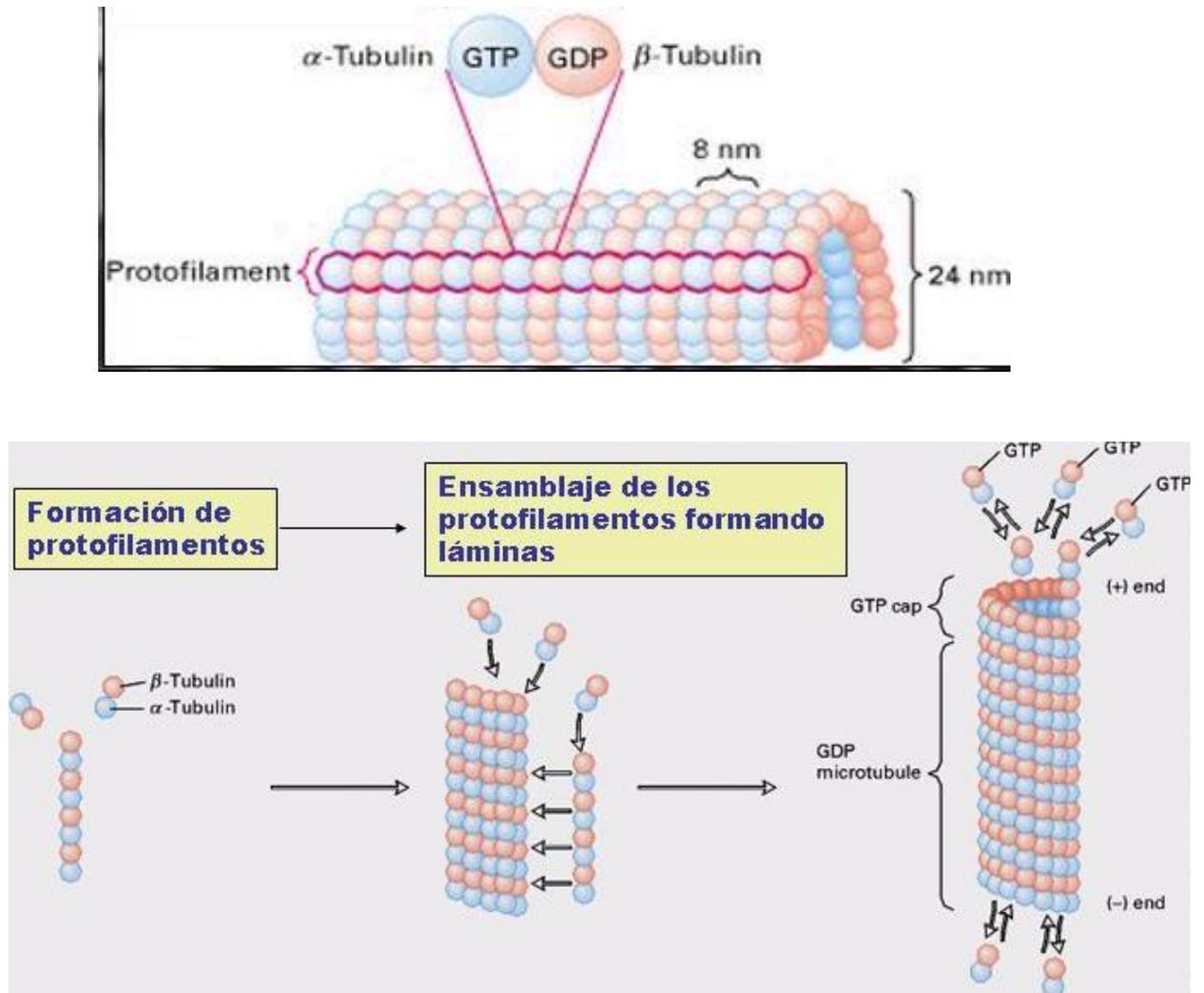


FIGURA N°1. Estructura de un microtúbulo y polimerización (Lodish *et al.*, 2000).

Por otra parte, se han descrito una serie de drogas antimitóticas, que interfieren en este proceso, como son la vincristina, y la vinblastina (Baas y Ahmad, 1993), ambas inhiben la formación de microtúbulos y, por lo tanto, son utilizadas como drogas anticancerígenas (Derry *et al.*, 1998).

Otro caso, es el de la colchicina, un alcaloide aislado de *Colchicum autumnale*, que se usaba, incluso en el antiguo Egipto, para el tratamiento de la gota. Este compuesto

tiene la particularidad de tener un sitio específico de unión a tubulina, que es conocido actualmente, y que bloquea los sitios activos necesarios para que la polimerización ocurra ya que se une específicamente y con gran afinidad a tubulina (Maccioni *et al.*, 1989).

Se conoce que la presencia de cationes bivalentes facilita la formación de microtúbulos, proporcionalmente a la concentración que se incorpore de éstos. El más importante es el Mg^{+2} , que a altas concentraciones estimula la polimerización, ya que se une estrechamente a tubulina, ejerciendo un efecto estabilizador marcado (Laferiere *et al.*, 1997).

Por otra parte, se sabe que el ión calcio (Ca^{+2}) es un importante inhibidor competitivo de los sitios de unión en tubulina, por lo que su presencia en el sistema dificulta el ensamblaje. Es así como existen una serie de compuestos, modificaciones y ligandos que intervienen en este proceso (Serrano *et al.*, 1984; Mejillano *et al.*, 1990)

Además, se ha reconocido la enorme importancia de las interacciones proteína-proteína en controlar una variedad de procesos celulares. En el caso de tubulina, se describe una regulación, a nivel molecular, por la afinidad a un grupo de proteínas, llamadas proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs). La especificidad de las MAPs es clave en la modulación del ensamblaje, dependiendo de su distribución en los diversos tipos de células (Wiche *et al.*, 1991; Maccioni y Cambiazo, 1995). Está demostrado que las MAPs modulan la dinámica microtubular *in vivo* (Dhamodharan y Wadsworth, 1995).

Proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs).

Las MAPs son un grupo diverso de proteínas que copurifican con tubulina, luego de sucesivos ciclos de ensamblaje y desensamblaje dependientes de temperatura. Estas proteínas, se han reunido por compartir la característica común de unirse a tubulina, promoviendo su ensamblaje y dándole estabilidad a los microtúbulos (Maccioni y Cambiazo, 1995). Las MAPs, en la polimerización *in vitro*, disminuyen la frecuencia de catástrofe, produciendo un aumento en la velocidad de elongación del microtúbulo (Pryer *et al.*, 1992). Además, disminuyen la concentración crítica de tubulina para polimerizar (Sandoval y Vandekerckhove, 1981). En las células *in vivo*, la presencia de las MAPs, es

esencial para el ensamblaje de tubulina, estableciéndose una asociación reversible entre ellas y los microtúbulos.

Las MAPs corresponden a una familia de proteínas, las cuáles se pueden clasificar de acuerdo a su peso molecular, según lo descrito por Maccioni y Cambiazo, (1995) en:

1.- De alto peso molecular (HMW-MAPs): principalmente MAP-1A, MAP-1B; MAP-1C cuyo peso molecular es de alrededor de 350kDa. En este grupo, también se encuentran MAP-2A y MAP-2B de aproximadamente 270kDa, MAP3, de distribución neuronal y MAP-4 entre 190-240kDa, aislada, tanto en neuronas, como en otros tejidos (Katsuki *et al.*, 1997).

2.- Polipéptidos de tamaño intermedio: MAP-2C, cuyo peso molecular es de 70kDa, la proteína tau entre 45 a 62kDa del sistema nervioso central, también encontrada en líneas celulares no neuronales y la variante “*heavy tau*” de 110kDa aislada en el sistema nervioso periférico (Maccioni y Cambiazo, 1995).

Un gran número de MAPs han sido descritas, tanto en cultivos celulares de tejidos no neuronales, como en células de una variedad de animales y plantas. La naturaleza de las interacciones que establecen las MAPs sugiere que son proteínas reguladoras, involucradas en el control del ensamblaje del microtúbulo, pero también en la interacción de éste con otras estructuras celulares.

En relación con su distribución, las proteínas MAP-1, MAP-2 y tau son componentes predominantes del tejido nervioso, siendo MAP-4 más ubicua.

Actualmente, se sabe que existen cuatro dominios regulatorios en la región carboxilo terminal de las distintas isoformas de α y β -tubulina, sitio donde se unen la mayoría de las MAPs (Cross *et al.*, 1994).

A nivel celular el ensamblaje de los microtúbulos es modulado por la interacción específica de las diferentes MAPs con este importante dominio regulatorio (Maccioni *et al.*, 1989).

Por su parte, las MAPs son moléculas asimétricas que contienen un dominio de unión catiónico, específico para tubulina y tienen un dominio de proyección hacia el extremo amino terminal, que sería el responsable de su conexión con otras estructuras celulares y con la membrana celular (Valle, 1980; Rivas Berríos *et al.*, 1990).

Se describe que la posición que toman las MAPs al asociarse al microtúbulo, forma una especie de “decorado” sobre éste, aludiendo a la unión de las MAPs a la superficie del microtúbulo.

La asociación de las MAPs a la tubulina parece estar mediada por la interacción de los dominios con carga neta positiva presentes en las MAPs, y los sitios aniónicos de la región acídica o carboxilo terminal en las subunidades de tubulina (Cross *et al.*, 1994).

Se ha descubierto el rol de las MAPs como mediadoras en las interacciones entre microtúbulos y otros componentes del citoesqueleto, función que sería determinante para definir patrones de organización de esta red arquitectónica (Farías *et al.*, 2002). Es así como se describe que participan en la formación de puentes moleculares que unen a los microtúbulos con filamentos de actina (Maccioni *et al.*, 1992) y con los filamentos intermedios (Capote y Maccioni, 1998).

En relación a los posibles factores de regulación de la función de estas proteínas, se sabe que todas las MAPs descritas hasta hoy son proteínas fosforiladas y que su estado de fosforilación, *in vitro*, modifica su función (Maccioni y Cambiazo, 1995; González *et al.*, 1998).

Se conocen numerosas enfermedades de tipo neurodegenerativo, como la Enfermedad de Alzheimer, Enfermedad de Pick, la degeneración corticobasal, parálisis supranuclear progresiva y otras del tipo demencia ligada al cromosoma 17, así como el síndrome de Down, que comparten en común la característica de presentar una expresión anormal de la proteína asociada a microtúbulos tau. Ésta se encuentra anormalmente hiperfosforilada y formando agregados proteicos (Goedert *et al.*, 1992; Mandelkow *et al.*, 1993).

Durante los últimos años se ha descrito un gran número de nuevas MAPs, las que se han identificado en varios tejidos neuronales y cultivos celulares (Maccioni y Cambiazo, 1995), y también en una variedad de tejidos animales y plantas.

A través de diversas investigaciones, se ha reconocido que las MAPs se encuentran diferencialmente distribuidas en los tejidos. Esto indicaría cierta especificidad relacionada a la célula o al tejido y por lo tanto, para distintas funciones podrían requerirse distintas MAPs (Correas *et al.*, 1990; Henríquez *et al.*, 1995).

A continuación se muestra una tabla con las principales MAPs y sus características (Tabla N°1).

PROTEÍNA	ISOFORMAS	PESO MOLECULAR (kDa)	TEJIDO DE ORIGEN	SITIOS DE UNIÓN A TUBULINA
MAP-2	2A – 2B 2C	270 70	Sistema nervioso central	3 a 4 sitios de repeticiones aminoacídicas hacia el carboxilo terminal
TAU	3 -- 5	45 - 62	SNC y otros tipos celulares	3 a 4 sitios de repeticiones aminoacídicas hacia el carboxilo terminal
MAP-4		100 - 240	ubiquitaria	
MAP1(A, B, C) cadenas ligeras		350 34, 28, 18	SNC y otros tipos celulares	21 repeticiones de cuatro aminoácidos básicos

TABLA N°1. Proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) (Maccioni y Cambiazo, 1995).

La proteína Tau.

La heterogénea familia de proteínas denominadas tau corresponde a un grupo de especies moleculares, que derivan de un mismo gen y que varían en su procesamiento y expresión por el fenómeno de *splicing* alternativo (empalme). Es así, como se describen distintas isoformas de tau (de 3 a 6) en las distintas especies animales y éstas varían según la etapa de desarrollo del individuo y el grado de fosforilación que presenta la proteína (Cross *et al.*, 1993; Sobrido *et al.*, 2003).

En la Figura N°2 se muestra el gen de tau con sus exones y las distintas isoformas a las que da origen.

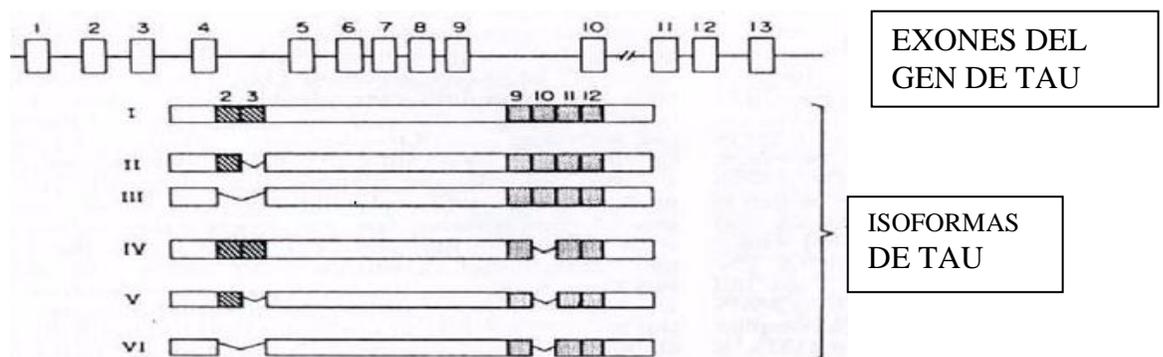


FIGURA N°2: Gen de tau. Representación esquemática del gen de la proteína tau e isoformas que se expresan (Maccioni y Cambiazo, 1995).

De esta manera, en el humano adulto se diferencian 6 isoformas, mientras que en estado fetal sólo aparecen 3 (Bueé *et al.*, 2000). En el caso del bovino, se describen 5 isoformas en el animal adulto (Takuma *et al.*, 2003).

Estudios biofísicos, basados en diferenciar inmunológicamente a los distintos péptidos obtenidos por la degradación de tau, evidencian la existencia de motivos de unión a tubulina (de 18 aminoácidos) que se repiten de 3 a 4 veces en la molécula y se encuentran

altamente conservados entre las diferentes isoformas de tau (Farías *et al.*, 1992; Goode *et al.*, 2000). Estos sitios de unión específicos para tubulina serían los responsables de la afinidad con esta proteína, además, se le atribuye a tau un rol en las modificaciones postraduccionales que sufre tubulina, en los distintos grupos de microtúbulos (Kanai *et al.*, 1989).

Las isoformas que tienen tres secuencias repetitivas se expresan, preferentemente, en cerebros humanos fetales, mientras que en el cerebro adulto, se expresan isoformas, tanto de 3, como de 4 secuencias repetidas (Goedert y Jack, 1990; Kar *et al.*, 2003). La presencia de cuatro secuencias repetitivas en la tau de neuronas maduras, al parecer se correlaciona con la necesidad de estabilizar microtúbulos, ya que las isoformas de tau que contienen sólo 3 repeticiones, presentan una estabilidad menor a la requerida para el desarrollo de las neuritas (Lewis *et al.*, 1989; Goode *et al.*, 2000).

Estructuralmente, la tau es una proteína asimétrica, termoestable y con un peso molecular entre 45 y 65kDa. Esta proteína cuya forma es elongada, posee una longitud de 50nm y su dominio de proyección (asociado al microtúbulo) mide 20nm. Sólo esta parte de la molécula participa en la estabilización microtubular, mientras que otros dominios de la proteína estarían unidos a regiones discretas del microtúbulo (Lewis *et al.*, 1988)). Algunos cambios puntuales en la secuencia, además de su grado de fosforilación, definen la naturaleza de las distintas isoformas de tau (Bueé *et al.*, 2000). Según el grado de fosforilación, se afecta la capacidad de tau de unirse a microtúbulos (Lindwall y Cole, 1984).

Las distintas isoformas comparten determinadas secuencias peptídicas que le dan sus características, siendo tau una proteína clave en la mantención de una determinada estructura y polaridad en la neurona diferenciada y en la formación de los conos de crecimiento que dan origen a las neuronas (Li y Black, 1996).

La función primordial de tau sería estabilizar microtúbulos, además de su papel en la neuritogénesis (Baksalerska y Nievadomska, 2002).

Se reconocen otros sitios de importancia en tau por su capacidad de unirse a microfilamentos y otros componentes celulares, favoreciendo la estabilidad del sistema (Moraga *et al.*, 1993; Farías *et al.*, 2002), por lo que tau es una proteína de importancia regulatoria, que ejercería su acción moduladora a nivel de las interacciones entre los diferentes elementos que forman la red tridimensional del citoesqueleto (Maccioni y Cambiazo, 1995; Capote y Maccioni, 1998).

Por otra parte, se ha logrado determinar, que dentro de las MAPs, la proteína tau se encuentra, ampliamente, distribuida en una serie de tipos celulares, además de la neurona (Cross *et al.*, 1993), donde existe una evidente compartimentalización; de esta manera, la tau es un componente, preferentemente, axonal mientras que, por ejemplo, la MAP-2 está presente en las dendritas. Además, en las células, los sitios de unión de los microtúbulos para cada MAPs están conservados de acuerdo a la existencia de estas proteínas en cada célula en particular (Lewis *et al.*, 1989). Es así como, se ha determinado, que tanto tau, como MAP-2, poseen determinantes antigénicas comunes en su región de unión a tubulina y actina (Correas *et al.*, 1990; Chau *et al.*, 1998; Farías *et al.*, 2002).

Tanto tau, como MAP-2 copurifican luego de termoprecipitar tubulina. Para poder separarlas, se puede utilizar cromatografía de exclusión molecular. También, se puede aprovechar la característica de tau de resistir a pH ácido cercano a 2,5 unidades, con lo que se logra precipitar los componentes no resistentes (incluida MAP-2), quedando la tau soluble.

Tau es un inhibidor competitivo para la unión de otras MAPs al microtúbulo (Farías *et al.*, 1992; Tokuraku *et al.*, 1999).

La proteína MAP-2.

Es una proteína de alto peso molecular (270kDa), que también cosedimenta con tubulina en sucesivos ciclos de ensamblaje y desensamblaje. Es conocido que MAP-2 promueve la polimerización de microtúbulos *in vivo* (Ainsztein y Purich, 1994). Además, electroforéticamente es más homogénea que tau, observándose una o dos bandas de alto peso molecular.

La MAP-2 es una proteína altamente sensible a la proteólisis, su digestión limitada con tripsina o quimiotripsina, genera un fragmento de proyección de 253kDa que se libera y, un pequeño fragmento de alrededor de 35kDa, que se mantiene unido al microtúbulo y que contiene los dominios que promueven el ensamblaje de tubulina (Valle, 1980; Ainsztein y Purich, 1994).

Estudios de secuenciación de MAP-2 han demostrado, que al igual que la tau, sus isoformas resultan del *splicing* alternativo. La expresión de las diferentes MAP-2 es regulada por patrones del desarrollo, ya que los cambios estructurales de las distintas isoformas parecen estar asociadas a los fenómenos que se suceden en el desarrollo del individuo. Más recientemente, se descubrió que MAP-2 tiene en su estructura 3 a 4 repeticiones de los motivos de unión a tubulina, que se evidencian en el adulto (Doll *et al.*, 1993; Felgner *et al.*, 1997).

Estructuralmente, al microscopio electrónico, los microtúbulos ensamblados en presencia de MAP-2, muestran espaciamientos de 100nm de distancia entre cada uno, distancia que coincide con el largo del dominio de proyección de MAP-2 y que también es coincidente con el tamaño de los puentes que interconectan distintos microtúbulos en las dendritas (Goedert y Jakes, 1990).

También hay evidencias que MAP-2 interactuaría con los filamentos de actina y los neurofilamentos (filamentos intermedios) del citoesqueleto (Pollard *et al.*, 1994). Además, modularía *in vivo* las interacciones entre estos filamentos en cultivos celulares (Henríquez *et al.*, 1995).

Si bien se ha observado que existen zonas de alta homología entre el motivo de unión de tau y el de MAP-2 a tubulina (Lewis *et al.*, 1988), en el dominio de proyección difieren enormemente, ya que el de MAP-2 es más extenso (Figura N°3), y regularía diferentes eventos del desarrollo en la morfogénesis neuronal (Shea y Beermann, 1994).

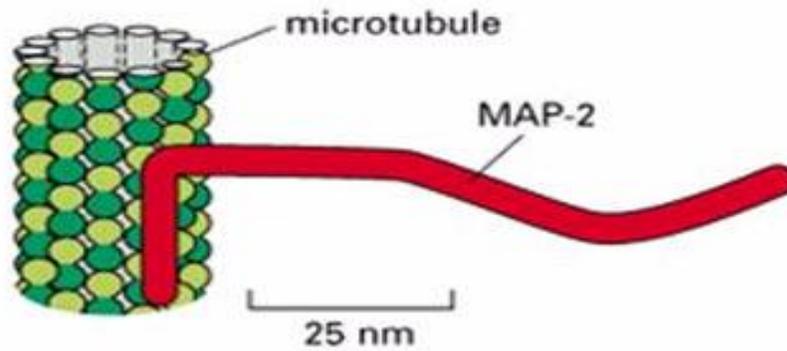


FIGURA N°3. Estructura de MAP-2. (Alberts *et al.*, 1994).

La MAP-2 se encuentra, preferentemente, localizada a nivel de las dendritas neuronales y participa en la regulación del crecimiento de éstas. Las localizaciones no neuronales de péptidos que parecieran ser MAP-2 (inmunológica y genéticamente) incluyen: músculo esquelético, glándulas adrenales (Kotani *et al.*, 1986), células cromafines de la médula adrenal, entre otras (Wiche *et al.*, 1991).

Por otra parte, se ha demostrado la capacidad de MAP-2 de establecer conexiones entre polímeros del citoesqueleto (Ozer y Halpain, 2000).

Desde el punto de vista funcional MAP-2 tiene una mayor afinidad a tubulina que tau, así estequiométricamente se requieren menos moles de MAP-2 que de tau para el ensamblaje. Además, ambas parecen tener un sitio común en la región de unión a tubulina (Lewis *et al.*, 1988; Farías *et al.*, 2002).

Microfilamentos y Actina.

Todas las células eucarióticas contienen actina. Esta proteína del citoesqueleto es la más abundante en muchas células eucariontes, constituyendo el 5% o más del total de proteína celular (Alberts *et al.*, 1994).

El músculo esquelético de los vertebrados es la principal fuente de actina para realizar experimentos *in vitro*, ya que alrededor del 20% de su masa es actina (Dos

Remedios *et al.*, 2003) y, al igual que tubulina, es una proteína altamente conservada a través de la evolución (Laferiere *et al.*, 1997).

La actina es una proteína compuesta por subunidades globulares, cada una de las cuales es un polipéptido único de 42kDa y 375 aminoácidos, conocido como actina G. Cada molécula se une estrechamente con Ca^{+2} que estabiliza su conformación globular, y también se une no covalentemente a una molécula de ATP (Adenosine trifosfato), la cual se une fuertemente al polipéptido (Pollard, 1984).

La polimerización de unidades de actina G, origina filamentos que corresponden a la actina F. Estos filamentos pueden dar tanto estabilidad, como flexibilidad a las estructuras formadas (Carlier *et al.*, 1999). Es así como los filamentos estables forman el corazón de las microvellosidades y son componentes cruciales del sistema de contracción en células musculares. Además de su conocida función en el tejido muscular, la actina es un componente del citoesqueleto celular, siendo particularmente importante en la formación del huso mitótico durante la mitosis, así como también, muchos de los movimientos celulares dependen de la flexibilidad de los filamentos de actina. Por otra parte, se ha descrito que actina junto con miosina podrían ser necesarias en algunos movimientos dependientes de microtúbulos, como el transporte axonal rápido (Li y Black, 1996; Pollard y Borisy, 2003).

Dentro de sus funciones, la actina contribuiría también en la mantención de la forma celular, formando una matriz para la organización de otros constituyentes celulares (Porter, 1984; Weber y Osborn, 1985; Al-Bassaam *et al.*, 2002).

Estructuralmente, los filamentos de actina tienen un diámetro de 8nm y se disponen en una compacta hélice de dos filamentos antiparalelos entrelazados, formados por subunidades de actina G (Figura N°4) (Alberts *et al.*, 1994).



FIGURA N°4. Estructura de actina (Alberts *et al.*, 1994).

Al igual que la tubulina, esta proteína tiene características polares y está en un continuo estado de ensamblaje y desensamblaje, requiriendo de una concentración crítica mínima para iniciar su polimerización (Moraga *et al.*, 1993; Dos Remedios *et al.*, 2003).

Además, se conocen distintas drogas que promueven el ensamblaje de los filamentos de actina, como la phalloidina, que es un derivado del hongo *Amanita phalloides* que estabiliza la conformación de actina polimerizada, uniéndose a ella. Por otro lado, la Cytochalasina B, es una droga aislada de un hongo llamado *Helminthosporium dematiideum*, inhibe la adición de monómeros al microfilamento (Cooper, 1987).

Algunos eucariontes inferiores, como la levadura, tienen sólo un gen de actina que se traduce en una sola proteína. Sin embargo, todos los eucariontes superiores poseen varias isoformas originadas de una familia de genes de actina. Al menos seis tipos de actina han sido encontrados en tejidos de mamíferos, los cuáles genéticamente presentan una alta homología, lo que permite que, sea cual sea la fuente de origen, logren formar microfilamentos *in vitro* (Little *et al.*, 1986).

Sin embargo, en las células procariontes, se han descrito proteínas similares a la actina que parecen compartir un ancestro común en la evolución (Dos Remedios *et al.*, 2003).

La longitud total de todos los filamentos de actina en una célula es, al menos, treinta veces mayor que la longitud total de los microtúbulos, lo que refleja una diferencia fundamental en el modo que estos dos polímeros del citoesqueleto se organizan y funcionan en la célula. Los filamentos de actina son más delgados, usualmente más cortos y unas 300 veces menos rígidos que los microtúbulos (Mitchison, 1993). Pocas veces es posible observar filamentos de actina aislados en la célula, sin embargo, es frecuente encontrarlos,

formando redes o como puentes y conexiones entre estructuras, ya que en esta conformación logran mayor estabilidad (Selden y Pollard, 1986).

La polimerización de actina pura *in vitro*, requiere del nucleótido ATP y también de cationes monovalentes y bivalentes, que usualmente son K^+ y Mg^{+2} (Estes *et al.*, 1992). Cuando estos cationes se agregan a actina G, y se adiciona ATP, se inicia una fase de latencia o nucleación de filamentos de actina (actina F) dependiente de una concentración crítica, luego viene una fase de polimerización rápida, en la cual los cortos filamentos comienzan a elongarse, para llegar a una fase final en que se logra un equilibrio dinámico, pues en ambos extremos del filamento existe una tasa de polimerización distinta y, a la vez, está ocurriendo desensamblaje de estructuras (Pollard, 1984; Cooper, 1992).

Luego de polimerizar, rápidamente el fosfato terminal del ATP que estaba unido al monómero, se hidroliza, dejando al ADP atrapado en el polímero. La hidrólisis de ATP en el ensamblaje de actina, es similar a lo que ocurre con la hidrólisis de GTP en los microtúbulos, de modo que la liberación del enlace de fosfato confiere al polímero una conformación más estable. Es importante considerar, que tanto actina como tubulina involucran en su ensamblaje a un nucleótido por la misma razón fundamental, es decir, permitir la polimerización y depolimerización rápida de las estructuras como se muestra en la siguiente Figura N°5 (Desai y Mitchison, 1997; Carlier *et al.*, 1999).

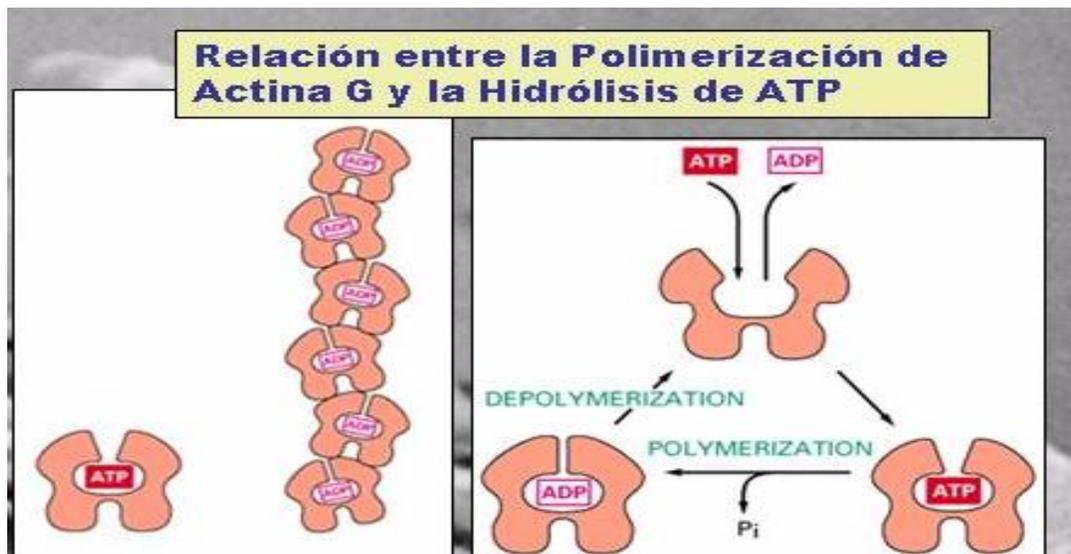


FIGURA N°5. Relación Actina- ATP (Alberts *et al.*, 1994).

A pesar que actina y tubulina están lejos de relacionarse en su estructura aminoacídica, es interesante que hallan evolucionado convergentemente hacia la utilización de la hidrólisis de un nucleótido, para estabilizar estos sistemas. De esto, se deduce la importante función de microtúbulos y microfilamentos en el dinámico ensamblaje y desensamblaje de estos polímeros, sobre los cuales se basa la organización citoplasmática (Shaefer y Cooper, 1995).

Existen indicios que muestran, que actina y tubulina se relacionan con otros componentes del citoesqueleto y con muchas otras proteínas asociadas, que participan y regulan las distintas funciones celulares (Pollard *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2000).

Se demostró *in vitro*, que se establecían asociaciones entre redes de microfilamentos ensamblados y microtúbulos ensamblados en presencia de tau, observándose que esta MAP, actuaría como conexión entre ambos polímeros (Moraga *et al.*, 1993). Además, se cree que tau podría formar oligómeros y de esta manera ser un puente de unión entre las distintas estructuras del citoesqueleto (Selden y Pollard, 1986; Farías *et al.*, 2002).

Con respecto a su relación con las MAPs, se han encontrado evidencias que demuestran la función reguladora de tau en el ensamblaje de actina y tubulina (Cross *et al.*, 1993). También, se ha documentado la inhibición competitiva que produce actina en

relación a la unión tau-tubulina y la inhibición que ejerce la tubulina en la interacción tau-actina y la aparente diferencia en la afinidad de tau con ambas proteínas (Farías *et al.*, 2002).

La comprensión de la naturaleza molecular de estas estructuras es esencial para dilucidar su mecanismo de formación, así como también, la forma anómala en que ocurre este proceso cuando se evidencian patologías como la Enfermedad de Alzheimer, caracterizada por la formación de placas neuríticas denominadas nudos neurofibrilares (*tangles*) y por una disminución de marcadores colinérgicos en la corteza. De esta forma, Grundke-Iqbal *et al.*, (1986) establecieron que la tau era un componente fundamental de los filamentos pareados helicoidales (PHF) característicos de la Enfermedad de Alzheimer (E.A.) y que además la tau se encontraba fosforilada en un alto grado (Bancher *et al.*, 1991).

Por otra parte, en distintas neoplasias se observa la desregulación de las células en su división, lo que conlleva a alteraciones del citoesqueleto. De ahí, la importancia de desarrollar drogas antimitóticas efectivas, que involucren directa o indirectamente a las proteínas que lo forman y a conocer, específicamente, cuáles son sus interacciones y que condiciones o que componentes los pueden regular en relación a su función normal.

Además, se ha descrito la presencia de hiperfosforilaciones de tau, en las denominadas taupatías y en otras enfermedades descritas en el humano, como el síndrome de Down, la enfermedad de Pick, la parálisis supranuclear progresiva, la degeneración córticobasal (en la que tau, se deposita también en la glia), el síndrome de demencia ligado al cromosoma 17 (Sobrido *et al.*, 2003), y también la Enfermedad de Alzheimer (Velásquez *et al.*, 2002). En esta última, histopatológicamente se describen las denominadas “placas seniles”, que son agregados de un péptido, β -amiloide y que son muy similares a los agregados proteicos observados en las otras enfermedades del sistema nervioso central, producidos por proteínas priónicas (PrP^{sc}), que afectan a las distintas especies domésticas, incluyendo al humano. Estas patologías y la E.A. presentan ciertas similitudes y además, cierto grado de reactividad cruzada (Bueé *et al.*, 2000; Kovacs *et al.*, 2002).

En el caso del Síndrome de Gerstmann- Straussler- Scheinker, una prionopatía de origen hereditario, existen puntos específicos de mutación en el genoma, que determinan la

presencia de la proteína priónica (PrP^{sc}) y una capacidad reducida de tau para promover la formación de microtúbulos, ya que esta MAPs se encuentra, anormalmente, hiperfosforilada. Este hecho, ocasiona agregados de esta proteína en la célula nerviosa. El daño neuronal, se verifica por una desestabilización del sistema filamentoso del citoesqueleto (Brown, 2000; Kovacs *et al.*, 2002).

De acuerdo a lo descrito anteriormente, es importante ahondar en los mecanismos normales de regulación del citoesqueleto, así como también, el de sus componentes, para conocer de mejor forma los factores que influyen en su comportamiento. De este modo, se pueden determinar los componentes específicos y sus mecanismos cuando se presenta la patología. En este contexto, esta memoria de título apunta a reproducir este complejo sistema de macromoléculas *in vitro*, tratando de establecer las condiciones ideales para obtener polímeros a partir de proteínas puras, y luego determinar su comportamiento y las relaciones que se establecen entre los distintos componentes del citoesqueleto.

3. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

Contribuir al conocimiento y comprensión de la estructura, dinámica y organización intracelular de las proteínas que interactúan en el ensamblaje supramolecular del citoesqueleto.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 1.-Obtener y caracterizar algunas proteínas del citoesqueleto, como tubulina, actina, tau y MAP-2, purificadas a partir de cerebros de bovino y de músculo de ave.
- 2.-Evaluar el comportamiento de la cinética de polimerización de tubulina con las MAPs en la formación de microtúbulos.
- 3.-Evaluar el comportamiento de polimerización de actina con las MAPs en la formación de los microfilamentos.
- 4.-Observar las interrelaciones macromoleculares inducidas y mediadas por las MAPs en la polimerización *in vitro* de los componentes del citoesqueleto a través de microscopía electrónica.

4. MATERIAL Y MÉTODOS.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Celular y Molecular del Instituto Milenio de Estudios Avanzados (CBB), pertenecientes a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Los estudios en microscopía electrónica, se realizaron en la Unidad de Histología de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

Obtención de proteína microtubular.

La proteína microtubular se obtuvo a partir de cerebros frescos de bovino (250-350g de peso), obtenidos en la Planta Procesadora de Carnes SOFACAR SA. de la Región Metropolitana. A través de este método se pueden obtener preparaciones masivas de proteína microtubular.

Los cerebros de animales recién sacrificados, fueron transportados en recipientes con hielo hasta el laboratorio, donde se limpiaron de meninges, vasos sanguíneos y sangre superficial. Luego se pesaron y procesaron según el protocolo de ciclos repetitivos de ensamblaje y desensamblaje, dependientes de temperatura (Farías *et al.*, 1992), con algunas modificaciones. De acuerdo a esto, después de conocer su peso, se homogeneizaron a 4°C con un volumen igual a su peso de una solución que contenía: Mes 0,1M (ácido 2-[N-Morfolino]-etanosulfónico), pH6,8 frío; glicerol 1M; inhibidores de proteasas: aprotinina, leupeptina, pepstatina en concentración final de 2µg/ml y PMSF (fluoruro de metilfenilsulfonilo) 0,1mM. El homogeneizado se centrifugó (ultracentrífuga Sorvall modelo Ultra-Pro 80) a 42.000xg por 30min a 4°C. Al sobrenadante obtenido luego de la centrifugación, se le agregaron los siguientes componentes, en las concentraciones finales que se indican: GTP 1mM (5'-trifosfato de guanosina); EGTA 0,5mM (ácido etilenglicol-bis (β-aminoetileter N,N,N',N'- tetraacético), MgCl₂ 1mM (cloruro de magnesio) y glicerol 2,5M. Todo esto se incubó por 1h a 37°C, con agitación constante. Los microtúbulos formados, fueron colectados por centrifugación a 42.000xg durante 30min a 30°C. En esta etapa, se descartó el sobrenadante y se recuperó la fracción sedimentada o pella, que contenía los microtúbulos. El desensamblaje de los microtúbulos colectados, se realizó,

resuspendiendo la pella obtenida en Mes 0,1M pH6,8, que contenía EGTA 0,5mM y MgCl₂ 1,5mM y luego se homogeneizó a 4°C (homogeneizador Dounce). Esta solución se incubó 15min a 4°C, para luego ser centrifugada a 42.000xg por 30min a 4°C. El sobrenadante obtenido se ajustó a concentraciones finales de GTP 1mM y glicerol 4M, posteriormente se sometió a una nueva polimerización, incubando por 1h a 37°C y sedimentando los microtúbulos formados por centrifugación a 42.000xg por 30min a 30°C. Las pellas obtenidas de este segundo ciclo de polimerización-depolimerización fueron congeladas en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C, congeladas en nitrógeno líquido hasta su posterior uso. En estas condiciones, la proteína microtubular mantiene su actividad por varios meses.

Tubulina.

Las pellas de proteína microtubular de segundo ciclo, se descongelaron antes de ser utilizadas y se resuspendieron en una solución que contenía Mes 20mM pH6,8, EGTA 0,5mM, MgCl₂ 0,5mM y Ditioneitol (DTT) 1,0mM. Esta suspensión contenía en un alto porcentaje tubulina, además de las MAPs y otros contaminantes. Para separar tubulina de los otros componentes, se realizó cromatografía de afinidad en una columna de fosfocelulosa (1,5 x 15cm) a 4°C.

La tubulina se eluyó con la misma solución anterior y se colectaron alícuotas de 1ml, ajustando la velocidad de elusión a 0,2ml por min. Luego, a cada una de las fracciones eludías, se le determinó la concentración de proteína, por medio del método Bradford (Bradford, 1976) y posterior lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 595nm (Vera, 1988). Finalmente, se seleccionaron las fracciones con mayor concentración de proteína y se verificó su pureza a través de una electroforesis en geles de poliacrilamida (12%) a-SDS (Laemmli, 1970).

Tau.

La tau se aisló y purificó a partir de proteína microtubular de segundo ciclo, según protocolo de Grundke-Iqbal *et al.*, (1986) con algunas modificaciones. Las pellas de segundo ciclo se descongelaron y se resuspendieron en tres volúmenes de Mes 0,1M pH2,7 a 4°C (Lindwall y Cole, 1984) y se incubaron a esa temperatura por 15min. Luego se

homogeneizaron y la suspensión se sometió a baño María por 5min a 100°C, con lo cual se precipita la tubulina y otros contaminantes que son termolábiles.

Por las características de la tau de ser termorresistente y mantenerse activa a pH ácido, se centrifugó a 42.000xg por 30min a 4°C, y a la fracción sobrenadante se le agregó ácido perclórico hasta obtener una concentración final de 2,5%, para denaturar las otras MAPs y otros contaminantes que resisten los 100°C, de manera tal que la tau permanece pura y soluble. Así se recuperó el sobrenadante, luego de una centrifugación a 42.000xg por 30min a 4°C, el cual fue dializado contra tampón Tris-HCl 2,5mM pH7,6 (Tris-(hidroximetil)-aminometano), para neutralizar el pH ácido y llevar a tau a condiciones de uso. La diálisis se realizó en membranas de celulosa de poro conocido (12kDa de tamaño) a 4°C y en agitación por 24h, con tres cambios de tampón. Luego la solución obtenida se concentró mediante un sistema de *ultrafiltration cell* (Amicon® modelos 8050 y 8003), utilizando membranas de 30kDa de tamaño. Se midió la concentración de proteínas por el método de Bradford y se verificó su pureza por medio de geles de poliacrilamida (12%)-SDS.

MAP-2.

Ésta fue aislada de acuerdo al método descrito por Vera *et al.*, (1988), a partir de proteína microtubular de segundo ciclo la cual se resuspendió en Mes 50mM pH6,8, se sometió a baño María a 100°C por 5min, se centrifugó y el sobrenadante fue sometido a fraccionamiento con sulfato de amonio 50%, en agitación constante por 1h a 4°C. Finalmente fue purificada a través de una cromatografía en columna de Sepharosa CL-4B (1 x 80cm).

Las proteínas fueron eluidas con Mes 50mM, pH6,8, con NaCl 0,5M, que da la fuerza iónica necesaria para separar las proteínas. Posteriormente, se determinó la concentración por el método de Bradford y se confirmó la presencia de MAP-2 por geles de poliacrilamida (10%) -SDS de las fracciones más concentradas del eluido.

Actina.

La purificación de actina se realizó a partir de músculo esquelético de pollo, siguiendo el método descrito por Pardee y Spudich, (1982) obteniéndose así actina G (globular) pura que se conservó a 4°C en una solución con Tris-HCl 2mM, pH8,0, ATP (Adenosin trifosfato) 0,2mM, CaCl₂ (Cloruro de Calcio) 0,2mM, DTT 0,5mM y azida de sodio 0,02%.

Primero, se preparó el macerado muscular, a partir de músculo esquelético de un pollo colocado en hielo inmediatamente luego de ser sacrificado. Se obtuvieron los músculos pectorales, que se pesaron, trozaron y luego se maceraron en una moledora de carne.

Con el macerado de músculo de pollo se preparó el “polvo de acetona” de la siguiente forma:

Extracción con KCl (Cloruro de potasio): el macerado (200g) se incubó por 10min con agitación constante, con 1L de una solución de extracción compuesta por 0,1M de KCl, 0,15M de bifosfato de potasio (KH₂PO₄), preparada con agua destilada preenfriada a 4°C.

Filtración: el macerado obtenido se filtró por gravedad en gasa estéril colocada sobre un embudo, se descartó la solución filtrada y el macerado retenido es secado, estrujándolo con la gasa.

Extracción con EDTA. el macerado seco retenido en el filtro es extraído con agitación por 10min con 1L de una solución de 1mM de EDTA pH7,0 pre-enfriada, luego el residuo es filtrado como en el paso anterior.

Extracción con agua (H₂O): se realizaron dos ciclos de extracción/filtración sucesivas con 2L de agua. Cada ciclo utiliza 1L de agua destilada preenfriada por 5min, con agitación y posterior filtración.

Extracción con acetona: las últimas secuencias de filtración/extracción se realizaron con 1L de acetona preenfriada a 20°C, en agitación constante.

Secado, el residuo filtrado fue extendido sobre gasa estéril y se colocó sobre un mesón, cubierto con papel secante, dejándolo secar a temperatura ambiente durante la noche (12h).

El “polvo de acetona” resultante se pesó, luego se molió en un mortero y finalmente se guardó a -20° C en un recipiente herméticamente aislado. De este modo se puede conservar por meses.

Para continuar la purificación de actina, se tomaron 5g de polvo de acetona para obtener al menos 50mg de actina-G. El procedimiento de purificación consta de extracción con el tampón depolimerizante de actina (2mM de Tris-HCl, 0,2mM de ATP, 0,5mM de β -mercaptoetanol, 0,2mM de CaCl₂ y 0,005% de azida de sodio, pH8,0 final). Luego se realizaron filtraciones y centrifugaciones para obtener actina soluble, posteriormente se polimerizó, se removió la tropomiosina y otros componentes para obtener finalmente actina- G pura y soluble. Finalmente se dializó contra 2L del tampón depolimerizante, se midió la concentración por el método de Bradford, previamente verificada su pureza, a través de una electroforesis en gel de poliacrilamida (12%) -SDS (Laemli, 1970). Se guardó a -80°C, previa congelación con nitrógeno líquido y en presencia de 25% de glicerol (v/v).

Concentración de proteínas.

La concentración de las proteínas purificadas en los distintos procesos, se determinó por el método descrito por Vera, (1988) usando el reactivo de Bradford y comparándola con una curva estándar realizada con albúmina sérica bovina (BSA). La lectura de las absorbancias obtenidas se realizó en un espectrofotómetro (modelo Cary-50) a una longitud de onda de 595nm.

Caracterización de las proteínas purificadas.

Para caracterizar las proteínas, adecuadamente, se efectuaron electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) con Dodecilsulfato de sodio 0,2% (SDS), según lo describe Laemli, (1970) utilizando para ello, geles de 12 x 15 x 1,5cm y comparándolas con estándares de peso molecular conocido.

El gel espaciador se utilizó con una concentración de acrilamida al 3%, mientras que el gel separador se usó al 12%. Los geles PAGE, se dispusieron en placas en un equipo de electroforesis (*Mini- protean 3* de Bio-Rad®), se cargaron las proteínas en las celdas del gel, los cuales fueron sumergidos en una solución de Tris-HCl 25mM, glicina 375mM y SDS al 10%. Para desarrollar la electroforesis se utilizó una intensidad de corriente de 100 a 140V, obtenidos de una fuente de poder (*Power Pack 200* Bio- Rad®), completándose la electroforesis en alrededor de 2h.

Después de realizadas las respectivas electroforesis, los geles fueron teñidos con una solución que contenía 0,25% de azul brillante de Coomassie (R-250), 50% metanol, 10% ácido acético y mantenidos en agitación por 40min, para posteriormente ser desteñidos con una solución de metanol al 25% y ácido acético al 7% por 20min.

Inmunotransferencias (*Western Blot*).

Las inmunotransferencias se realizaron, siguiendo el protocolo de Burnette, (1981) con algunas modificaciones. Para ello se utilizó una cámara de transferencia húmeda para minigeles (*Trans blot cell*, Bio-Rad®). Para estos experimentos las proteínas purificadas, que fueron separadas mediante electroforesis, fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa en tampón Tris-HCl 25mM, glicina 0,375M, pH8,3 y metanol 20%, con una intensidad de corriente de 0,4A por 1h.

Las membranas de nitrocelulosa que tenían las proteínas transferidas, se bloquearon con leche de vaca descremada, preparada al 5% (p/v) y PBS (tampón fosfato salino) al 1%

pH7,4 y Tween-20 (polyoxyethylene- sorbitan monolaurate) al 0,05%, mantenida con agitación a temperatura ambiente por 1h. De esta forma se bloquearon los sitios activos remanentes inespecíficos de la membrana.

Posteriormente, cada proteína se incubó individualmente por 1h con su anticuerpo monoclonal específico en una dilución 1:1000. Los anticuerpos primarios utilizados corresponden a los monoclonales: anti MAP-2 (Sigma® M-4403), anti tau5 (Sigma® T-6402), anti β -actina (Sigma® A-5316) (hechos en ratón) y el policlonal anti β -tubulina (Santacruz® H-235), hecho en conejo. Luego, se lavó la membrana continuamente con tampón PBS-Tween-20 al 0,05%, haciendo cuatro cambios de la solución de lavado de 5min cada uno, con el propósito de eliminar de la membrana todo aquello que no se unió al anticuerpo.

A continuación se incubó con el segundo anticuerpo, anti-ratón (Calbiochem® 402335) o anti-conejo (Calbiochem® 401353), en una dilución de 1:2000, conjugado con peroxidasa (“HRP”), lo que se mantuvo por 45min en agitación a temperatura ambiente. Se lavó nuevamente la membrana y posteriormente se aplicó el sustrato de la enzima (ECL) sobre ella, lo que generó una reacción de quimioluminiscencia (Perkin Elmer® NEL-104), la cual se reveló, exponiendo la membrana a una placa radiográfica en la oscuridad. Esta se reveló manualmente con las soluciones indicadas de revelado y fijación (Kodak®).

De todos los geles obtenidos en la caracterización de proteínas, se seleccionó y fotografió uno para cada proteína y el mismo procedimiento se realizó para cada una de las inmunotransferencias.

Ensayos de polimerización.

A través de los ensayos de cinética de polimerización, se analizó la capacidad de cada una de las MAPs (tau y MAP-2) de inducir *in vitro* el ensamblaje de microtúbulos o de microfilamentos, a partir de las proteínas purificadas.

La tubulina, en una concentración de 1,8mg/ml, se incubó a 37°C en una solución de Mes 0,1M pH6,8, EGTA 0,5mM y MgCl₂ 1mM, en presencia de GTP 2mM. La actina

G purificada se utilizó a una concentración de 0,3mg/ml en una solución de Mes 0,1M pH6,6, KCl 50mM, MgCl₂ 2mM, en presencia de ATP 1mM incubada a 30°C.

Con respecto a las MAPs en estudio, tau y MAP-2, ambas se utilizaron en una concentración final de 0,3mg/ml.

Los ensayos de cinética se realizaron en presencia o ausencia de una de las proteínas asociadas a microtúbulos, en cubetas de cuarzo con un volumen final de 1ml.

Las cinéticas de ensamblaje se registraron en un espectrofotómetro UV-visible (Modelo Cary-50 cons) con un baño termorregulado incorporado, siguiendo los cambios de absorbancia a una longitud de onda constante de 340nm en el caso de los ensayos con tubulina, y de 232nm en el caso de actina.

Además, se realizaron los controles correspondientes (Farías *et al.*, 1992). Tubulina y actina se incubaron en las condiciones antes descritas, pero en ausencia de tau y/o MAP-2, manteniendo las concentraciones de todos los otros componentes.

Como control se usó proteína microtubular de segundo ciclo de acuerdo con Moraga *et al.*, (1993).

La lectura de las absorbancias fue medida constantemente, a través del programa de cinética incorporado al software, de las cuales se tomaron los puntos necesarios para graficar y comparar las curvas de cinética correspondientes a cada caso. Luego de producirse el ensamblaje de estructuras, se procedió a incubar las soluciones por 10min a 4°C, con el fin de desensamblar los polímeros, registrar su absorbancia y confirmar la reversibilidad del proceso.

Cada uno de los ensayos de cinética con las respectivas proteínas, se realizaron en triplicado y se analizaron a través de las curvas de cinética, utilizando los datos de absorbancia para cada caso. Los resultados expresados consideran los promedios y la desviación estándar correspondientes a los puntos cuantificados.

Microscopía Electrónica de transmisión (MET).

Con el propósito de visualizar las estructuras formadas en las cinéticas de polimerización, se tomaron alícuotas de 20µl de la solución de polimerización a diferentes tiempos 0, 6 y 12min para describir las distintas fases que se suceden en el ensamblaje de estas estructuras, así como también luego de ocurrido el desensamblaje al incubar en frío a 4°C.

Para observar las interacciones macromoleculares mediadas por las MAPs (tau, MAP-2), se incubaron simultáneamente microtúbulos y microfilamentos preformados, a los cuáles se les agregó tau o MAP-2 en una concentración de 0,3µg/µl. Estas soluciones fueron incubadas a 38°C por 1h.

Las alícuotas de cada una de las muestras, fueron fijadas para microscopía electrónica en una solución de 80µl, que contenía: glutaraldehído 1%, tampón Mes 50mM, pH6,8, EGTA 1mM, MgCl₂ 1mM, GTP o ATP 1mM y glicerol 10%, la cual fue previamente incubada a 30°C (Maccioni y Mellado, 1981).

Las muestras fueron procesadas para microscopía electrónica, según lo descrito por Maccioni y Mellado, (1981). Es decir, gotas de esta solución se colocaron sobre grillas de carbón, recubiertas con una película de cobre, y luego se tiñeron con acetato de uranilo al 1%, de esta manera se observaron las estructuras formadas, en un microscopio electrónico (*Philips Tecnai 200*) y se fotografiaron las diferentes estructuras fibrilares a distintos aumentos (Moraga *et al.*, 1993; Farías *et al.*, 2002).

Las estructuras que se visualizaron por microscopía electrónica, se analizaron comparando descriptivamente los polímeros obtenidos por medio de las observaciones y las fotografías de estos a distintas magnificaciones, luego se seleccionaron aquellas que permitieron comprobar las estructuras del citoesqueleto formadas *in vitro*. De estas se seleccionaron las más representativas y que permiten apreciar de mejor forma las diferentes etapas estudiadas.

5. RESULTADOS.

Purificación y caracterización de las proteínas en estudio.

Las proteínas obtenidas de acuerdo a los métodos antes mencionados (tubulina, tau, MAP-2 y actina), tenían entre un 90% - 98% de pureza.

Tubulina.

En el proceso de purificación de esta proteína, luego de realizarse dos ciclos de polimerización y depolimerización, se requirió de cromatografía en columna. Fue aplicada a una columna de fosfocelulosa (PC), obteniéndose fracciones con el siguiente perfil cromatográfico (Figura N°6).

