

## Tesis de Posgrado

# Identificación de proteasas alcalinas de músculo de pescado y su acción sobre proteínas miofibrilares

Folco, Eduardo Julio Emilio

1987

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Folco, Eduardo Julio Emilio. (1987). Identificación de proteasas alcalinas de músculo de pescado y su acción sobre proteínas miofibrilares. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2190\\_Folco.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2190_Folco.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Folco, Eduardo Julio Emilio. "Identificación de proteasas alcalinas de músculo de pescado y su acción sobre proteínas miofibrilares". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1987. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2190\\_Folco.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2190_Folco.pdf)

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

IDENTIFICACION DE PROTEASAS ALCALINAS DE MUSCULO  
DE PESCADO Y SU ACCION SOBRE PROTEINAS MIOFIBRILARES

Autor: EDUARDO JULIO E. FOLCO  
Director de tesis: Dr. JORGE J. SANCHEZ  
Lugar de trabajo: CENTRO DE INVESTIGACIONES  
DE TECNOLOGIA PESQUERA,  
INSTITUTO NACIONAL DE  
TECNOLOGIA INDUSTRIAL

*2.190  
EJ:2.*

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

1987



A mi padre

con los demás puede compartirlo

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge J. Sánchez, con pocas palabras protocolares, como a él le gusta. Además, siempre es difícil expresarle formalmente el agradecimiento a un amigo.

A Celina B. Martone, por su importante aporte a mi formación, especialmente en mis tiempos de Becario de Iniciación. Pero, sobre todo, por la amistad, compañerismo y voluntad de colaboración que me brindó permanentemente a lo largo de siete años de trabajo en equipo.

Al Dr. Raúl E. Trucco, por haberme brindado la posibilidad de iniciarme en la investigación científica.

Al Dr. Pedro Cattáneo, por su contribución a mi formación universitaria y su permanente colaboración como Consejero de Estudios.

A Tatiana Zirulnikow, Olga Vergara y José Porretto, compañeros del CITEP que, cada uno a su manera, contribuyeron a la realización de este trabajo.

Al Centro de Virología Animal por el uso del microscopio electrónico, y a Necker Vegliante por su excelente asistencia técnica en lo concerniente al mismo.

Al INTI, el CONICET, la SECyT y la CIC, por haber otorgado los medios necesarios para realizar esta investigación.

## ABREVIATURAS

A: actina

$\alpha$ -A:  $\alpha$ -actinina

Act: actividad

Act. esp: actividad específica

BAEE:  $\alpha$ -N-benzoíl-L-arginina etil éster

BTEE: N-benzoíl-L-tirosina etil éster

DEAE: dietilaminoetil

DO<sub>335</sub>: densidad óptica a 335 nm

EDTA: etilendiaminotetraacetato sódico

2-MCE: 2-mercaptoetanol

MP: cadena pesada de miosina

N: nebulina

N.D.: no determinado

p-OHMB: p-hidroximercuribenzoato

PM: peso molecular

Prot.: proteína

SBTI: inhibidor de tripsina de semilla de soja

SDS: dodecil sulfato de sodio

T: titina

TAME: p-tosil-L-arginina metil éster

TCA: ácido tricloroacético

Temp.: temperatura

TLCK: N- $\alpha$ -p-tosil-L-lisina clorometil cetona

TPCK: L-1-tosilamida-2-fenil-etilclorometil cetona

**Tris: tris (hidroximetil) amino metano**

**UA: unidad de actividad enzimática**

**UI: unidad de actividad inhibitoria de tripsina**

## I N D I C E

|  |        |
|--|--------|
| <u>INTRODUCCION</u>  | 1      |
| I.1. Degradación de proteínas en células vivas.....  | 1      |
| I.2. Degradación de proteínas musculares.....  | 9      |
| I.3. Sistemas proteolíticos musculares.....  | 12     |
| I.4. Mecanismos de control de las enzimas proteolíticas.....                                     | 19     |
| I.5. Cambios en el músculo post-mortem.....  | 23     |
| I.6. Objetivos del trabajo.....  | 31     |
| <br><u>MATERIALES Y METODOS</u>  | <br>33 |
| M.1. Pescado.....  | 33     |
| M.2. Reactivos.....  | 33     |
| M.3. Preparación de extractos de músculo.....  | 33     |
| M.4. Cromatografía de extractos crudos de músculo en<br>columna de DEAE-Sephacel.....            | 34     |
| M.5. Medición de actividades proteolítica e inhibito-<br>ria de tripsina.....                    | 35     |
| M.6. Medición de actividad esterásica de la proteasa I   | 36     |
| M.7. Determinación de pesos moleculares por cromato-<br>grafía en columna de Sephadex G-200..... | 36     |
| M.8. Preparación de miosina, actomiosina y miofibri-<br>llas.....                                | 37     |



|   |    |
|---|----|
| M.9. Tratamiento enzimático de miosina y actomiosina..  | 37 |
| M.10. Tratamiento de miofibrillas con proteasa I.....   | 38 |
| M.11. Incubación de homogenatos totales de músculo....  | 39 |
| M.12. Electroforesis.....   | 40 |
| M.13. Microscopía electrónica.....  | 40 |
| M.14. Determinación de proteínas.....   | 41 |
| <br>  |    |
| <u>RESULTADOS</u>   | 42 |
| <br>  |    |
| R.1. Detección de actividades proteolítica alcalina e<br>inhibitoria de tripsina en extractos de músculo..            | 42 |
| R.2. Caracterización de la actividad proteolítica al-<br>calina presente en extractos calentados de múscu-<br>lo..... | 45 |
| R.3. Caracterización de la actividad inhibitoria de<br>tripsina presente en extractos crudos de músculo.              | 45 |
| R.4. Aislamiento de proteasas alcalinas e inhibidor de<br>tripsina por cromatografía de intercambio iónico.           | 51 |
| R.5. Dependencia de las actividades proteolíticas con<br>la temperatura y el pH.....                                  | 53 |
| R.6. Efecto de la urea sobre la dependencia de las ac-<br>tividades proteolíticas con la temperatura.....             | 53 |
| R.7. Tipificación de las proteasas.....   | 57 |
| R.8. Efecto del NaCl sobre las actividades proteolíti-<br>cas.....  | 60 |

|  |        |
|--|--------|
| R.9. Estimación de los pesos moleculares de las proteasas y el inhibidor de tripsina.....                    | 60     |
| R.10. Inactivación térmica del inhibidor de tripsina..   | 60     |
| R.11. Efecto del inhibidor sobre las proteasas I y II.   | 64     |
| R.12 Efecto de las proteasas I y II sobre miosina y actomiosina aisladas.....                                | 67     |
| R.13. Efecto del inhibidor sobre la degradación de miosina por la proteasa I.....                            | 71     |
| R.14. Acción de la proteasa I sobre miofibrillas intactas.....   | 75     |
| R.14.1. Microscopía óptica.....  | 75     |
| R.14.2. Microscopía electrónica.....   | 76     |
| R.14.3. Análisis electroforético.....  | 80     |
| R.15. Efecto del inhibidor sobre la degradación de miofibrillas por la proteasa I.....                       | 87     |
| R.16. Evaluación de la posible participación de la proteasa I en la proteólisis miofibrilar post-mortem..... | 87     |
| R.16.1. Acción de la proteasa I sobre miofibrillas a 0°C.....  | 90     |
| R.16.2. Cromatografía en DEAE-Sephacel de extractos crudos de músculo almacenado a 0°C.....                  | 90     |
| <br><u>DISCUSION</u>   | <br>95 |

CONCLUSIONES

106

REFERENCIAS

108



## I.1. DEGRADACION DE PROTEINAS EN CELULAS VIVAS

Las proteínas desempeñan papeles clave en los procesos biológicos que ocurren en todo organismo viviente, cumpliendo una enorme variedad de funciones, tales como la catálisis de reacciones químicas celulares, el transporte y acumulación de sustancias, la protección inmune del organismo contra agentes extraños, el mantenimiento de estructuras celulares y tisulares, el control del crecimiento y la diferenciación celular y la intervención en procesos contráctiles.

Las proteínas, al igual que la mayoría de los componentes celulares, sufren un permanente recambio en la célula viva, de modo tal que los niveles de proteínas intracelulares están determinados por el balance entre las velocidades de síntesis y degradación. Si bien la síntesis proteica es un proceso extremadamente complejo y que requiere de una gran precisión y fidelidad, en la actualidad se conoce con bastante detalle la maquinaria que sintetiza proteínas. En cambio, mucho menos es lo que se conoce de los procesos de degradación proteica, y hay numerosas evidencias de la existencia de múltiples vías degradativas.

Desde el punto de vista fisiológico, el recambio continuo de proteínas provee a los tejidos de gran flexibilidad para el ejercicio de sus funciones metabólicas, ya que permite la rápida fluctuación de los niveles intracelulares de enzimas clave en distintos procesos como respuesta a estímulos nutri-

cionales u hormonales. En un sentido más amplio, la degradación de proteínas posibilita la adaptación de los organismos a situaciones ambientales adversas, tales como el ayuno de aminoácidos, durante el cual se produce un incremento en la degradación proteica, proveyendo así a las células de aminoácidos necesarios para sintetizar enzimas adecuadas a la situación.

Otra función importante de la degradación es la destrucción rápida de proteínas anormales, que aparecen ya sea por errores de síntesis, desnaturalización o modificación química, y que pueden ser nocivas para la célula.

Siempre que se hacen consideraciones acerca de cuáles son los mecanismos que tienen las células para degradar proteínas parece necesario hacer mención a los lisosomas, ya que a estas organelas, debido a sus altas concentraciones de proteasas ácidas, se les ha atribuido desde hace bastante tiempo una función central en el catabolismo proteico. Los lisosomas son responsables de la digestión de la mayoría de las proteínas endocitadas por la célula (1,2), pero también intervienen en la degradación de proteínas celulares en situaciones en las cuales la velocidad total de proteólisis está aumentada, tales como las que se producen en la perfusión de hígados con medios que carecen de insulina (3) o aminoácidos (4). En estas condiciones, el aumento en la degradación proteica va acompañado por una rápida aparición de vacuolas autofágicas conteniendo constituyentes celulares reconocibles

en aproximadamente la misma proporción que en el citoplasma (5-8), las que posteriormente se fusionan con lisosomas primarios para formar vacuolas degradativas (8), en las cuales ocurre la rápida digestión del material autofagocitado. Este proceso, denominado macroautofagia, fue estudiado en detalle en hígado (5-8) y músculo cardíaco (9), pero hay evidencias que hacen suponer que es un mecanismo común a la mayoría de las células eucarióticas (10).

