

MARCADOR BIOLÓGICO DE LA CALIDAD DE LA CARNE BOVINA: PURIFICACION, CARACTERIZACION Y LOCALIZACION CELULAR DE LA ANTITROMBINA III

Carlos Herrera, Graciela Ruiz, Lorena Vargas, Gabriela Arroyo. Universidad de Guanajuato (UNESS). Privada de Arteaga s/n, C.P. 38900, Salvatierra, Gto. Fax: (466) 6633413, email: caherhe_23@hotmail.com

Serpina, Terneza, Bovino

Introducción. La terneza es el atributo de calidad más importante de la carne. Entre diferentes variables de orden biológico y fisicoquímico, *in vivo* los inhibidores de serina peptidasas (SERPINAS) como la antitrombina III (AT-III), han sido los mejores indicadores de la terneza de la carne de bovino (1). En la sangre, la actividad de la trombina está controlada por la AT-III, un inhibidor específico. La trombina extravascular está regulada, y la AT-III es un candidato potencial. La enzima en las células musculares se localiza en la parte externa de la membrana del plasma en la unión neuromuscular y su regulación es en dicha unión (2). En bovino, su presencia es desconocida. La AT-III es hallada en fibras musculares de ratón sugiriendo que esta serpina se expresa en células musculares (3). A pesar que la AT-III debe estar expresada en el músculo esquelético de bovino, esta proteína nunca ha sido purificada y caracterizada en dicho tejido.

El objetivo del presente trabajo es purificar y caracterizar la AT-III del músculo esquelético de bovino; marcador biológico de la calidad de la carne.

Metodología. La purificación de la AT-III fue realizada de un extracto de músculo *Diafragma* de bovino. El proceso implica cinco etapas cromatográficas. Se evaluó: la actividad inhibitoria contra la tripsina en las fracciones recolectadas, la titracion de dicha enzima y la estequiometría de la interacción enzima/inhibidor. Se midió las constantes de asociación y electroforesis en gel de poliacrilamida fue realizada. La estabilidad al pH del inhibidor purificado fue analizada en un rango de pH (2-12). La estabilidad a la temperatura fue determinada entre 40-100 °C. La secuencia N-Terminal de la AT-III fue realizada con un secuenciador Applied Biosystems 477A. El análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF fue realizado con la tripsina, enzima de digestión. La inmunolocalización de la AT-III fue efectuada en cortes transversales del mismo músculo utilizando un anticuerpo policlonal dirigido contra la AT-III humana.

Resultados y discusión. La identidad de la serpina purificada fue establecida por diferentes métodos analíticos. El análisis SDS-PAGE de la AT-III purificada mostró una banda con un peso molecular estimado de 58 kDa (Fig. 1, línea b). La especificidad del anticuerpo policlonal dirigido contra la AT-III humana fue analizada con extracto crudo de músculo y de serpina purificada. Como se muestra en la Fig. 2a, después del SDS-PAGE, el anticuerpo revela una banda en el extracto bruto (línea 1) migrando similarmente la AT-III purificada (línea 2). En condiciones no desnaturizantes, el anticuerpo reconoce una banda en el extracto crudo (Fig. 2b, línea 1) migrado como la AT-III purificada (Fig. 2b, línea 2). Estos descubrimientos sugieren una especificidad alta del anticuerpo, el cual fue utilizado en la localización de la AT-III en el tejido muscular. La espectrometría de masas identifica esta proteína como la AT-III.

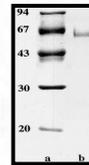


Fig. 1. El inhibidor fue migrado en condiciones desnaturizantes en un gel de poliacrilamida a 12.5% y revelado por coloración el plata (a) Marcadores de peso molecular, (b) AT-III purificada

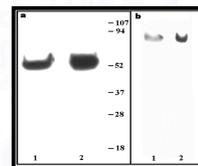


Fig. 2. Análisis por Western-blot con el anticuerpo policlonal contra la AT-III humana. (2a, línea 1): extracto bruto; (2a, línea 2): AT-III purificada. En condiciones no desnaturizantes (2b, línea 1): extracto bruto; (2b, línea 2): AT-III purificada

El tratamiento de la AT-III por 15 min. a temperaturas entre 40 y 100 °C confirma la baja estabilidad térmica de la AT-III bovina (Fig. 3a). La AT-III bovina es relativamente estable solo a pH 10 (Fig. 3b).

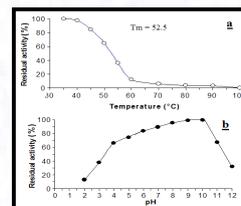


Fig. 3. Actividad de la AT-III (a) calentada 15 min., a temperaturas entre 40-100 °C. (b) preincubada por 1h a diferentes pH entre 2-12.

Cuadro 1. Constantes de velocidad de asociación (Kass) para serina peptidasas

Peptidasa	kass (M-1, s-1)
Tripsina	5 x 10 ⁵
Quimotripsina	6.8 x 10 ⁴
Plasmina	1.7 x 10 ⁴
Trombina	1.8 x 10 ⁵

El patrón de actividad inhibitoria de la AT-III de músculo y las constantes de velocidad de asociación (Cuadro 1) indican que todas las peptidasas son sensibles a la acción inhibitoria de esta serpina. La AT-III fue inmunolocalizada entre las membranas del plasma y las miofibrillas donde está altamente concentrada.

Conclusiones. La AT-III nunca antes había sido purificada del tejido muscular y esta es la primera vez que un procedimiento de purificación es propuesto. El presente trabajo debe ser considerado como una nueva vía de información en los estudios sobre el rol de relación trombina/antitrombina en el desarrollo del músculo y su influencia en la terneza de la carne. La calidad más buscada por los consumidores.

Bibliografía.

- 1.- Zamora, F. et al. (2005). Serine peptidase inhibitors, the best predictor of beef ageing amongst a large set of quantitative variables. *Meat Sci.*, 71, 730-742.
- 2.- Liu, Y. et al. (1994). Proteolytic action of thrombin is required for electrical activity-dependent synapse reduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91, 10300-10304.
- 3.- Businaro, R. et al. (1995). Immunohistochemical detection of three serum protease inhibitors in mouse skeletal muscle by confocal laser scanning microscopy. *Ital. Anat. Embryol.* 100, 123-130.