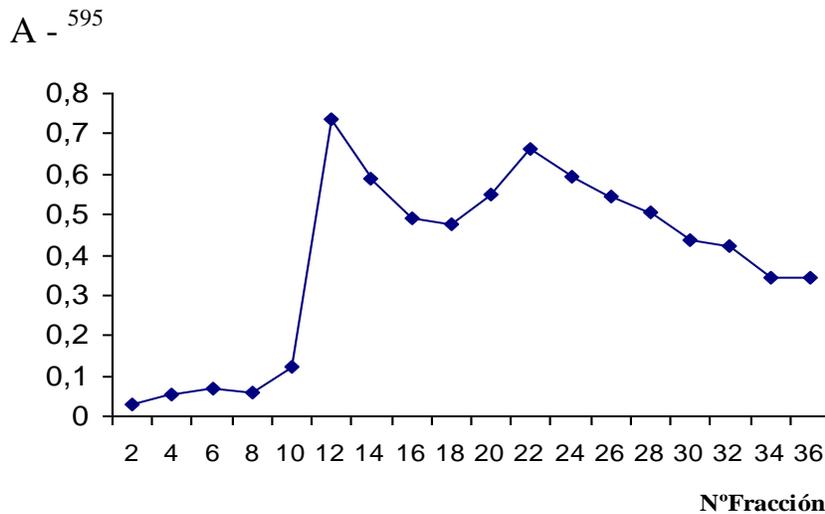


FIGURA N°6. Perfil cromatográfico de tubulina. La proteína microtubular de segundo ciclo fue aplicada a una columna de afinidad con resina de fosfocelulosa (PC), eluyendo fracciones de 1ml, a una velocidad de flujo de 0,2ml/min. La flecha indica la fracción de mayor absorbancia.

Las fracciones de tubulina eludías (2 a la 20) de la columna de PC descritas en la Figura N°6, fueron analizadas en PAGE (12%)-SDS teñido con azul de Coomassie (Figura N°7). A continuación se muestran las fracciones de la 2 a la 20 que contenían

concentraciones crecientes de proteína, de acuerdo a lo que se muestra en el perfil cromatográfico en la Figura N°6.

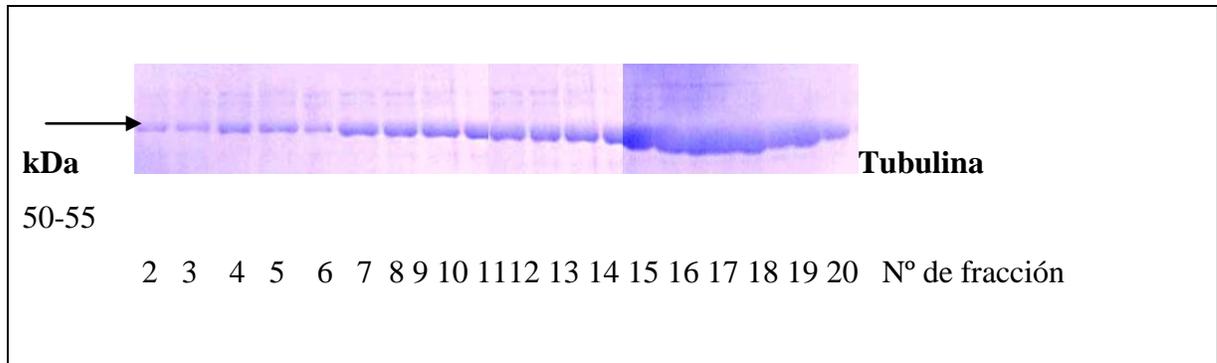


FIGURA N°7. Electroforesis en PAGE-SDS de las fracciones de tubulina, eluídas a través de fosfocelulosa, en un gel al 12% teñido con azul de Coomassie. Cada fracción corresponde a 30µg de proteína por cada ml eluído.

En el caso de tubulina, se apreció que a partir de la fracción N°7, comienzan a detectarse concentraciones cuantificables por el método de Bradford, las cuales van en aumento observándose un pico de concentración de proteína entre las fracciones 14 a 17. Luego, las concentraciones de tubulina por ml eluído descienden, observándose un nuevo pico (menor que el anterior). Posteriormente, se presentan fracciones con alta concentración de proteínas alrededor de la muestra N°25 (Figura N°6), las que descienden gradualmente, hasta llegar a valores despreciables.

Este método se basa en la capacidad de la resina de fosfocelulosa para retener por afinidad de cargas a las MAPs y dejar pasar a tubulina, por la fuerza iónica otorgada por el tampón descrito en material y métodos.

La Figura N°8b muestra la tubulina concentrada, que se analizó en un PAGE (12%)-SDS, comparándola con un estándar de peso molecular conocido (Figura N°8a). Para demostrar que la proteína purificada encontrada en el rango de peso molecular (50-55kDa) era tubulina, se realizó una inmunotransferencia correspondiente (Figura N°8d), que permitió reconocer específicamente a la tubulina. Además, se utilizó un equipo fosfoimager

para visualizar imágenes provenientes de geles y se observó con mayor detalle la proteína como se muestra en la Figura N°8c.

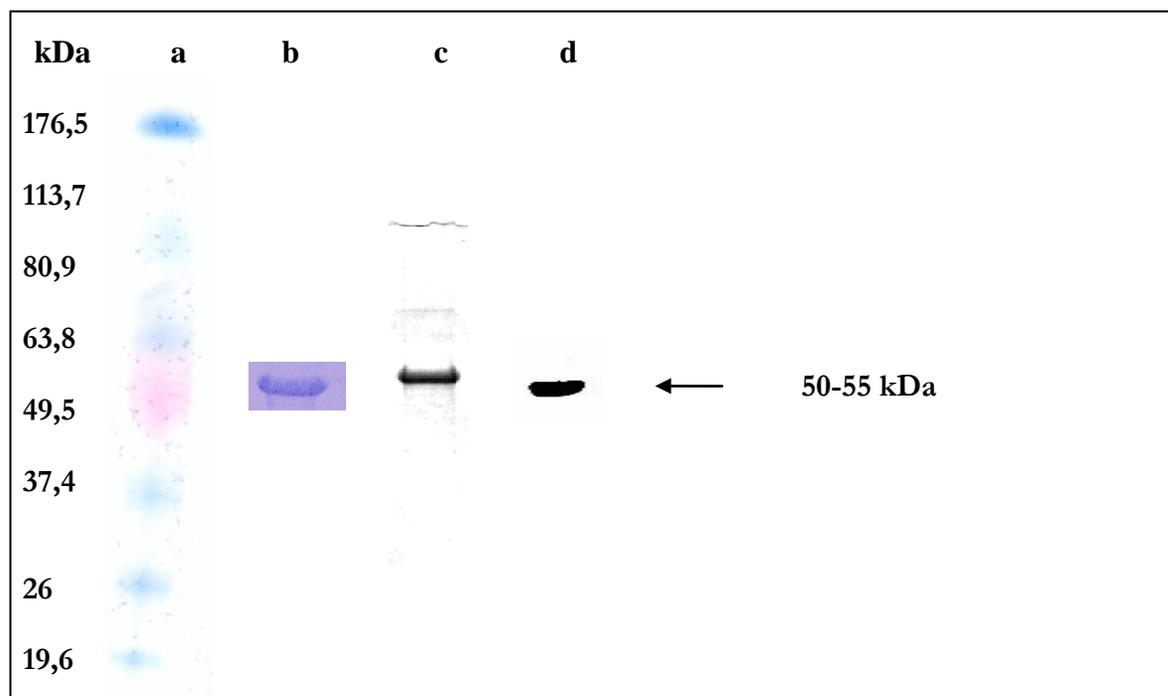


FIGURA N°8. Caracterización de la tubulina purificada. (a) Estándar de Peso Molecular en kDa. (b) Electroforesis en gel de poliacrilamida (12%)-SDS, tubulina (3 μ g), teñido con azul de coomassie. (c) Imagen de PAGE (12%)-SDS tubulina en fosfoimager. (d) Inmunotransferencia de tubulina (1 μ g) utilizando el anticuerpo policlonal anti β - tubulina.

Tau.

La purificación de la proteína tau, se realizó como se describió en material y métodos, de acuerdo a su capacidad de mantenerse activa a alta temperatura y a un pH ácido de 2,5 unidades.

En la Figura N°9b se muestra la tau concentrada, que se caracterizó mediante un PAGE (12%)-SDS teñido con azul de Coomassie. La Figura N°9c, corresponde a una fotografía del PAGE en fosfoimager que permitió individualizar claramente las isoformas de tau. Además, se realizó la inmunotransferencia correspondiente (Figura N°9d), donde también es posible reconocer las cinco isoformas de la proteína tau, la cual se observa dentro de los pesos moleculares determinados para ésta (45 a 62 kDa).

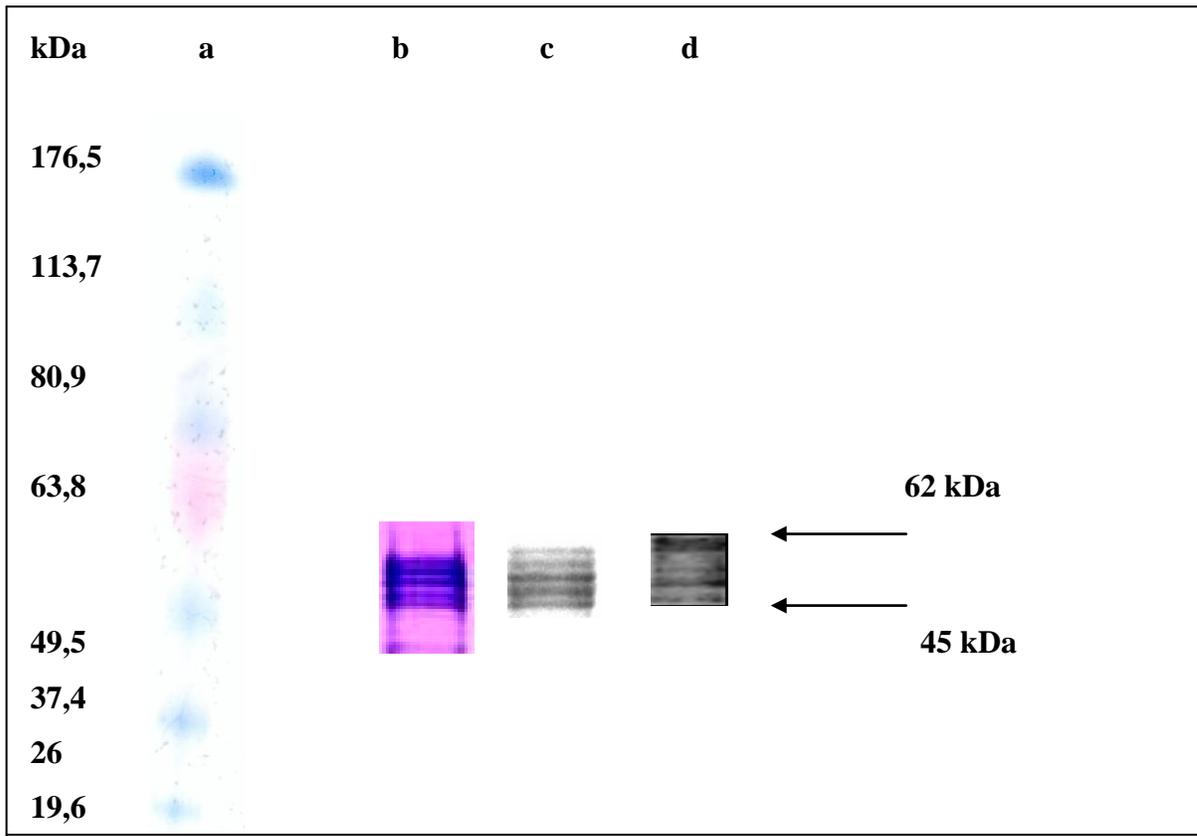


FIGURA N°9. Caracterización de tau purificada. (a) Estándar de Peso Molecular en kDa. (b) Electroforesis en gel de poliacrilamida (12%)-SDS de tau (1,2 μ g), teñido con azul de Coomassie. (c) Imagen de PAGE de tau en fosfoimager. (d) Inmunotransferencia de tau (0,8 μ g) utilizando anticuerpo monoclonal anti tau-5.

MAP-2.

Esta proteína se purificó a través de cromatografía, utilizando una columna de Sepharosa (CL-4B). En esta resina primero se consigue el paso de proteínas de alto peso molecular y luego se van eluyendo las de menor peso molecular. En la Figura N°10 se muestra el perfil cromatográfico que se obtuvo al eluir las fracciones en función del tiempo.

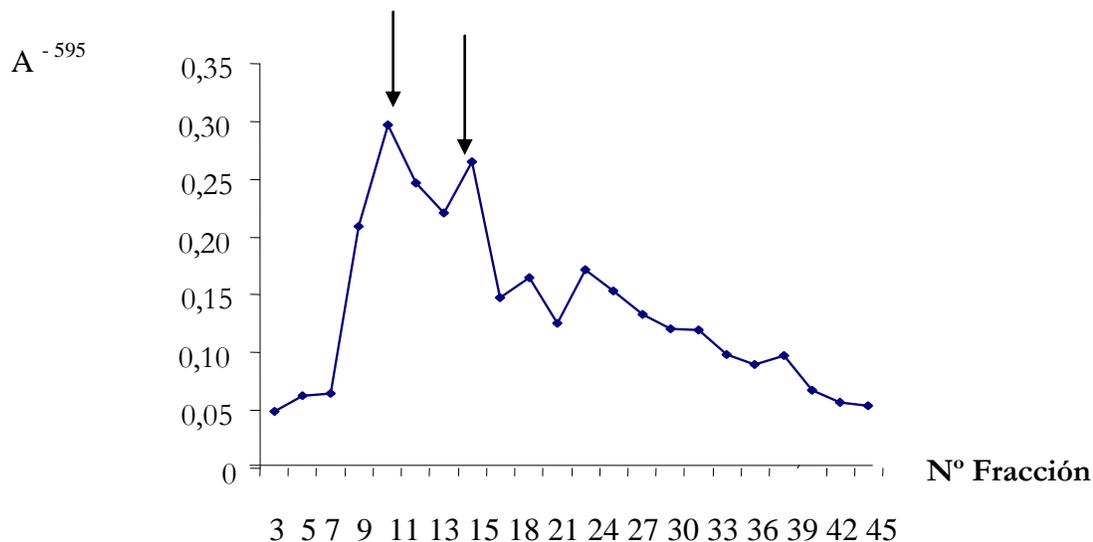


FIGURA N°10. Perfil cromatográfico de la proteína MAP-2 en columna de Sepharosa CL-4B, eluyendo fracciones de 1ml, a una velocidad de flujo de 0,2ml/min. Las flechas indican las fracciones de mayor absorbancia.

Al analizar este perfil, se observó que la concentración de proteína fue mayor en las primeras fracciones eluidas (2-20), concentrándose en el rango de fracciones entre 7 y 15. Posteriormente a la elusión de MAP-2, se sucedió el paso de las proteínas de menor peso molecular y otros contaminantes proteico, lo que corresponde en el gráfico a las fracciones 20 en adelante.

En el caso particular de MAP-2, la elusión de esta proteína se concentró en las primeras fracciones, de la 5 a la 20, observándose un pico de concentración en la fracción 10 y otro de menor cuantía en la fracción 14. Luego las concentraciones de MAP-2 por cada ml eluido descendieron gradualmente, hasta llegar a valores no detectados por el método de Bradford.

Las fracciones con mayor concentración de MAP-2, fueron analizadas en PAGE (10%)-SDS y teñidas con azul de Coomassie como se muestra en la Figura N°11.

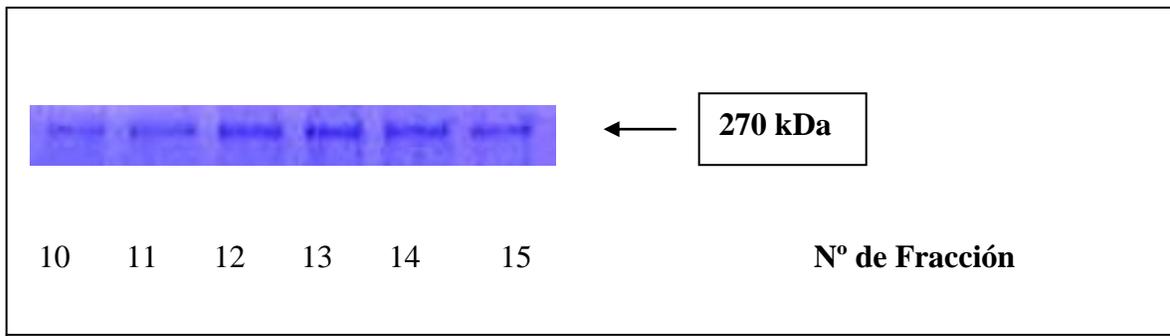


FIGURA N°11. Electroforesis en PAGE (10%)-SDS de las fracciones de MAP-2, eluídas a través de una columna de Sepharosa CL-4B, teñidas con azul de Coomassie. Cada fracción corresponde a $15\mu\text{g}$ de proteína de cada ml eluido.

A través de este método de separación de proteínas, la resina dejó pasar en primer lugar a MAP-2, por su alto peso molecular y por la fuerza iónica otorgada por el tampón descrito en material y métodos. Es decir, las proteínas o péptidos de bajo peso molecular se unieron a la resina y por lo tanto fueron retenidos, dejando eluir primero a MAP-2. Esto, considerando que la resina forma distintos tamaños de poro y deja espacios de mayor tamaño para el paso de proteínas de alto peso molecular como lo es MAP-2.

En la Figura N°12 se observa la proteína MAP-2 purificada y concentrada. Para caracterizarla se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS que fue teñido con azul de Coomassie (Figura N°12b). Posteriormente el gel fue fotografiado en fosfoimager, obteniéndose la Figura N°12c. Además, se realizó la inmunotransferencia correspondiente, de acuerdo a lo descrito en material y métodos, corroborándose así la presencia y la pureza de la MAP-2 (Figura N°12d).