Esta vía proteolítica lisosomal es esencialmente no selectiva (11), ya que es una herramienta de la célula para responder ante situaciones de emergencia desde el punto de vista hormonal y nutricional. En cambio, la proteólisis basal, que ocurre en condiciones normales de aporte de nutrientes, hormonas y factores de crecimiento, es un proceso altamente selectivo, lo cual se refleja en las grandes diferencias en la velocidad de degradación de distintas proteínas en un mismo órgano. Por tomar un ejemplo, podemos mencionar que en hígado de rata hay proteínas cuyos tiempos de vida media varían entre 12 minutos (12) y 25 días (13).

Se han realizado numerosos estudios con el objeto de elucidar las bases bioquímicas de esa selectividad, y hay bastante evidencia de que la gran variación en los tiempos de vida media de diferentes proteínas podría explicarse, en parte, por diferencias inherentes de las mismas en la susceptibilidad al ataque proteolítico. En efecto, se encontró buena correlación entre las velocidades de degradación de pro-

teínas in vivo y su sensibilidad a proteasas en sistemas in vitro (14-19). Es interesante señalar que se obtuvieron resultados similares utilizando proteasas con diferente especificidad (tripsina, quimotripsina, subtilisina, papaína, proteasas lisosomales), lo cual sugiere que las velocidades degradativas deben estar determinadas por ciertos rasgos conformacionales generales de las proteínas sustrato (plegamiento, compactación, etc.) más que por diferencias localizadas en sus secuencias de aminoácidos. Por ese motivo, se realizaron distintos estudios tendientes a correlacionar la velocidad de catabolismo de ciertas proteínas con sus características físico-químicas (hidrofobicidad, carga, tamaño, etc.). Así, se encontró que las proteínas con más residuos hidrofóbicos en su superficie son las que se degradan más rápidamente in vivo (20), que los polipéptidos de mayor peso molecular tienden a degradarse a mayor velocidad que los más pequeños (16,21), y que las proteínas con bajo pH isoeléctrico tienen mayor tendencia a degradarse que aquellas con pH isoeléctrico neutro o alcalino (22).

De todas maneras, sean cuales fueren los aspectos de la estructura de una proteína que determinan la velocidad con que se degrada en condiciones normales de estado estacionario, esa heterogeneidad en los tiempos de vida media hace difícil explicar la proteólisis basal por una vía lisosomal. Sin embargo, la información sobre este punto es bastante controvertida. Por una parte, hay trabajos que muestran que la



inhibición de la proteólisis lisosomal por efecto de agentes lisosomotrópicos (23-27), de inhibidores microbianos de proteasas lisosomales (25,26,28) o inhibidores del sistema microtubular que perturban el funcionamiento del sistema lisosomal-vacuolar (29), afectan mucho más a la degradación de proteínas endocitadas o a la proteólisis aumentada por ayuno que a la proteólisis basal, lo cual sugeriría que ésta ocurre esencialmente por una vía no lisosomal. Esta idea está reforzada por el hallazgo de que proteínas microinyectadas en células en cultivo se degradan preferiblemente en el citoplasma (30), aunque no se pueda descartar que fragmentos de proteólisis sean captados por lisosomas en una segunda etapa, completándose así la degradación (30). De este modo, la selectividad de la proteólisis estaría determinada por la capacidad de sistemas proteolíticos solubles para degradar distintas proteínas. Por otro lado, hay trabajos en los cuales se concluye lo contrario, ya que se describe que varios inhibidores de proteasas lisosomales afectan tanto a la proteólisis basal como a la aumentada por ayuno (31-33), y la selectividad de la proteólisis basal podría explicarse por una adsorción selectiva de proteínas a la membrana lisosomal (34-37), seguida de una invaginación de la misma (37), o bien por interacción selectiva de proteínas con membranas del retículo endoplásmico (38), con formación de pequeñas vesículas que posteriormente se fusionarían con lisosomas (8).

Además de las proteínas cuya velocidad de recambio metabólico es relativamente baja, y que en hígado constituyen alrededor del 99% de la proteína celular total (8), existe otra clase de proteínas, cuyos tiempos de vida media son mucho más cortos, y que por lo general son enzimas que desempeñan funciones clave en la regulación de distintas vías metabólicas; el hecho de tener velocidades de recambio elevadas permite que sus niveles fluctúen con gran rapidez, proveyendo a la célula de una gran flexibilidad en la respuesta a factores ambientales (39). Existen numerosas evidencias que indican que la degradación de esta clase de proteínas, así como también la de las proteínas anormales, cuyos tiempos de vida media son muy cortos, es un proceso de naturaleza no lisosomal. En efecto, su degradación no se ve afectada prácticamente por ayuno ni hormonas (40-42), así como tampoco por inhibidores de la proteólisis lisosomal (33,42-45).

