



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



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

Carlos Herrera, Graciela Ruiz, Blanca Gómez, Gabriela Arroyo, Sergio Alejo, Jorge Tamayo. Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad de Guanajuato. Salvatierra, Gto. C.P. 38900. Email: caherhe_23@hotmail.com

Palabras clave: Serpina, Terneza, Bovino

Introducción. La terneza es el atributo de calidad más importante de la carne. *In vivo* los inhibidores de serina peptidasas (SERPINAS) como la antitrombina III (AT-III), son los mejores indicadores de la terneza (1). 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 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 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 midieron las constantes de asociación y SDS-PAGE fue realizado. 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. La inmunolocalización de la AT-III fue efectuada en cortes transversales de músculo utilizando un anticuerpo policlonal dirigido contra la AT-III humana.

Resultados. La identidad de la serpina purificada fue establecida por métodos analíticos. El análisis SDS-PAGE de la AT-III purificada mostró una banda de 58 kDa (Fig. 1, línea b). La especificidad del anticuerpo policlonal dirigido contra la AT-III humana fue analizada con extracto 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 (línea 1) migrando similarmente la AT-III purificada (línea 2). En condiciones no desnaturizantes, el anticuerpo reconoce una banda en el extracto (Fig. 2b, línea 1) migrando como la AT-III purificada (Fig. 2b, línea 2). Estos descubrimientos sugieren una alta especificidad 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.

El tratamiento de la AT-III 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). El patrón de actividad inhibitoria de la AT-III de músculo y las constantes de velocidad de asociación (Tabla 1) indican 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.

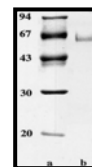


Fig. 1. El inhibidor fue migrado en condiciones desnaturizantes en un gel de poliacrilamida a 12.5% y revelado por coloración el plata (a) Marcadores de peso molecular, (b) AT-III purificada.

Fig. 2. Análisis por Wester-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.

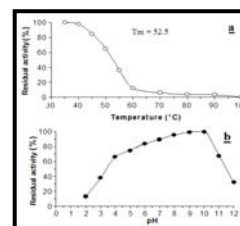
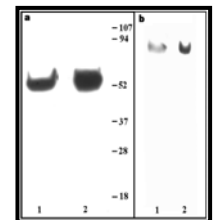


Fig. 3. Actividad de la AT-III (a) calentada 15 min. a temperaturas entre 40-100 °C. (b) preincubada por 1h a diferentes pH entre 2-12.

Tabla 1. Constantes de velocidad de asociación (K_{ass}) para serina peptidasas.

Peptidasa	k _{ass} (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

Conclusiones. La AT-III nunca antes había sido purificada del tejido muscular y 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). *Meat Sci.* 71: 730-742.
2. Liu, Y. et al. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 10300-10304.
3. Businaro, R. et al. (1995). *Ital. Anat. Embryol.* 100: 123-130.



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería