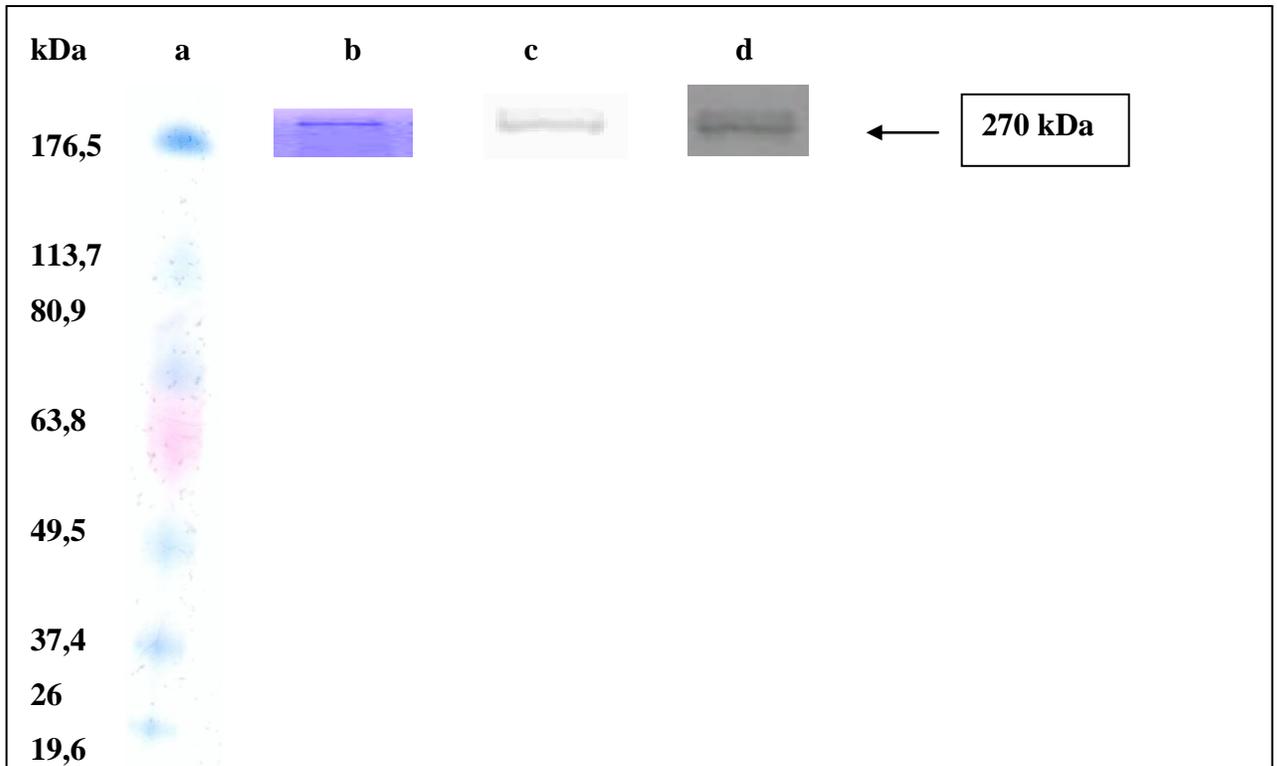


FIGURA N°12. Caracterización de MAP-2 purificada. Estándar de Peso Molecular en kDa. (b) Electroforesis en gel de poliacrilamida (10%) -SDS de MAP-2 (0,8μg), teñido con azul de Coomassie. (c) Imagen de PAGE-SDS de MAP-2 en fosfoimager (d) Inmunotransferencia de MAP-2 (0,4μg) utilizando anticuerpo monoclonal anti MAP-2.

Actina.

Esta proteína se obtuvo a partir de tejido muscular de pollo, el cual fue procesado luego de varios ciclos de polimerización y depolimerización, sucesivas extracciones y filtraciones.

En la Figura N°13 se visualiza la actina concentrada. Luego se sometió la proteína a un análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (12%)-SDS, teñido con azul de Coomassie (Figura N°13b). Este gel fue fotografiado en fosfoimager, como se muestra en la Figura N°13c. Además, se realizó la inmunotransferencia correspondiente, de acuerdo a lo

descrito en material y métodos, la cual permitió verificar la pureza de la proteína, como se observa en la Figura N°13d.

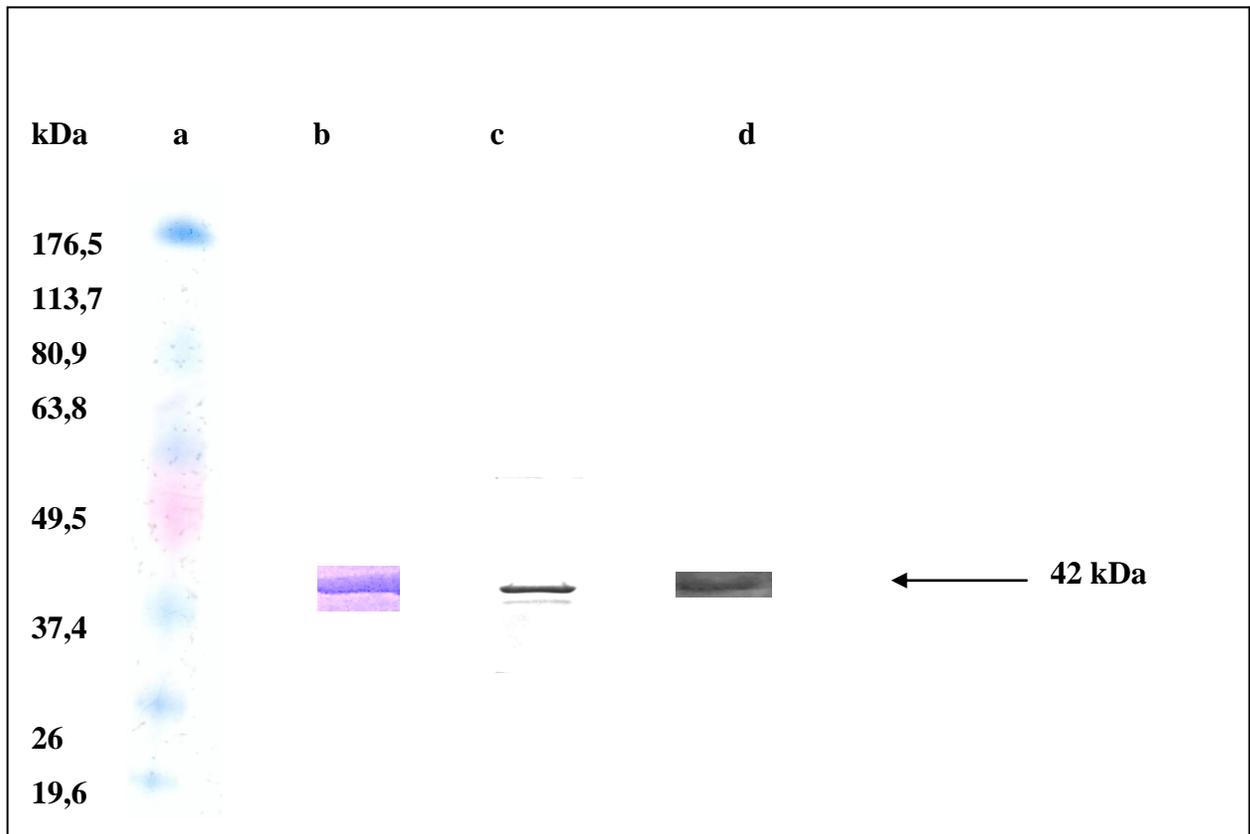


FIGURA N°13. Caracterización de actina purificada. (a) Estándar de Peso Molecular en kDa. (b) Electroforesis en gel de poliacrilamida(12%)-SDS de actina (0,8μg), teñido con azul de coomassie. (c) Imagen de PAGE-SDS de actina en fosfoimager (d) Inmunotransferencia de actina (0,4μg) utilizando anticuerpo monoclonal anti β-actina.

Cinéticas de polimerización.

Una vez purificadas las proteínas y determinadas sus concentraciones, se reprodujeron las condiciones óptimas, descritas en material y métodos, para realizar la polimerización de las estructuras del citoesqueleto *in vitro*.

Tubulina.

En primer lugar se procedió a realizar, la polimerización de tubulina pura, adicionarla proteína tau y los tampones, según lo descrito anteriormente. Paralelamente, se fue registrando los cambios de absorbancias producidos en el tiempo. Con estos datos se generó una curva de polimerización, en la cual se describen las siguientes fases de polimerización: nucleación, entre los 0 y 1min, alcanzando 0,08 unidades de absorbancia; polimerización rápida, entre los 1 y 13min; *plateau*, entre los 14 y 16min; depolimerización, a los 16min, como se muestra en la Figura N°14

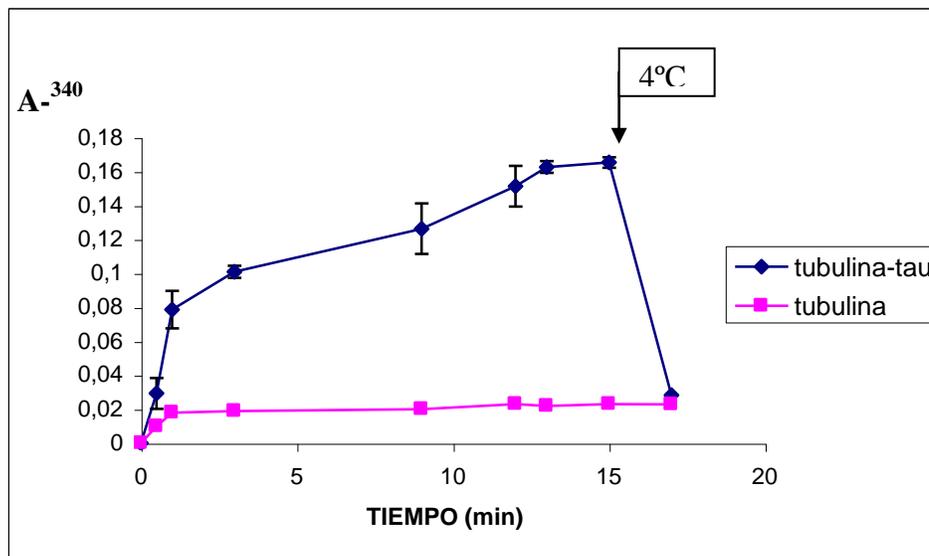


FIGURA N°14. Cinética de polimerización de tubulina y tau. (♦) tubulina, 1,8mg/ml y tau, 0,3mg/ml, a 37°C. Luego se agregó GTP. (■) Control tubulina en la misma concentración, agregando GTP. La flecha indica la incubación a 4°C con lo que se obtuvo la depolimerización.

En segundo lugar, se efectuó la polimerización *in vitro* de tubulina, agregando MAP-2 al sistema, luego se reprodujeron las condiciones descritas en el material y métodos,

finalmente se agregó GTP para iniciar la reacción y se registró la lectura de las absorbancias, obteniéndose la siguiente curva (Figura N°15), en la cual se describen las siguientes fases de polimerización: nucleación, entre los 0 y 1min, alcanzando 0,04 unidades de absorbancia; polimerización rápida, entre los 1 y 7min; *plateau*, entre los 7 y 15min; depolimerización, a los 15min.

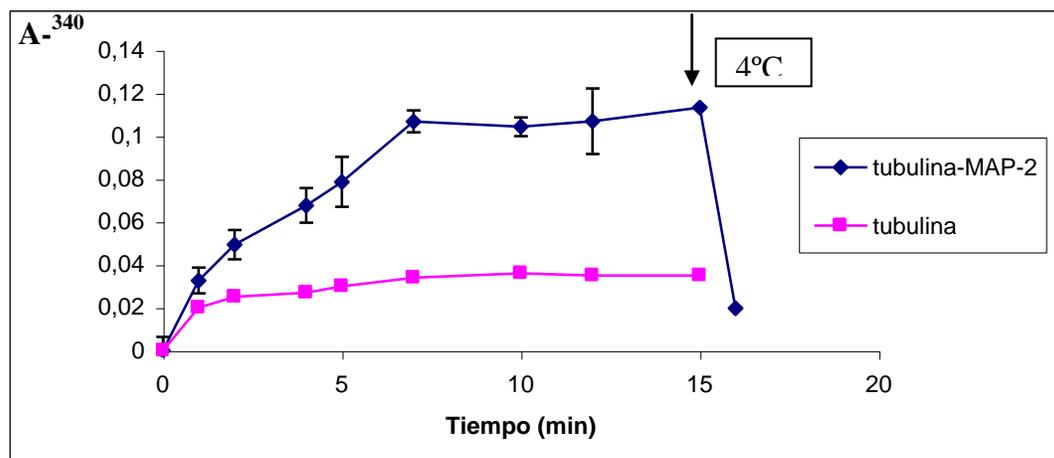


FIGURA N°15. Cinética de polimerización de tubulina y MAP-2. (♦) tubulina (1,8mg/ml) y MAP-2, (0,3mg/ml), a 37°C. Luego se agregó GTP. (■) Control tubulina en la misma concentración, agregando GTP. La flecha indica la incubación a 4°C con lo que se depolimerizó.

Actina.

De igual forma se procedió a polimerizar actina con cada una de las MAPs por separado, considerando las mismas condiciones de temperatura, pH, concentración de iones y la absorbancia descrita en material y métodos. Se incubó actina en presencia de tau, adicionando el nucleótido ATP, correspondiente para esta reacción y se registraron los cambios de absorbancia producidos en los distintos tiempos, con los cuales se obtuvo la siguiente curva (Figura N°16), en la cual se describen las fases de polimerización: nucleación, entre los 0 y 1min, alcanzando 0,02 unidades de absorbancia; polimerización rápida, entre los 1 y 7 min; *plateau*, entre los 7 y 15 min; depolimerización, a los 15 min.

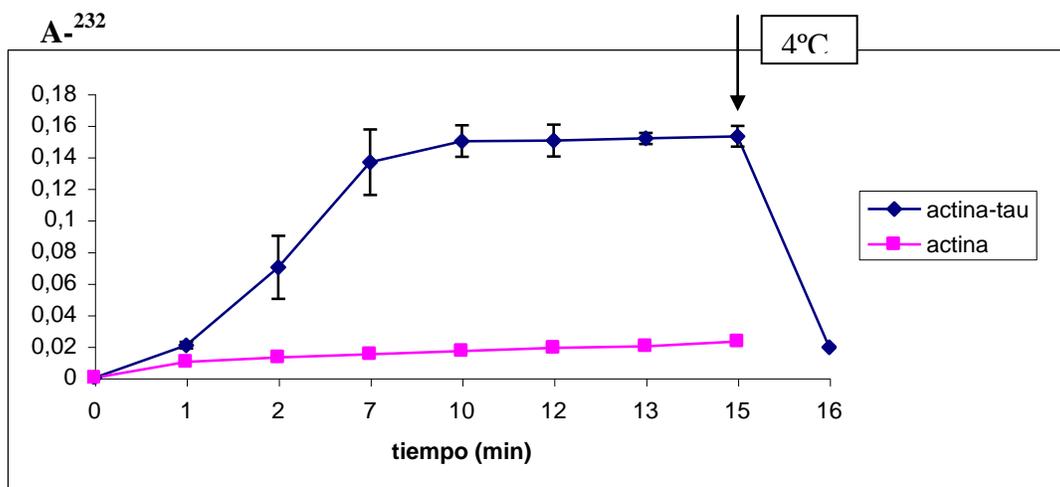


FIGURA N°16. Cinética de polimerización de actina y tau. (♦)actina 0,4mg/ml y tau 0,3mg/ml, a 37°C. Luego se agregó ATP. (■) Control actina en la misma concentración, agregando ATP. La flecha indica la incubación a 4°C con lo que se obtiene la depolimerización.

Por otra parte, se realizó la cinética de actina en presencia de MAP-2, obteniéndose la siguiente curva (Figura N°17), en la cual se describen las fases de polimerización: nucleación en los primeros segundos, alcanzando 0,02 unidades de absorbancia; polimerización rápida, entre los 0 y 3 min; *plateau*, entre los 3 y 15 min; depolimerización, a los 15 min.

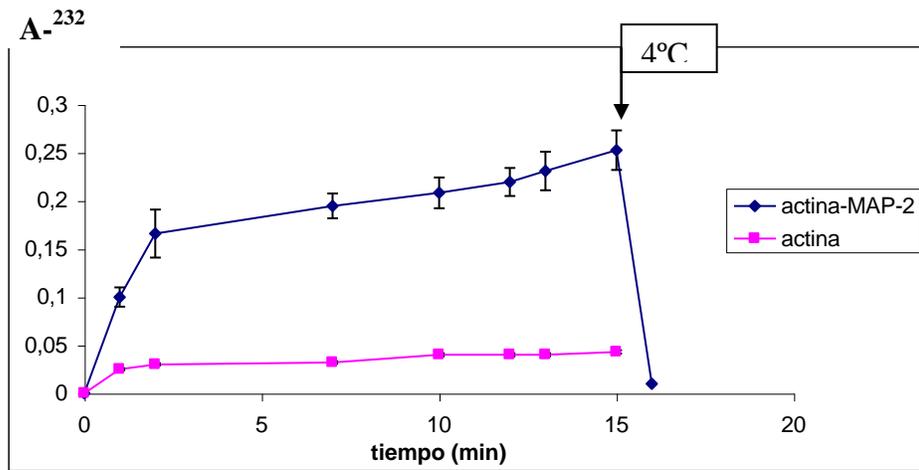


FIGURA N°17. Cinética de polimerización de actina y MAP-2.

(◆) actina 0,4mg/ml y MAP-2, 0,3mg/ml, a 37°C. Luego se agregó ATP. (■) Control actina en la misma concentración, agregando ATP. La flecha indica la incubación a 4°C con lo que se obtuvo la depolimerización.

Microscopía electrónica de transmisión (MET).

En las Figuras N°18 y 19 se observan las microfotografías obtenidas de las cinéticas de polimerización que fueron tomadas en diferentes tiempos (0, 6, 12min), procesadas según el protocolo descrito en material y métodos. Las microfotografías tienen una magnificación de 23.000 veces.