De todas estas consideraciones surge que, a pesar de los significativos avances realizados en la elucidación de los mecanismos de degradación de proteínas, todavía hay muchos interrogantes por responder, y uno de los puntos centrales de interés continúa siendo el porqué de la selectividad de la proteólisis intracelular. En los últimos años se describieron dos sistemas a los cuales se les atribuyó la función de "marcar" a la proteína que va a ser degradada, aumentando así su susceptibilidad a la proteólisis. En uno de ellos, la marca consiste en la oxidación de determinados re-

siduos histidina y/o lisina (46,47), lo cual da como resultado una enzima inactiva, que es degradada en una segunda etapa por proteasas capaces de discriminar entre la enzima modificada y la nativa (46,48-50). Este mecanismo fue descrito inicialmente para la inactivación de glutamina sintetasa bacteriana (46), pero posteriormente se demostró su efectividad sobre veinte enzimas purificadas de distintas fuentes (bacterias, levaduras, hígado de rata y músculo de conejo) (51,52). El mecanismo de la inactivación consiste en las reducciones enzimáticas de  $O_2$  a  $H_2O_2$  y de  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  a expensas de diversos dadores de electrones (NADH, NADPH, xantina, acetaldehído, glucosa), seguidas de una reacción no enzimática entre  $H_2O_2$  y  $Fe^{2+}$  con producción de "oxígeno activado", el cual oxida ciertos aminoácidos de la enzima a marcar, provocándole cambios conformacionales que la hacen susceptible al ataque proteolítico (51). Han sido descritos ya siete sistemas enzimáticos diferentes en bacterias e hígado de mamíferos capaces de catalizar la oxidación (53). Un punto importante de este mecanismo es el hecho que los sustratos protegen a las enzimas de la inactivación oxidativa (46,48-51), lo cual garantiza una regulación específica del proceso y permite explicar las variaciones en la velocidad de degradación de enzimas individuales en respuesta a fluctuaciones en la concentración de sus sustratos producidas en distintos status nutricionales.

El otro sistema capaz de seleccionar específicamente

a una determinada proteína para su degradación es el de la ubiquitina, sistema proteolítico dependiente de ATP que fue descrito en reticulocitos (56-62). La ubiquitina es un pequeño polipéptido (PM=9kDa) que se conjuga con las proteínas "sustrato" provocándoles cambios conformacionales que las hacen susceptibles a proteasas específicas para degradar a esos conjugados. En una primera etapa, se produce una activación del aminoácido C-terminal (glicina) de la ubiquitina por formación de un enlace tioéster con una enzima activante, en reacción dependiente de la hidrólisis de ATP. Posteriormente, esos tioésteres reaccionan con grupos  $\epsilon$ -amino de lisinas presentes en la proteína sustrato, dando los conjugados que, en una tercera etapa son degradados por proteasas específicas con liberación de péptidos unidos a ubiquitina. Finalmente, una amidasa separa esos péptidos de las moléculas de ubiquitina, que pueden ser reutilizadas. Este sistema parece ser responsable de la degradación selectiva de proteínas anormales y de la eliminación de muchas proteínas que dejan de ser necesarias al producirse la maduración de reticulocito en eritrocito. Sin embargo, a pesar de que la ubiquitina fue encontrada en una gran variedad de tejidos de mamíferos (60), el sistema degradativo sólo pudo detectarse en reticulocitos, por lo que no se puede generalizar acerca de su verdadera función biológica.

Hay otras modificaciones post-traduccionales que también han sido propuestas como posibles mecanismos de regulación

de la vida media de ciertas enzimas, tales como la fosforilación de residuos serina o treonina, la glicosilación, la carbamilación de grupos  $\epsilon$ -amino de residuos lisina, la deamidación de residuos glutamina o asparagina, la oxidación de residuos metionina, etc. (53,63). Además, otro factor que influye en la velocidad de degradación de ciertas enzimas es la presencia o ausencia de sus sustratos, productos o cofactores. En efecto, hay numerosos ejemplos en los cuales la presencia de sustratos aumenta la vida media de determinadas enzimas in vivo y disminuye su vulnerabilidad a proteasas in vitro (63,64). Contrariamente, la presencia de productos finales o la ausencia de cofactores pueden promover la degradación de ciertas enzimas (63-65).

A la luz de todos estos estudios queda claro que las células tienen múltiples vías para degradar sus proteínas. A pesar de que estos mecanismos han sido estudiados en mayor detalle en tejidos no musculares, parece bastante probable que tengan muchos puntos en común en distintos tejidos, incluyendo el músculo.

## I.2. DEGRADACION DE PROTEINAS MUSCULARES

El músculo esquelético constituye el 40-45% del peso corporal de los vertebrados, y es considerado como su mayor reserva de proteínas, ya que, en situaciones de ayuno, los aminoácidos provenientes de la degradación de proteínas mus-

culares sirven directamente como fuente de energía, actúan como precursores para la gluconeogénesis hepática y participan en la síntesis de proteínas esenciales para la adaptación al ayuno (66,67).