Microtúbulos.

A continuación se presentan las estructuras formadas *in vitro*. En la Figura N°18a se observa el control de estos ensayos, donde se incubó tubulina en presencia de GTP. En la Figura N°18b₁ se muestra la polimerización rápida de tubulina en microtúbulos, mediada por tau (6 min). En la Figura N°18b₂, se observa el estado de equilibrio dinámico en la formación de microtúbulos (12min).

La Figura N°18c₁ muestra la formación de microtúbulos, en fase de polimerización rápida, a partir de tubulina en presencia de MAP-2 (6 min). En la Figura N°18c₂ se observa el estado de equilibrio dinámico en la formación de microtúbulos (12min).

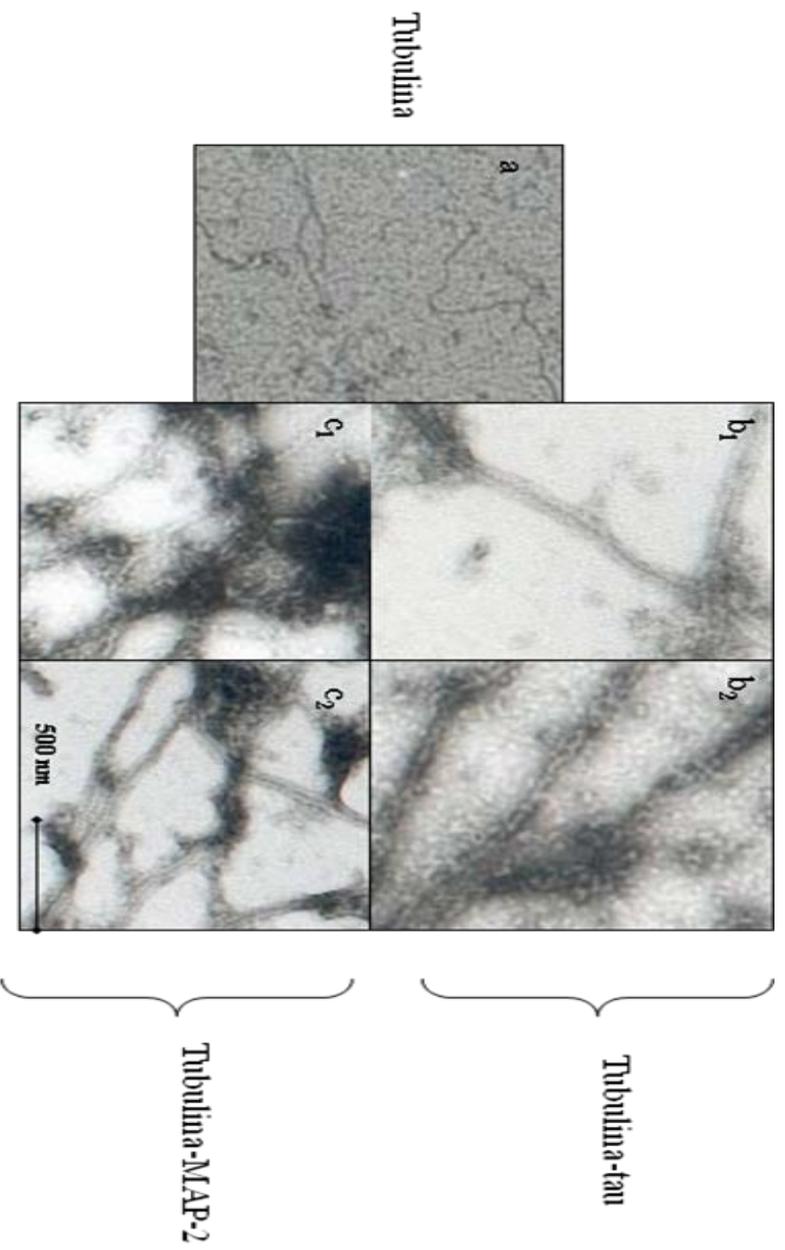


FIGURA Nº18 : Microfotografías electrónicas de transmisión. Microtubulos. (Magnitud: 23000 veces, b y c fueron aumentadas con programa computacional). (a) Control tubulina (1,2mg/ml) incubada en presencia de GTP. (b₁) tubulina (1,2mg/ml) y tau (0,3mg/ml), 6 min. (b₂) tubulina y tau 12 min. (c₁) tubulina (1,2mg/ml) y MAP-2 (0,3mg/ml) 6 min. (c₂) tubulina y MAP-2, 12 min.

Microfilamentos.

De la polimerización de actina para formar microfilamentos se obtuvieron las siguientes estructuras. En la Figura N°19a se observa el control de estos ensayos, donde se incubó actina en presencia de GTP. En la Figura N°19b₁ se muestra la polimerización rápida de actina en microfilamentos, mediada por tau (6 min). En la Figura N°19b₂, se observa el estado de equilibrio dinámico en la formación de microfilamentos (12min).

La Figura N°19c₁ muestra la formación de microfilamentos en fase de polimerización rápida, a partir de actina en presencia de MAP-2 (6 min). En la Figura N°19c₂ se observa el estado de equilibrio dinámico en la formación de microfilamentos con MAP-2 (12min).

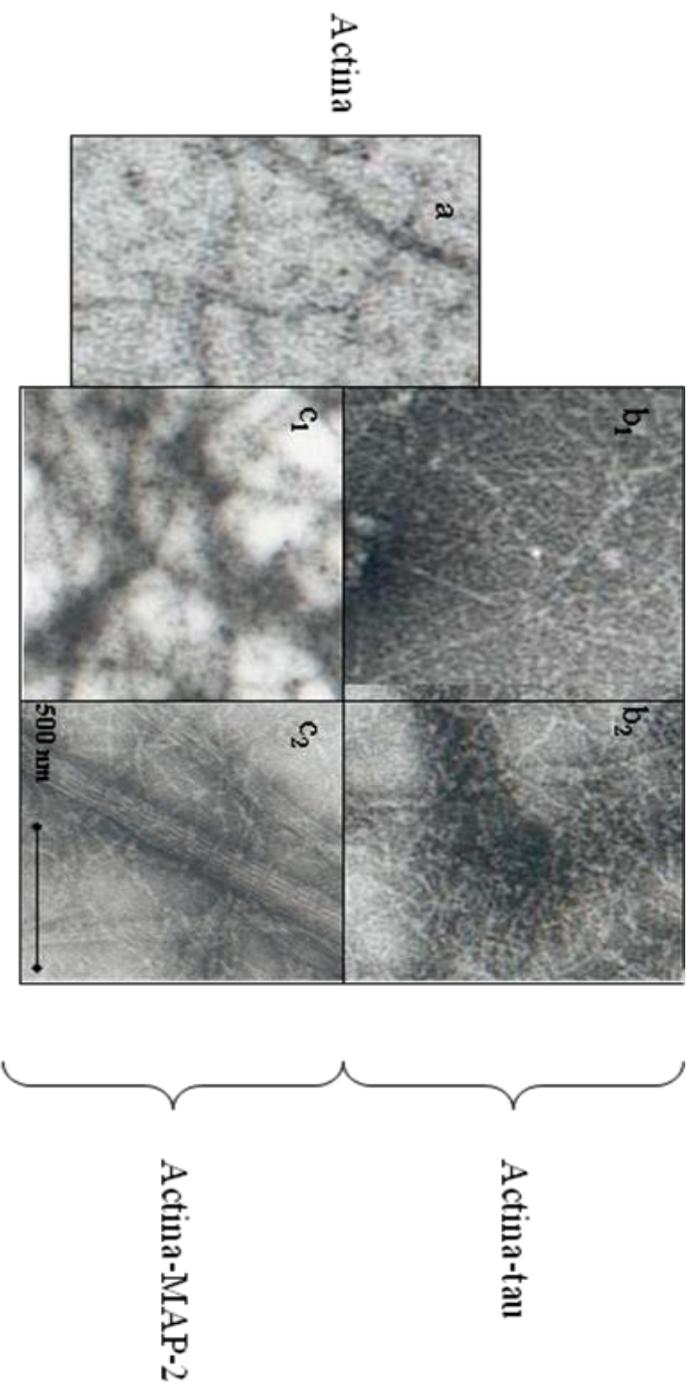


FIGURA Nº19 : Microfotografías electrónicas de transmisión. Microfilamentos (Magnitud: 23.000 veces, a y c₁ fueron aumentadas con programa computacional)

(a) Control actina (0,4mg/ml) en presencia de ATP. (b₁) actina (0,4mg/ml) y tau (0,3mg/ml), 6 min. (b₂) actina y tau 12 min. (c₁) actina (0,4mg/ml) y MAP-2 (0,3mg/ml), 6 min. (c₂) actina y MAP-2, 12 min.

Interacciones Supramoleculares.

En la Figura N°20 se observan las microfotografías que demuestran la presencia de interacciones macromoleculares, *in vitro*, entre los distintos componentes filamentosos formados previamente (microtúbulos y microfilamentos). Las Figuras N°20a y b muestra la conexión que se establece entre dos estructuras filamentosas preformadas.

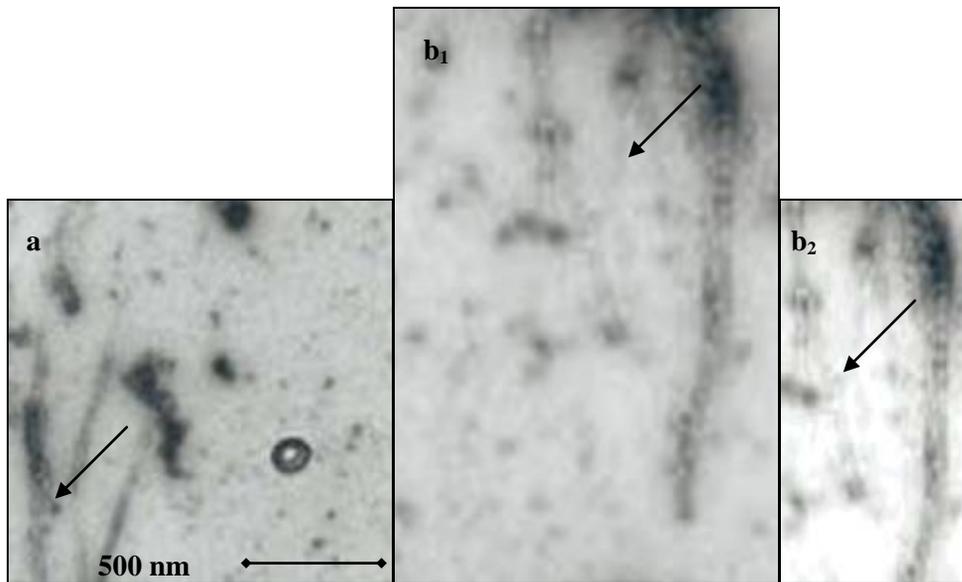


FIGURA N°20: Microfotografía electrónica de transmisión. Microfilamentos y Microtúbulos. (Magnitud: 23.000 veces, b_1 y b_2 fueron aumentadas mediante programa computacional). (a) y (b_1) Interacción entre macromoléculas. (b_2) Detalle de b_1 . Las flechas indican las interacciones que establecen las MAPs, ya sea tau o MAP-2, actuando como puente entre macromoléculas.

6. DISCUSIÓN.

Esta investigación fue dirigida a estudiar la dinámica del citoesqueleto, reproducida en condiciones *in vitro*, teniendo como base los conocimientos que hasta ahora se han descrito en esta área del conocimiento. La importancia que han adquirido las patologías neurodegenerativas, así como la enfermedad de Alzheimer y aquellas producidas por priones, que afectan al sistema nervioso central de los animales y del hombre, hacen necesario ahondar en los estudios del comportamiento normal de las células y el rol que juega el citoesqueleto en sus funciones. En tal sentido, este trabajo se orientó a investigar las interacciones de las proteínas que contribuyen a la formación de las estructuras del citoesqueleto, así como el papel que cumplen las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) en procesos como la interacción proteína-proteína para regular e inducir la formación de microtúbulos y microfilamentos y, además la interacción entre estas macromoléculas. De esta forma, se confirma el sistema de estabilidad dinámica del citoesqueleto y su participación en los diferentes procesos y cambios celulares.

En relación a las proteínas obtenidas, por los métodos propuestos, tubulina, actina, tau y MAP-2 se lograron purificar con alto grado de pureza, en concordancia con lo descrito por Farías *et al.*, (1992). Esto quedó demostrado a través de los geles PAGE realizados con las proteínas obtenidas.

Con respecto a la formación de microtúbulos, se observó que en la curva de polimerización de tubulina inducida por la tau se obtiene una curva inicial ascendente. Esta tendencia en un primer momento es lenta, lo cual corresponde a la fase de latencia o de nucleación, como lo describen Caudron *et al.*, (2002). Posteriormente, se observa una fase de crecimiento rápido entre los 3 y los 13 minutos que se reconoce como la etapa de elongación de los microtúbulos, que se produce a medida que se van agregando, rápidamente, dímeros de tubulina al polímero en formación, mientras que las subunidades que, normalmente, se van desensamblando lo hacen a menor velocidad, observándose un desbalance que favorece a la formación del microtúbulo. La duración de esta etapa es variable y se traduce en un crecimiento de la estructura microtubular como lo describen Desai y Mitchison, (1997).

En los ensayos realizados para este trabajo, se alcanzó el estado de equilibrio dinámico, representado por un *plateau* de la curva, alrededor de los 15 minutos, este valor discrepa con lo descrito por Maccioni *et al.*, (1989), en que el *plateau* es alcanzado alrededor de los 20 min. En este punto, se logró el estado de equilibrio dinámico, alcanzando a las 0,16 unidades de absorbancia, concordando con los primeros estudios realizados en esta área por Weisenberg *et al.*, (1986). En el estado de equilibrio, si bien no deja de haber procesos de ensamblaje y desensamblaje, se establece un equilibrio en la población de microtúbulos y en cada uno de ellos, de manera que la adición de subunidades de α y β tubulina en uno de los polos (*plus*) del microtúbulo, se hace equivalente al desensamblaje de estas por el polo opuesto (*minus*), como lo describieron Borisy *et al.*, (1974) y Sauders, (1999). Esto quiere decir, que los procesos de rescate y de catástrofe se equiparan y, por lo tanto, el microtúbulo deja de crecer, pero se mantiene estable en longitud si se conservan las condiciones de temperatura y pH constantes. En los experimentos realizados, esto se verifica en valores de absorbancia más o menos constantes durante esta fase, lo que evidencia que no hay formación neta de nuevas estructuras, sin embargo tampoco desaparecen las ya polimerizadas.

Los niveles de absorbancia alcanzados en estos estudios, son comparables a los obtenidos por Maccioni *et al.*, (1989) y Farías *et al.*, (1992). Sin embargo, también es posible encontrar otros ensayos, como los de Lindwall y Cole, (1984), en que sólo se llega a la mitad de esta absorbancia, 0,08 unidades y, por el contrario, Vera *et al.*, (1988) lograron valores de absorbancia superiores a los obtenidos en nuestro trabajo (0,13 unidades). Esto, considerando que en todos los experimentos las condiciones fueron similares al ser protocolos estandarizados. González *et al.*, (1998) describen 0,6 unidades de absorbancia en su nivel máximo, lo que es muy superior a lo que se presenta en nuestros experimentos. Estas diferencias podrían explicarse por las condiciones particulares de las proteínas purificadas. Si bien las condiciones generales y los factores involucrados son similares, es frecuente encontrar variaciones de este orden por la variedad de condiciones que involucran el procesamiento de las proteínas. Es por ello, que en este caso se realizó un promedio de las cinéticas obtenidas en al menos tres ensayos distintos, de manera de verificar su reproducibilidad. En nuestro caso, las tres cinéticas realizadas para cada experimento, siempre se mantuvieron en valores de absorbancia entre la 0 y 0,3 unidades.

Al analizar el período de nucleación, en la formación de polímeros, encontramos valores menores que en algunos estudios descritos. Algo idéntico a lo que ocurre con el *plateau* que se alcanza en algunos casos ya a partir de los 6 minutos como lo describieron Maccioni *et al.*, (1989) y González *et al.*, (1998). Sin embargo, Kar y Purich, (1979) lograron esta fase entre los 10 y 15 minutos. Estas diferencias se puede explicar debido a que el período de nucleación es muy variable, ya que es necesario lograr una concentración crítica de núcleos de tubulina en formación, para pasar a la fase de crecimiento rápido de los microtúbulos, según lo demostraron Job *et al.*, (2003). Esta concentración crítica puede variar por diversos factores, como son, el grado de pureza de las proteínas, la concentración de proteína activa en el medio, entre otros. Este efecto se disminuye a través de la estandarización de los ensayos en condiciones lo más similares posible.

Es importante considerar que, a pesar de las diferencias de unidades de absorbancia, la tendencia que muestra la curva es la misma, describiéndose las mismas tres fases de la polimerización en todas ellas. La certeza de que estos cambios, medidos espectrofotométricamente, correspondían a una cinética de polimerización de tubulina y tau *in vitro*, se logró al analizar las alícuotas de esta solución en los distintos momentos de la curva, a través de microscopía electrónica de transmisión.

El GTP, en este caso, es un factor determinante para que la polimerización se produzca, este hecho está avalado por los experimentos realizados por Maccioni y Seeds, (1982) además de los de Cowan y Lewis, (1999), que compararon la efectividad de análogos del GTP y otros compuestos para promover el ensamblaje de microtúbulos. Sus ensayos confirmaron que este nucleótido es un factor esencial en el proceso de polimerización microtubular, lo que se corroboró en nuestros ensayos, ya que, tanto en las sucesivas polimerizaciones requeridas para purificar las proteínas, como en los ensayos *in vitro*, el factor que iniciaba las reacciones, era necesariamente el GTP.

Por otra parte, estos fenómenos también pudieron verificarse, ya que, una vez alcanzado el equilibrio, la estructura microtubular pudo depolimerizarse al descender la temperatura a 4°C, como lo documentan Mejillano *et al.*, (1990). En este punto, se observó una depolimerización rápida, que se evidenció en una caída de la absorbancia y, por lo tanto, un descenso en la curva que alcanzó el nivel inicial. Este procedimiento, permitió

comprobar la importancia de la temperatura para la mantención de estos sistemas y además permitió verificar la reversibilidad del proceso de polimerización. Esta condición adquiere importancia en la célula, ya que no es necesario producir constantemente subunidades de tubulina para cumplir con las diferentes funciones del citoesqueleto, sino que existe un reciclaje de estructuras que permite mayor eficiencia y menor gasto energético en el proceso. Maccioni y Seeds, (1982) explicaron que lo mismo ocurría con las moléculas de GTP, que, como se mencionó anteriormente, son hidrolizables y cumplen funciones tanto unidas como separadas del microtúbulo, ya que al unirse al microtúbulo en formación y liberar un fosfato, se producía un cambio conformacional en el polímero, estabilizando su estructura. Esta hidrólisis permite la existencia de un *pool* de moléculas que se reutilizan constantemente, según las exigencias celulares. Este fenómeno, que se repite con muchos otros compuestos en la célula, demuestra la importancia del constante ensamblaje y desensamblaje de estructuras filamentosas en la génesis, función y reproducción celular, y refuerza las teorías acerca de la convergencia de mecanismos similares, para distintos procesos, que por su eficiencia a nivel celular, se conservan a lo largo de la evolución, lo que fundamentado por Shaefer y Cooper, (1995).

El estudio de las distintas fases y los tiempos aproximados en que se verifican estas reacciones *in vitro*, pueden dar una idea de la velocidad con que podrían producirse en la célula, dando pie a la posible interrupción del desarrollo de estas estructuras, este hecho adquiere gran importancia en estudios de células tumorales, en que el uso de antimitóticos específicos como la vincristina (Baas y Ahmad, 1993), ocupan los sitios de unión de tubulina para las MAPs, el calcio y otros factores promotores del ensamblaje, impidiendo así el crecimiento y la reproducción de las células malignas.

Otro proceso que es mediado por el ensamblaje y desensamblaje de estructuras del citoesqueleto es el fenómeno del crecimiento axonal y la posterior plasticidad neuronal, por lo tanto, la comprensión de la regulación de proteínas como las MAPs, y su función en distintos estados de desarrollo del individuo se hacen fundamentales, como lo explicaron Shea y Beermann, (1994). Esto apunta a las anormales presentaciones que adquiere, por ejemplo tau, que se hiperfosforila en enfermedades como el Alzheimer (Velásquez *et al.*, 2002), lo que provoca su agregación y la consecuente desestabilización del sistema de microtúbulos en formación que se ve disminuido por la ineficacia de la tau en promover el

ensamblaje en condiciones de oligómero (Bancher *et al.*, 1991). De allí, la importancia de reproducir y describir las condiciones en que esto ocurre en una neurona normal. Un acercamiento a esta condición de normalidad fue lo que se realizó en este estudio, verificando la importancia de las condiciones y los factores necesarios y o determinantes involucrados.

En este estudio, quedó demostrada la función promotora de la tau; ya que, al comparar la curva de polimerización de tubulina en presencia de tau, con respecto al control se evidenciaron diferencias importantes en los valores de absorbancia alcanzados. Esto, considerando, que sólo diferían en la presencia o ausencia de esta MAP. También, se observó que en el control, sin la tau, existió un cambio en los valores de absorbancia; sin embargo, éste fue de mucho menor cuantía, lo que corresponde a la capacidad de tubulina por sí sola de formar algunas estructuras en presencia de GTP, iones como el magnesio, glicerol, a pH y temperaturas, que fueron descritas por Serrano *et al.*, (1984) y Mejillano *et al.*, (1990). No obstante, es importante considerar, que como quedó demostrado a través de microscopía electrónica, las estructuras que allí se formaron no alcanzaron el nivel ni la magnitud de las formadas en presencia de la MAPs y, por lo tanto, se confirmó la importancia de estas proteínas en vista de los requerimientos y funciones celulares.

En el caso de la cinética de polimerización realizada entre tubulina y MAP-2, se observó que los niveles finales de absorbancia alcanzados, fueron menores que en los experimentos con la tau. Sin embargo, el tiempo que demoraron estas proteínas en alcanzar el estado estacionario, fue similar para ambos casos (alrededor de los 15 minutos). Este resultado, discrepó con lo referido en la bibliografía; ya que, según los trabajos de Kim *et al.*, (1986), la MAP-2 fue más eficiente en promover de formación de microtúbulos que la tau. Sandoval y Vandekerckhove (1981), cuantificaron esta superioridad en eficiencia asignando una capacidad mayor a MAP-2 de 10 veces sobre tau para promover la polimerización *in vitro*. Este antecedente se comprueba fisiológicamente en la constante necesidad de las dendritas de proyectarse y establecer comunicaciones interneuronales, que coincide con la existencia de grandes cantidades de MAP-2 en estas estructuras neuronales (Kotani *et al.*, 1986).

En cuanto a los valores máximos de absorbancia alcanzados, estos se encontraban dentro de los rangos descritos por autores como Herzog y Weber, (1978) y por Vera *et al.*, (1988). Además, ellos documentaron que MAP-2 tenía una menor capacidad de promover la polimerización microtubular, al compararla con tau, lo que es coincidente con nuestro trabajo. Actualmente, se acepta que MAP-2 sería más eficiente en las neuronas, pero la presencia de las MAPs es muy variable, según el tipo celular.

En relación con la cinética descrita por tubulina en presencia MAP-2, al compararla con el control respectivo, se observó una diferencia, en unidades de absorbancia, de menor magnitud que la encontrada en el caso comparativo de la tau con su respectivo control. Esto, podría explicarse por los menores niveles de absorbancia final alcanzados en esta curva, versus lo que ocurrió con la tau. Según lo descrito por Shu y Joshi, (1995) esta diferencia se podría deber a una autopolimerización levemente mayor de tubulina en el control de MAP-2 que en el control de tau.

En resumen, en la literatura citada se encontraron curvas con niveles de polimerización, relativamente, variables bajo condiciones similares de experimentación. Sin embargo, la interpretación de las curvas obtenidas, están asociadas a las microfotografías descriptivas correspondientes a cada caso, en que se observaron microtúbulos en distintos estados de polimerización.

En sus estudios, Goedert y Jakes., (1990), concluyeron que la proteína MAP-2, al igual que la tau, cumplía una función reguladora y estabilizadora en los microtúbulos, pero por su gran tamaño era de distribución más espaciada sobre el microtúbulo al compararla con tau. Esto queda definido por la conformación de su dominio de proyección (extremo amino terminal) y no por su dominio de unión a microtúbulos (extremo carboxilo terminal), ya que éste es similar en tamaño en ambas proteínas. Con respecto al dominio de tubulina para unirse a las MAPs, este se encuentra en su región carboxilo terminal y es común para ambas proteínas. Así lo definieron Lewis *et al.*, (1988) y Farías *et al.*, (1992), al establecer las secuencias repetitivas en tubulina que se unían con sus correspondientes secuencias en ambas MAPs.

En el caso de la cinética con MAP-2, al igual que lo observado en la curva de tubulina con tau, se sucedieron las tres fases distintas y correspondientes a los procesos de nucleación, elongación del microtúbulo y estado de inestabilidad dinámica. En este caso, el período de latencia duró más tiempo que el descrito en el experimento con tau, por lo que se pudo deducir que se requirió más tiempo para alcanzar la concentración crítica, concordando con Pollard, (1984) y Cooper, (1992).

En este ensayo, también se demostró el efecto de la disminución drástica de la temperatura a 4°C, la cual generó la depolimerización rápida de los microtúbulos, luego de haber alcanzado el estado estacionario. Al analizar las imágenes en MET, correspondientes a este punto, se pudo apreciar que, tanto en el caso de la tau, como en el caso de la MAP-2, las imágenes eran similares a las que se observaron en el experimento control, coincidiendo con Mejillano *et al.*, (1990).

Al comparar los controles de tubulina en las microfotografías, obtenidas por MET, con las estructuras polimerizadas, se pudo observar, que además de la existencia de pocas o nulas figuras filamentosas, no se observa un patrón característico en la distribución de éstas; sin embargo, las estructuras microtubulares formadas con las distintas MAPs, tendieron a disponerse en estructuras largas y rectas, que se entrelazaban unas con otras formando una red. Esta característica es mucho más evidente en los experimentos realizados con actina y las MAPs estudiadas, que se discuten a continuación.

Al analizar la reacción de cinética de polimerización de actina, en la formación de microfilamentos, se apreció que la concentración de esta proteína que se requirió fue, cuantitativamente, tres veces menor a la utilizada con tubulina en la formación de microtúbulos. El uso de esta concentración de actina se encuentra documentado y obedece a experiencias previas en esta área (Pardee y Spudich, 1982). Posiblemente la diferencia pueda deberse a los distintos procesamientos a los que fueron sometidas, tanto la actina como la tubulina, para ser purificadas. En el caso de actina, como se describió en material y métodos, éste fue sometido a sucesivas polimerizaciones, depolimerizaciones, filtraciones y centrifugaciones para aislarla de otros componentes. Por otra parte, en el caso de tubulina, luego de los ciclos de polimerización y depolimerización se utilizó una columna de fosfocelulosa. Es decir, fue sometida a un procedimiento más agresivo que la actina.

Además, la obtención de actina pura se realizó a partir de tejido muscular de pollo, lo que asegura una más abundante fuente de esta proteína activa (Dos Remedios *et al.*, 2003); en tanto, la tubulina, si bien Sullivan, (1988) la encontró en altas concentraciones a nivel del SNC, no alcanza a equiparar los niveles de actina en la fibra muscular (20% del peso total de la célula).

Además, se debe considerar que los medios de conservación de las proteínas, si bien están estandarizados para mantenerlas activas por meses, como lo describieron Farías *et al.*, (1992), no se puede asegurar que el total de la proteína purificada mantenga su actividad. A la vista de estos resultados, la actina conserva mejor su actividad en estas condiciones que la tubulina, la cual parece ser más sensible a la inactivación, ya sea por purificación o almacenaje.

En los experimentos en que se describen la polimerización de microfilamentos a partir de subunidades de actina G, en presencia de tau, se lograron valores de absorbancia similares a los encontrados con tubulina y tau (0,17 unidades). Este resultado es concordante con lo descrito por Moraga *et al.*, (1993), quienes lograron valores de absorbancia máximos del orden de las 0,2 unidades.

En la polimerización de actina, al igual que en la de tubulina, se diferencian tres fases en el proceso de formación de microfilamentos, que se corresponden a los eventos que ocurren en el citoplasma celular, según se describió en los antecedentes antes mencionados. Sin embargo, en esta proteína la reacción de hidrólisis es mediada por el nucleótido ATP, como lo menciona Pollard, (1984). Esta molécula aporta la energía necesaria para la unión de las subunidades globulares en la formación de polímeros filamentosos o de actina F.

En la polimerización de microfilamentos, a partir de actina y tau, la fase descrita como nucleación ocurrió casi instantáneamente, haciéndose la curva rápidamente ascendente en el estado de polimerización acelerado. Este fenómeno no se produjo en los ensayos con tubulina, lo que nos indicó que en el caso de actina, fue más fácil superar la barrera de la concentración crítica.

En la célula *in vivo* Dent y Gertler, (2003) afirmaron que las estructuras del citoesqueleto están en constante flujo, no obstante el proceso para formar filamentos es más acelerado y eficiente que lo que ocurre con tubulina. Esto está, posiblemente relacionado con células que requieren una mayor función de transporte de exocitosis, división o movimiento (Inoue y Salmon, 1995; Carlier *et al.*, 1999). Sin embargo, en los experimentos realizados *in vitro*, no es posible determinar esta condición, ya que existen muchos otros factores asociados que regulan los procesos celulares.

Con los valores más altos de absorbancia alcanzados en la polimerización de actina y MAP-2 (0,2 unidades), se dedujo que la reacción más eficiente, entre todos los ensayos, se estableció entre estas dos proteínas.

Las interacciones que ocurren entre los componentes del citoesqueleto, determinan la morfología y el movimiento celular (Goode *et al.*, 2000); por lo que, el conocimiento de estas interacciones es un paso necesario para la comprensión de la organización de la citomatriz.

En esta memoria se logró demostrar, por medio de MET, la existencia de conexiones entre microfilamentos y microtúbulos, mediadas por MAPs, lo que está de acuerdo con Cross *et al.*, (1993) quienes determinaron la existencia de interacciones entre la actina y las MAPs, *in vitro* y con Pedrotti *et al.*, (1994) que demuestran la presencia de éstas *in vivo*. También Henríquez *et al.*, (1995) documentaron la presencia de interacciones de tau con microtúbulos y actina en distintos tipos celulares. Otros estudios han demostrado que el sitio de unión específico de las MAPs (tau y MAP-2) a tubulina, sería también complementario a actina, lo que quedó de manifiesto a través de ensayos de competencia de las MAPs por los microtúbulos o los microfilamentos (Pedrotti *et al.*, 1994; Farías *et al.*, 2002).

En el presente estudio, se enfatizó en observar y analizar descriptivamente la existencia de estas interacciones y demostrar que al incubar microtúbulos y microfilamentos preformados en conjunto y adicionar una MAPs, fue posible observar las conexiones entre ambos sistemas de polímeros filamentosos, a través de las MAPs estudiadas.

Por otra parte, también se ha logrado determinar, que tanto tau, como MAP-2 comparten epítopes en común (Doll *et al.*, 1993). Puntualmente, en el caso de tau, el estudio de sus epítopes y el conocimiento de su acción mediante de la formación de péptidos sintéticos de esta proteína, permiten ahondar en el estudio de la acción moduladora y estabilizadora de la tau (Farías *et al.*, 1992). La importancia de esto radica en que a medida que se avance en el conocimiento de las acciones específicas de tau en una neurona normal, se puede entender de mejor manera los cambios que ocurren en las patologías, por ejemplo las taupatías, donde las fosforilaciones de tau pueden ocurrir en sitios atípicos, afectando su habilidad de promover el ensamblaje de microtúbulos (Lindwall y Cole, 1984). Así se intenta determinar, de que manera la tau cambia su patrón de comportamiento y su relación con el citoesqueleto cuando se instaura la enfermedad.

7. CONCLUSIONES.

- 1.- Se logró purificar las proteínas del citoesqueleto tubulina, actina, tau y MAP-2 con un alto grado de pureza.
- 2.- Con las proteínas incubadas se logró polimerizar, microtúbulos a partir de tubulina en un sistema al cual se adicionó tau o MAP-2.
- 3.-Se logró la polimerización de microfilamentos a partir de actina incubada con tau o MAP-2
- 4.- Se determinó que la formación de microtúbulos, mediada por la tau, es más eficiente en su polimerización que con la MAP-2 en condiciones similares.
- 5.- La formación de microfilamentos es más eficiente al ser mediada por la MAP-2 que por la tau.
- 6.- A través de la microscopía electrónica de transmisión, se demostró que, *in vitro*, se establecen interconexiones entre microtúbulos y microfilamentos. MAP-2 y tau son mediadoras entre ambas poblaciones de filamentos.

8. Bibliografía.

- **AINSZTEIN, A.; PURICH, D.** 1994. Stimulation of tubulin polimerization by MAP-2. *J. Biol. Chem.* 269:28465-28471.
- **ALBERTS, B.; JOHNOW, A.; LEWIS, J.;RALF, M., ROBERTS, K.; WALTER, P.** 1994. *Molecular Biology of the Cell.* 4 ed. Garland Publishing, Inc. New York. U.S.A.1616pp.
- **AL-BASSAAM, J.; OZER, R.; SAFER, D.; HALPAIN, S.; MILLIGAN, R.** 2002. MAP-2 and tau bind longitudinally along the outer edges of microtubule protofilaments. *J. Cell. Biol.* 157:1187-1196.
- **AMOS, L.; LOWE, J.** 1999. How taxol stabilises microtubule structure. *Chem. Biol.* 6:65-69.
- **BAAS, P.; AHMAD, F.** 1993. The transport properties of axonal microtubules establish their polarity orientation. *J. Cell Biol.* 120:1427-1437.
- **BAKSALERSKA, P.; NIEVADOMSKA, G.** 2002. Structure and role of the tau protein. *Post. Biochem.* 48:287-295.
- **BANCHER, C.; GRUNDKE- IQBAL, I.; IQBAL, K.; FRIED, V.; SMITH, H.; WISNIESWI, H.** 1991. Abnormal phosphorylation of tau precedes ubiquitination in neurofibrillary pathology of Alzheimer disease. *Brain Res.* 539:11-18.
- **BORISY, G.; OLMSTED, J.; MARCUM, M.; ALLEN, C.** 1974. Microtubule assembly in vitro. *Proceedings.* 33:167-174.
- **BRADFORD, M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- **BRINKLEY, W.** 1997. Microtubules: a Brief Historical perspective. *J. Struct. Biol.*118:84-86.
- **BROWN, D.** 2000. Altered toxicity of the prion protein peptide PrP106-126 carrying the Ala¹¹⁷ - Val mutation. *Biochem. J.* 346:785-791.
- **BUEÉ, L.; BUSSIÉRE, T.; BUEÉ- SCHENER, V.; DELACOURTE, A.; HOF, P.** 2000. Tau proteins isoforms phosporilation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res.* 33:95-130.