La velocidad de degradación de proteínas musculares también se modifica como respuesta a otras situaciones que requieren una adaptación del organismo, tales como variaciones en el nivel de actividad muscular (68), tratamientos hormonales (69,70), procesos infecciosos, febriles o traumáticos (71-73), distrofia muscular (74), atrofia por denervación (69), etc., y está precisamente regulada por la disponibilidad de una gran variedad de factores hormonales y nutricionales tales como insulina, glucocorticoides, prostaglandinas, hormonas tiroideas, aminoácidos, sustratos oxidables y  $O_2$  (69,75-79). Aunque el músculo contiene todos los elementos del sistema lisosomal (80) y es capaz de realizar autofagia, el funcionamiento de los mecanismos celulares responsables de la degradación proteica in vivo y sus modificaciones en diferentes condiciones no está claro hasta el presente.

Entre las distintas clases de proteínas presentes en el músculo, las miofibrilares, que constituyen más del 50% de su proteína total, han recibido especial atención de parte de fisiólogos y bioquímicos por ser las responsables de la característica distintiva de la célula muscular, que es la transformación de la energía química en mecánica para la contracción, pero también han sido extensivamente estudiadas

por tecnólogos alimentarios, ya que son responsables en gran parte de la capacidad de retención de agua, de la capacidad emulsificante y de la terneza de las carnes (81). Además, son de interés desde el punto de vista nutricional, porque contienen proporciones relativamente altas de aminoácidos esenciales (81).

Hay varias evidencias que sugieren que al menos las primeras etapas en la degradación de proteínas miofibrilares son eventos extralisosomales. Por un lado, existe heterogeneidad en los tiempos de vida media de distintas proteínas miofibrilares (82), lo cual hace pensar en un mecanismo selectivo, presumiblemente no lisosomal. Por otra parte, en músculos tratados con inhibidores de la proteólisis lisosomal, tales como leupeptín y cloroquina, la degradación de miosina previamente marcada con isótopos radiactivos, y probablemente de otras proteínas miofibrilares, no se ve afectada a pesar de inhibirse la proteólisis celular general (83, 84). Además, en estudios realizados sobre la involución del músculo intersegmental de insectos en metamorfosis, que es un excelente modelo de proteólisis acelerada, se observa una primera etapa de disolución de miofilamentos no afectada por inhibidores de la proteólisis lisosomal, seguida de una segunda etapa sensible a dichos inhibidores, en la cual se produce la involución y la rápida destrucción de las fibras, paralelamente al aumento del número y tamaño de los lisosomas y a la aparición de vacuolas autofágicas que contienen

organelas y estructuras membranosas, pero no elementos miofibrilares (85-87). Estos resultados sugieren que la degradación de miofibrillas probablemente se iniciaría por la acción de proteasas solubles que desarmarían su estructura, para, luego, en una segunda etapa, completarse su degradación en el interior de los lisosomas. Por el contrario, estudios recientes realizados con músculo de rata perfundido con inhibidores de la proteólisis lisosomal, en los cuales se utiliza la liberación de 3-metil histidina como medida de la degradación de proteínas miofibrilares, sugieren que dicho proceso ocurre total y exclusivamente por un mecanismo no-lisosomal, tanto en condiciones basales como de ayuno (88).

De todas maneras, para llegar a la elucidación de los mecanismos degradativos se hace necesario el conocimiento de las enzimas proteolíticas presentes en el tejido muscular, las cuales han sido extensivamente estudiadas en mamíferos y aves.

### I.3. SISTEMAS PROTEOLITICOS MUSCULARES

De las trece peptidasas lisosomales conocidas, sólo siete han sido encontradas en tejido muscular (89). Tres de ellas son exopeptidasas (catepsina A o carboxipeptidasa A, catepsina B<sub>2</sub> o carboxipeptidasa B y catepsina C o dipeptidil-aminopeptidasa I), una es tanto aminopeptidasa como endopeptidasa (catepsina H), y las tres restantes son endopeptida-



sas (catepsinas B, D y L). Debido a esta combinación de exo- y endopeptidasas, a la amplia especificidad de varias de ellas, a su alta concentración en el interior de los lisosomas y a que el pH intralisosomal, de alrededor de 4,5 (23), es cercano al pH en el cual la mayoría muestra máxima actividad (89), parece muy probable que una vez que las proteínas son internalizadas en los lisosomas sean rápidamente convertidas en aminoácidos y pequeños péptidos (90). Estudios realizados con las catepsinas B (91), D (91,92) y L (93) purificadas demostraron que dichas enzimas tienen gran capacidad para degradar proteínas miofibrilares, tanto aisladas como formando parte de la estructura de las miofibrillas. Sin embargo, por lo expuesto anteriormente, su participación en las etapas iniciales de la degradación de miofibrillas es poco probable.

Por eso, y a pesar de que los primeros trabajos sobre proteasas de músculo indicaban que la actividad de extractos musculares a pH neutro y alcalino era despreciable (94), numerosos estudios posteriores llevaron al conocimiento de proteasas capaces de actuar a esos pHs, a las cuales se atribuyó la función de iniciar el catabolismo de miofibrillas. Entre ellas, las proteasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  o calpaínas han sido las más detalladamente estudiadas, desde que Reddy y colaboradores encontraron que una fracción post-mitocondrial de músculo de conejo era capaz de remover las líneas Z de miofibrillas aisladas, en un proceso dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (95).

Estudios posteriores realizados con la calpaína purificada de músculo porcino mostraron que esa proteasa ejercía una acción muy específica y limitada sobre algunas proteínas contráctiles: las cadenas T e I de la troponina, la tropomiosina y la proteína C. Además, provocaba la remoción de las líneas Z, la degradación de las líneas M y la solubilización de  $\alpha$ -actinina intacta de miofibrillas aisladas (96-98).

Muchos trabajos posteriores (referencias en (99,100)) mostraron que la calpaína estaba presente en músculo de distintas fuentes (rata, pollo, conejo, ser humano, etc.) y también en tejidos no musculares (cerebro, riñón, plaquetas, eritrocitos, etc.), y que en todos ellos presentaba algunas características comunes: era una endopeptidasa citosólica, requería concentraciones milimolares de  $\text{Ca}^{2+}$  y un agente reductor de grupos tiol para su máxima actividad, su rango de pH óptimo estaba entre 7,0 y 8,5, su componente activo era un polipéptido de 80 kDa de peso molecular, que en algunos casos estaba acompañado por otra cadena de 30 kDa en relación equimolar, y tenía una gran especificidad de sustrato, ya que no actuaba sobre la mayoría de los péptidos cortos que se utilizan habitualmente como sustratos de proteasas.

Uno de los principales obstáculos para considerar las funciones fisiológicas de la calpaína fue su requerimiento de concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  tan altas como 1-5 mM, las cuales son de tres a cinco órdenes de magnitud superiores a las concentraciones intracelulares (101), hasta que estudios realiza-

dos con músculo cardíaco canino demostraron la existencia de una segunda calpaína, que requería concentraciones micromolares de  $\text{Ca}^{2+}$  para expresar su actividad (102). Posteriormente, la presencia de las dos formas enzimáticas fue detectada en numerosos tejidos (99,100), y se denominó calpaínas I y II a las activadas por concentraciones micro- y milimolares de  $\text{Ca}^{2+}$  respectivamente. Hasta el presente se desconoce la significación fisiológica de la coexistencia de ambas proteasas en una misma célula, y el hecho de si una de ellas es precursora o no de la otra in vivo sigue siendo materia de discusión. De todos modos, a pesar de estos interrogantes y de las diversas funciones que se han atribuido a las calpaínas en distintos tejidos (activación de C-quinasas, degradación de neurofilamentos, transformación de proteínas receptoras de hormonas esteroideas, etc.) (99,100), en músculo estas enzimas siguen siendo consideradas por algunos autores como candidatos para iniciar el catabolismo de proteínas miofibrilares. Por el contrario, los estudios mencionados anteriormente (83,88) en los cuales se inhibe la proteólisis lisosomal con leupeptín sin interferir la degradación de proteínas miofibrilares cuestionan la participación de la calpaína en este proceso, ya que dicha enzima también es fuertemente inhibida por leupeptín (97).

Además de estas proteasas neutras dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , varias serín-proteasas de tipo quimotripsina han sido purificadas a partir de homogenatos de músculo en distintas con-

diciones. Sus denominaciones fueron serín-proteasa alcalina (103), proteasa miofibrilar alcalina (104), proteasa miofibrilar de rata (105), proteasa alcalina muscular (106) y proteasa hidrolizante de miosina (107). Todas estas enzimas sedimentan con la fracción de proteínas miofibrilares, tienen su pH óptimo en el rango alcalino, muestran gran capacidad de degradar distintas proteínas miofibrilares, y tienen otras propiedades bioquímicas muy similares, lo cual hace pensar que se trata de una misma enzima. A pesar de que mucho se especuló respecto de su función en el catabolismo de proteínas miofibrilares, todas las especulaciones fueron echadas por tierra al demostrarse por procedimientos inmunohistoquímicos que la enzima no pertenecía a la célula muscular sino que estaba localizada en los mastocitos presentes en el músculo esquelético (108,109), y que era idéntica a la quimasa I de dichas células (110).

Otras dos proteasas no lisosomales fueron aisladas de músculo de rata. Una de ellas es una serín-proteasa de tipo tripsina encontrada en músculo intestinal(111), que presenta una capacidad de degradar proteínas miofibrilares mucho mayor que las calpaínas (112,113), y a la que también se atribuyó una función iniciadora en el catabolismo de miofibrillas. Sin embargo, estudios inmunoquímicos posteriores demostraron que esta enzima tampoco es muscular, sino que está localizada en otro tipo de células (89). La otra enzima es una proteasa multicatalítica de alto peso molecular que fue

recientemente aislada de músculo esquelético de rata (114). Esta enzima, que sí está localizada en la célula muscular (114), es capaz de actuar a pH neutro y alcalino sobre diferentes sustratos, y tiene la interesante propiedad de ser activada por ácidos grasos y SDS (115), lo cual permite hacer numerosas especulaciones acerca de sus funciones y su regulación in vivo, aunque aún no se conoce de que manera participa en el catabolismo proteico.

Si bien es bastante lo que se conoce acerca de las diferentes enzimas proteolíticas presentes en músculo de mamíferos y aves, los estudios orientados a la caracterización de proteasas de tejido muscular de pescado son mucho más incompletos. Con respecto a las proteasas lisosomales, sólo han sido identificadas en músculo de pescado las catepsinas A (116), B (116), C (116) y D (117), algunas de las cuales (catepsina B (118), catepsina D (117-120)) fueron purificadas y caracterizadas, mostrando propiedades similares a las correspondientes enzimas aisladas de músculo de mamíferos (118).