- **BURNETTE, W.** 1981. Western blotting. Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate- polyacrilamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody radioiodinated protein. **In:** Antibodies. A laboratory manual. Eds. Harlow y David Lane. United Kingdom .726pp.
- **CAPLOW, M.; SHANKS, J.** 1996. Evidence that a single monolayer tubulin GTP-cap is both necessary and sufficient to stabilize microtubules. *Mol. Biol. Cell.* 7:663-675.
- **CAPOTE, C., MACCIONI, R.B.** 1998. The association of tau-like proteins with vimentin filaments in cultured cells. *Exp. Cell. Res.* 239:202-213.
- **CARLIER, M.; RESSAD, F.; PANTALONI, D.** 1999. Control of actin dynamics in cell motility. *J. Biol. Chem.* 27:33824-33830.
- **CAUDRON, N.; ARNAL, I.; BULHER, E.; JOB, D.; VALIRON, O.** 2002. Microtubule nucleation from stable tubulin oligomers. *J. Biol. Chem.* 277:50973-50979.
- **CLEVELAND, D.** 1990. Microtubule Mapping. *Cell.* 60:701-702.
- **COOPER, J.** 1987. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J. Cell Biol.* 105:1473-1478.
- **COOPER, J.** 1992. Actin filament assembly and organization *in vitro*. **In:** Chap. 3 of The Cytoskeleton. 1° ed. Eds. Carraway, K.L. and Carraway, C.A.C. Oxford University Press, New York. U.S.A. 268 pp.
- **CORREAS, I.; PADILLA, R.; AVILA, J.** 1990. The tubulin- binding sequence of brain microtubule-associated proteins, tau and MAP-2, is also involved in actin binding. *Biochemistry.* 30:4362-4366.
- **COWAN, N.; LEWIS, S.** 1999. A chaperone with hydrophilic surface. *Nat. Struc. Biol.* 6:990-991.
- **CROSS, D.; VIAL, C.; MACCIONI, R.B.** 1993. A tau-like protein interacts with stress fibers and microtubules in human and rodent cultured cell lines. *J. Cell Sci.* 105:51-60.
- **CROSS, D.; FARIAS, G.; DOMINGEZ, J.; AVILA, J.; MACCIONI, R.B.** 1994. Carboxyl-terminal sequences of β -tubulin involved in the interaction of HMW- MAPs. Studies using site-specific antibodies. *Mol. Cell. Biochem.* 132:81-90.
- **CHAU, M.; RADEKE, M.; DE INÉS, C.; BARASOANI, I.; KOHLSLAAET, L.; FEINSTEIN, S.** 1998. The microtubule associated protein tau cross- link to two distinct sites on each α and β tubulin monomers via separate domains. *Biochemistry.* 37:17692-17703.

- **CHEN, H.; BERSTEIN, B.; BAMBURG, J.** 2000. Regulating actin- filament dynamics *in vivo*. Trends Biochem. Sci. 25:19-23.
- **DENT, E.; GERTLER, F.** 2003. Cytoskeletal Dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. Neuron. 40:209-227.
- **DERRY, W.; WILSON, L.; JORDAN, M.** 1998. Low potency of taxol at microtubule minus end implication for its antimitotic and therapeutic mechanism. Cancer Res. 88:1177-1184.
- **DESAI, A.; MITCHISON, T.** 1997. Microtubule polymerization dynamics. Ann. Rev. Cell. Dev. Biol. 13:83-117.
- **DHAMODHARANN, R.; WADSWORTHY, P.** 1995. Modulation of microtubule dynamic instability *in vivo* by brain microtubule- associated proteins. J. Cell Sci. 108:1679-1689.
- **DOLL, T.; MEISCHNER, M.; RIEDERER, B.; HONEGGER, P.; MATUS, A.** 1993. An isoform of microtubule- associated protein 2 (MAP-2) containing four repeats of the tubulin- binding motif. J. Cell Sci. 106:633-640.
- **DOS REMEDIOS, C.; CHHABRA, D.; KEKIC, M.; DEDOVA, I.; TSUBAKIHARA, M.; BENY, D.; NOSWORTHY, N.** 2003. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. Phys. Rev. 83:433-473.
- **ESTES, J., SELDEN, L.; KINOSIAN, H.; GERSHMAN, L.** 1992. Tightly bound divalent cation of actin. J. Musc. Res. Cell Motil. 13:272-284.
- **FARÍAS, G.; VIAL, C.; MACCIONI, R.B.** 1992. Specific macromolecular interactions between tau and the microtubule system. Moll. Cell. Biochem. 112:81-88.
- **FARÍAS, G.; MUÑOZ, J.; GARRIDO, J.; MACCIONI, R.B.** 2002. Tubulin, Actin, and Tau protein interaction and the study of their macromolecular assemblies. J. Cell. Biochem. 85:315-324.
- **FELGNER, H.; FRANK, R.; BIERNAT, J.; MANDELKOW, E.; LUDIN, B.; MATUS, A.; SCHLIWA, M.** 1997. Domains of neuronal microtubule associated proteins and flexural rigidity of microtubules. J. Cell Biol. 138:1067-1075.
- **GOEDERT, M.; JAKES, R.** 1990. Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. EMBO J. 9:4225-4230.

- **GOEDERT, M., SPILLANTINI, G.; CROWTHE, R.** 1992. Cloning of a big tau microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:1983-1987.
- **GONZALEZ, M.; CAMBIAZO, V.; MACCIONI, R.B.** 1998. The interactions of Mip-90 with microtubules and actin filaments in human fibroblast. *Exp. Cell. Res.* 239:243-253.
- **GOODE, B.; DRUBIN, D.; BARNES, G.** 2000. Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12: 63-71.
- **GRUNDKE- IQBAL, I.; IQBAL, K.; TUNG, Y.; QUINLAN, M.; WISNIESWI, H.; BINDER, L.** 1986. Abnormal phosphorylation of the microtubule- associated protein tau in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:4913-4917.
- **HERNANDEZ, M.; AVILA, J.; ANDREW, J.** 1986. Physicochemical characterization of the heat stable microtubule associated MAP-2. *Eur. J. Biochem.* 154:41-48.
- **HERZOG, W.; WEBER, K.** 1978. Fractionation of brain microtubule-associated proteins. Isolation of two different proteins wich stimulate tubulin polymerization in vitro. *Eur. J. Biochem.* 92:1-8.
- **INOUE, S.; SALMON, E.** 1995. Force generation by microtubule assembly/ disassembly in mitosis and related movements. *Mol. Biol. Cell.* 6:1619-1640.
- **JOB, D.; VALIRON, O.; OAKLEY, B.** 2003. Microtubule nucleation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 1:111-117.
- **KANAI, Y.; TAKEMURA, R.; OSHIMA, T.; MORI, H.; IHARA, I.; YANAGISAWA, M.; MASAKI, T.; HIROWAKA, N.** 1989. Expression of multiple tau isoforms and microtubule bundle formation in fibroblast transfected with a single tau with DNA. *J. Cell Biol.* 109:1173-1184.
- **KAR, T.; PURICH, L.** 1979. A microtubule assembly/disassembly model based on drug effects and depolymerization kinetics after rapid dilution. *Biol. Chem.* 254:10885-10888.
- **KAR, S.; FAN, J.; SMITH, M.; GOEDERT, M.; AMOS, L.** 2003. Repeat motifs of tau bind to the insides of microtubules in the absence of taxol. *EMBO J.* 22:70-77.
- **KATSUKI, M.; TOKURAKU, K.; NAKAWANA, H.; MIROFUSHI, H.; KOTANI, S.** 1997. The “assembly- promoting sequence region” of microtubule associated protein MAP-4 failed to promote microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci .U.S.A.* 72:1858-1862.
- **KELLOG, D.; MORITZ, M.; ALBERTS, B.** 1994. The centrosome and cellular organization. *Ann. Rev. Biochem.* 63:639-674.

- **KIM, H.; JENSEN, C.; REBHUN, L.** 1986. The binding of MAP-2 and tau on brain microtubules *in vitro*: implications for microtubule structure. Ann. New. York. Acad. of Sci.
- **KLYMKOWSKY, C.** 1989. Function of intermediate filaments. Cell. Motil. Cytosk. 14:309-331.
- **KOTANI, S.; MIROFUSHI, H.; MAEKAWA, S.; SATO, C.; SAKAI, H.** 1986. Characterization of microtubule- associated protein isolated from bovine adrenal gland. Eur. J. Biochem. 156:23-29.
- **KOVACS, G.; ZERBI, P.; VOIGTLÂNDER, T.; STROHSCHNEIDER, M.; TRABATTONI, G.; HAINFELLNER, J.;BUDKA, H.** 2002. The prion protein in human neurodegenerative disorders. Neurosc. Letts. 329:269-272.
- **LAEMMLI, U.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. Nature. 227:680-685.
- **LAFERIERE, N.; THOMAS, H., MAC ROE, M.; BROWN, D.** 1997. Tubulin synthesis and assembly in differentiating neurons. Rev. Biochem. Cell. Biol. 75:103-117.
- **LI, Y.; BLACK, M.** 1996. Microtubule assembly and turn over in growing axons. J. Neurosci. 16:531-544.
- LITTLE, M.; KRAMER, M.; SINGHOFFER- WOWRA, S.; LUDUEÑA, R.** 1986. Evolutionary aspects of tubulin sequence. Ann. N.Y. Acad. Sci. 466:8-12.
- **LEWIS, S.; WANG, E.; COWAN, N.** 1988. Microtubule associated protein MAP-2 shares a microtubule binding motif with tau protein. Science. 242:936-939.
- **LEWIS, S.; IVANOV, I.; LEE, G.; COWAN, N.** 1989. Organization of microtubules in dendrites and axons is determined by a short hydrophobic zipper in microtubule- associated protein MAP-2 y tau. Nature. 343:498-505.
- **LINDWALL, G.; COLE, R.** 1984. Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. J. Biol. Chem. 259:5301-5305.
- LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, L.** 2000. [Molecular Cell Biology](#), 4th ed, W.H. Freeman and company. New York. 1296 pp.
- **MACCIONI, R.B.; MELLADO, W.** 1981. Characteristics of the *in vitro* assembly of tubulin from brain of *Cyprinus carpio*. Comp. Biochem. Phys. 70:375-380
- **MACCIONI, R.B.; SEEDS, N.** 1982. Residual nucleotide and tubulin's ability to polymerize with nucleotide analogs. Biol. Chem. 257:3334-3338.
- **MACCIONI, R.B.; ARECHAGA, J.** 1987. The cytoskeleton in cell differentiation and development. RL_ Oxford University Press. Washington D.C. 367pp.

- **MACCIONI, R.B.; VERA, J.; DOMINGUEZ, J.; AVILA, J.** 1989. A discrete repeated sequence defines a tubulin binding domain on microtubule-associated protein tau. *Arch. Biochem. Biophys.* 257:568-579.
- **MACCIONI, R.B.; VIAL, C.; CROSS, D.; GONZALEZ, M.** 1992. Specific macromolecular interactions modulating cytoskeleton organization. In: *Progresos en Biología Celular SEUM.* (Becerra, J.; Perez, J.; Fernandez, P. eds.). Universidad de Málaga, España. pp153-157.
- **MACCIONI, R.B.; CAMBIAZO, V.** 1995. Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. *Physiol. Rev.* 75:835-864.
- **MANDELKOW, E.; BIERNAT, J.; DREWES, G.; STEINER, B.; LICHTENBERG-KRAOG, H.; WILLE, N.** 1993. Microtubule-associated protein tau, paired helical filaments, and phosphorylation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 695:209-216.
- **MEJILLANO, M.; BARTON, J.; HIMES, R.** 1990. Stabilization of microtubules by GTP and analogs. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 166:653-660.
- **MITCHISON, T.; KIRSHNER, M.** 1984. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature.* 312:237-242.
- **MITCHISON, T.** 1993. Localization of an exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules. *Science.* 261:1044-1047.
- **MORAGA, D.; NUÑEZ, P.; GARRIDO, J.; MACCIONI, R.B.** 1993. A tau fragment containing a repetitive sequence induces bundling of actin filaments. *J. Neurochem.* 61:979-986.
- **MURRAY, L.** 1984. Dissassembly and reconstitution of a membrane microtubule complex. *J. Cell Biol.* 4:1481-1487.
- **NOGALES, E.; WHITTAKER, M.; MILLIGAN, R.; DOWNING, K.** 1999. High resolution model of the microtubule. *Cell.* 96:79-88.
- **OZER, R.; HALPAIN, S.** 2000. Phosphorylation-dependent localization of microtubule-associated protein MAP-2c to the actin cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell.* 11:3573-3587.
- **PARDEE, J.; SPUDICH, J.** 1982. Purification of muscle actin. *Met. Enz.* 85:164-181.
- **PEDROTTI, B.; COLOMBO, R.; ISLAM, K.** 1994. Interactions of microtubule-associated protein MAP2 with unpolymerized and polymerized tubulin and actin using a 96-well microtiter plate solid-phase immunoassay. *Biochemistry.* 33:8798-88806.
- **POLLARD, T.** 1984. Polymerization of ADP-actin. *J. Cell Biol.* 99:769-777.

- **POLLARD, T.; ALMO, S.; QUIRK, S.; VINSON, V.; LATTMAN, E.** 1994. Structure of actin binding proteins: insights about function at atomic resolution. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 10:207-249.
- **POLLARD, T.; BORISY, G.** 2003. Cellular motility driven by assembly of actin filaments. *Cell.* 112:453-465.
- **PORTER, K.** 1984. The cytomatrix: a short history of its study. *J. Cell Biol.* 99:3-12.
- **PRYER, N.; WALKER, R.; SKEEN, V.; BURNS, B.; SOPOEIRO, M.; SALMON, E.** 1992. Brain microtubule-associated proteins modulate microtubule dynamics instability *in vitro*. *J. Cell Sci.* 103:965-976.
- **RIVAS-BERRIOS, A.; HERNANDEZ, M.; DOMINGUEZ, J.; AVILA, J.; MACCIONI, R.B.** 1990. Common antigenic determinants of the tubulin binding domains of the microtubule-associated proteins MAP-2 and tau. *Biochim. Biophys. Act.* 1040:382-390.
- **SANDOVAL, I.; VANDEKERCKHOVE, J.** 1981. A comparative study of the *in vitro* polymerization of tubulin in the presence of the microtubule-associated proteins MAP2 and tau. *J. Biol. Chem.* 256:8795-8800.
- **SAUDERS, W.** 1999. Action at the ends of microtubules. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 11:129-133
- **SELDEN, S.; POLLARD, T.** 1986. Interaction of actin filaments with microtubules is mediated by microtubule-associated proteins and regulated by phosphorylation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 466:803-812.
- **SERRANO, L.; AVILA, J.; MACCIONI, R.B.** 1984. Controlled proteolysis of tubulin by substilisin: Localization of the site for MAP-2 interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:5989-5993.
- **SHAEFER, D.; COOPER, J.** 1995. Control of actin assembly at filament ends. *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.* 11:497-518.
- **SHEA, T., BEERMANN, M.** 1994. Respective roles of neurofilaments, microtubules, MAP-1B, and tau in neurite outgrowth and stabilization. *Mol. Biol. Cell.* 8:863-875.
- **SHU, H.; JOSHI, H.** 1995. Gamma-tubulin can both nucleate microtubule assembly and self-assemble into novel tubular structures in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 130:1137-1147.
- **SOBRIDO, M.; MILLER, B.; HARLIOGLU, N.; ZHAUKAREVA, V.; JIANG, Z., NASREDDINE, Z.; LEE, V.; CHOW, T.; WILHELSEN, K.; CUMMINGS, J.;**

- WU, J.; GESCHRUND, D.** 2003. Novel tau polymorphism, tau haplotype and splicing in familial and sporadic frontotemporal dementia. *Arch. Neurol.* 60:698-702.
- **SULLIVAN, K.** 1988. Structure and utilization of tubulin isotypes. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 4:687-716.
- **TAKUMA, H.; ARAWAKA, S.; MORI, H.** 2003. Isoforms changes of tau protein during development in various species. *Brain Res. Dev. Brain.*142:121-127.
- **TOKURAKU, K.; KATSUKI, M.; NAKAWANA, H.; KOTANI, S.** 1999. A new model for microtubule-associated protein (MAP) induces microtubule assembly. The Pro-Rich region of MAP-4 promotes nucleation of microtubule assembly in vitro. *Eur. J. Biochem.* 259:158-166.
- **UZBEKOV, R.; KIREYER, M.; PRIGENT, C.** 2002. Centrosome separation: respective role of microtubules and actin filaments. *Biol. Cell.* 94:275-288.
- **VALLE, R.** 1980. Structure and phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP-2). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:3206-3210.
- **VALLE, R.; COPPIN, C.; MALIK, F.; KULL, F.; MILLIGAN, R.** 1994. Tubulin GTP hydrolysis influences the structure, mechanicals, properties and kinesin-driven transport of microtubules. *J. Biol. Chem.* 269:23769-23775.
- **VELAZQUEZ, E.; PEREZ DEL CAMPO, Y.; DIAZ, M.; BARNET, J.; ORTEGA, M.** 2002. Las Taupatías. *Rev. Mex. Neuroci.* 3:165-167.
- **VERA, J.** 1988. Measurement of microgram quantities of protein by a turbidimetric procedure. *Anal. Biochem.* 174:187-196.
- **VERA, J.; CORALIA, I.; RIVAS, C.; MACCIONI, R.B.** 1988. Heat-stable microtubule protein MAP-1 binds to microtubules and induces microtubule assembly. *FEBS Letts.* 232:159-162.
- **WEBER, K.; OSBORN, M.** 1985. Moléculas de la matriz celular. *Invest. Cien.* 76-88.
- **WEISENBERG, R.** 1972. Microtubule formation *in vitro* in solutions containing low calcium concentrations. *Science.* 177:1104-11
- **WEISENBERG, R.; DEERY, W.; DICKINSON, P.** 1986. Tubulin-nucleotide interactions during the polymerization and depolymerization of microtubules. *Biochemistry.* 15:4248-4254.
- **WICHE, G.; OBERKANINS, C.; HIMNLER, A.** 1991. Molecular structure and function of Microtubule-Associated Proteins. *Int. Rev. Cytol.* 124:217-273.

- WITTMAN, M.; KADOW, S.; VYRAS, D.; LEE, F.; ROSE, W., LONG, B.; FAIRCHILD, C.; JOHNSTONK, J. 2001. Synthesis and antitumor activity of novel paclitaxel-chlorambucil hybrids. *Bioorg. Med. Chem. Letts.* 11:811-814.