Sólo tres proteasas no lisosomales han sido descritas en músculo de pescado. Dos de ellas son neutras, una dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  con propiedades similares a las de la calpaína II de músculo de mamíferos (121) y la otra independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (122,123), mientras que la tercera es una proteasa alcalina que fue encontrada en músculo de más de 20 especies de peces de agua dulce y salada (124), y es la que ha sido

estudiada en mayor detalle. El interés por el estudio de esta enzima surgió de un problema tecnológico que aparecía en la elaboración del "kamaboko", producto pesquero consumido en el Japón que consiste en una pasta obtenida moliendo pescado con sal y sometiéndolo a cocción hasta obtener una determinada dureza y elasticidad. En la preparación de dicha pasta se observó que cuando la cocción se efectuaba a temperaturas por encima o por debajo de 60-65°C se obtenía un producto con propiedades reológicas adecuadas, mientras que cuando la cocción se realizaba a 60-65°C la pasta perdía elasticidad, en un fenómeno denominado "himodori" (125). Estudios realizados para explicar este inconveniente llevaron a la detección de una proteasa alcalina cuya temperatura óptima es de 60-65°C y cuyo pH óptimo es de alrededor de 8 (126-128), a la cual se atribuyó la responsabilidad de producir el "himodori" del "kamaboko" (129). Posteriormente, la enzima fue purificada y caracterizada (130-134), mostrando algunas propiedades interesantes: es una enzima tiólica de alto peso molecular que posee cuatro tipos de subunidades distintas, es termoestable, y no tiene actividad detectable por debajo de 55°C a menos que se agreguen altas concentraciones de agentes desnaturizantes tales como urea en el medio de incubación, lo cual hizo imposible determinar cuáles pueden ser sus funciones en el tejido in vivo.

#### I.4. MECANISMOS DE CONTROL DE LAS ENZIMAS PROTEOLITICAS

Es importante destacar que las enzimas proteolíticas no sólo intervienen en el catabolismo de proteínas, sino que también cumplen funciones más o menos especializadas en distintas células y tejidos, actuando en procesos tan diversos como maduración de hormonas, respuestas inmune e inflamatoria, coagulación sanguínea y fibrinólisis, control de la presión sanguínea, fertilización, esporulación, germinación, transformaciones oncogénicas, etc. Por tal motivo, es evidente que las proteasas deben estar sometidas a mecanismos muy precisos de control in vivo, ya que, de lo contrario, provocarían daños irreversibles a las células y tejidos en los cuales se encuentran.

Las células vivas tienen diversas maneras de controlar la actividad de sus proteasas. Por ejemplo, hay proteasas tan específicas para un determinado sustrato que son capaces de seleccionarlo entre distintas proteínas sin mecanismos de control adicionales (63). Otras proteasas, en cambio, se regulan a través de la modulación de sus proteínas sustrato, las cuales pueden variar su susceptibilidad al ataque proteolítico por modificaciones covalentes, oxidaciones, interacción con otras proteínas, metabolitos, coenzimas o efectores alostéricos, tal como se mencionó anteriormente. La actividad de otras enzimas proteolíticas puede controlarse por una adecuada compartimentalización intracelular, como es el

caso de las proteasas lisosomales, que están restringidas a actuar dentro de un determinado ambiente. Por otra parte, hay proteasas cuyo control se ejerce al ser sintetizadas como zimógenos o precursores inactivos, que se convierten en la forma activa por eventos proteolíticos limitados cuando las circunstancias así lo requieren. Un ejemplo típico de este mecanismo es la activación en cascada de las proteasas que intervienen en la coagulación sanguínea (135). Otra forma de control de la actividad de proteasas es a través de la inducción o represión de su síntesis en respuesta a diferentes situaciones nutricionales o ambientales. Un ejemplo clásico de este mecanismo es la inducción de la proteasa codificada por el gen rec A en *E. coli* para poner en marcha el sistema de reparación del DNA cuando éste sufre daños por radiaciones (63). Por otro lado, la actividad de muchas proteasas puede estar controlada por la presencia de activadores, tales como el  $\text{Ca}^{2+}$  para el caso de las calpaínas, o inhibidores específicos que forman complejos estables con las enzimas correspondientes.

El estudio de los inhibidores de proteasas tuvo gran impulso en los últimos años, no sólo por el interés por conocer su intervención en el catabolismo proteico sino también por los potenciales usos terapéuticos de algunos de ellos (136,137), así como por su influencia en el valor nutritivo de algunos alimentos (138,139). Numerosos inhibidores han sido descritos en animales, plantas y microorganismos; al-



gunos son altamente específicos para una determinada proteasa, otros para distintas proteasas dentro de un mismo tipo, y hay algunos que son capaces de actuar sobre más de un tipo de proteasas (140). En animales, las principales fuentes de inhibidores de proteasas son el plasma sanguíneo, el páncreas, el calostro y la clara de huevo, mientras que en vegetales los inhibidores de papa y granos de leguminosas han recibido mucha atención (140). En algunos casos, sus funciones parecen bastante claras. Por ejemplo, los inhibidores pancreáticos protegen al tejido de la activación prematura de los zimógenos de proteasas, los del tracto respiratorio lo protegen contra proteasas que puedan liberarse de granulocitos y macrófagos en condiciones patológicas, y los sanguíneos actúan evitando la activación prematura de zimógenos de proteasas y como mecanismo de regulación de la coagulación y la fibrinólisis. En cambio, en muchos otros casos su función se desconoce, y ni siquiera pudo encontrarse una enzima sobre la cual ejerzan su acción dentro del mismo tejido.

Bastante poco es lo que se conoce acerca de inhibidores de proteasas en músculo. De ellos, el que ha sido estudiado en mayor detalle es el calpastatín, proteína de extraordinaria termoestabilidad que actúa específicamente sobre la calpaína en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (141-145). También han sido aislados y parcialmente caracterizados inhibidores de las catepsinas B (146-148), H (147,148) y L (148). Tanto estos inhibidores como el calpastatín han sido encontrados también en

numerosos tejidos no musculares, en los cuales presentan propiedades muy similares a aquellos aislados de músculo, aunque sus concentraciones son muy variables (99,100,147).

También fue detectada en músculos de mamíferos la presencia de inhibidores de serín-proteasas. A uno de ellos, aislado de músculo esquelético de rata (149), se le atribuyó la función de regular la actividad de la proteasa alcalina aislada del mismo músculo (106), pero más tarde se demostró que la enzima no pertenecía a la célula muscular, invalidándose esa suposición (108,109). Lo mismo ocurrió con un inhibidor de bajo peso molecular (9kDa) aislado de músculo intestinal de rata (150), ya que la serín-proteasa neutra presente en los extractos de dicho músculo (111) tampoco pertenece a la célula muscular (89). También fue aislado un inhibidor de tripsina de músculo cardíaco bovino (141), resultando ser una proteína de 70 kDa cuya función se desconoce. Pero además de estos inhibidores, que probablemente sean propios de la célula muscular, recientemente se demostró la presencia de inhibidores de tripsina provenientes del plasma sanguíneo en el interior de células de músculo esquelético de rata (151,152), lo cual probablemente lleve a un replanteo de sus posibles funciones fisiológicas.

La presencia de inhibidores de proteasas en músculo de pescado se desconocía hasta 1983, en que Toyohara y colaboradores detectaron el calpastatín y un inhibidor de tripsina en músculo de carpa (153). Posteriormente, este último

fue purificado y caracterizado: es una glicoproteína termolábil con un peso molecular de 50-58 kDa, capaz de formar complejos equimolares de alta estabilidad con tripsina, quimotripsina y elastasa, inhibiendo no competitivamente a la primera y competitivamente a las otras dos (154,155). Estas propiedades lo hacen muy semejante al inhibidor  $\alpha_1$  del plasma sanguíneo, lo cual coincidiría con un trabajo previo de Hjelmeland (156), que encontró el mismo inhibidor de tripsina en músculo y suero de bacalao. Sin embargo, ninguno de estos autores pudo encontrar en músculo una serín-proteasa sobre la cual el inhibidor pueda actuar, razón por la cual su función no pudo aún ser establecida.

#### I.5. CAMBIOS EN EL MUSCULO POST-MORTEM

Más allá de cuales sean los mecanismos por los que una célula viva regula la acción de sus proteasas, está claro que todos los procesos metabólicos deben estar cuidadosamente controlados in vivo para permitir un correcto funcionamiento del organismo. Pero al sobrevenir la muerte del animal se paraliza la circulación sanguínea, con lo cual cesa el aporte de nutrientes, hormonas y oxígeno, perdiéndose esos mecanismos de control y ocurriendo una serie de cambios irreversibles que tienden a llevar al organismo a una situación de equilibrio. Estos fenómenos son de particular interés en el tejido muscular, ya que a través de ellos se produce la

transformación del músculo en carne, por lo cual han sido profundamente estudiados en sus distintos aspectos desde hace bastante tiempo. Para resumirlos brevemente (156,157), podemos decir que al cesar el suministro de oxígeno se paraliza la respiración celular y el glucógeno se transforma anaeróbicamente en ácido láctico, lo cual provoca un descenso del pH. Después de un tiempo la glucogenólisis se detiene, ya sea por agotamiento de la reserva de glucógeno o por inhibición de la fosforilasa provocada por el descenso del pH, lo cual ocasiona un rápido agotamiento del contenido de enlaces fosfato de alta energía que lleva a la unión irreversible de actina y miosina, en lo que se conoce como rigor mortis o rigidez cadavérica. La intensidad de estos fenómenos depende, especialmente, del estado nutricional del animal en el momento de su muerte y de la temperatura a la cual se lo almacena, y se reflejan en la calidad final del producto. Posteriormente, a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento, la carne sufre un proceso de maduración en el cual ocurren diversas reacciones químicas que contribuyen a su aroma y sabor, y la dureza desarrollada durante el rigor mortis va disminuyendo progresivamente. Muchos estudios han sido emprendidos con el objeto de conocer el proceso de ternerización, y ya en 1917 Hoagland y colaboradores propusieron que la proteólisis debía ser un importante factor de contribución en los cambios post-mortem del músculo, incluyendo su aumento de terneza (158). Sin embargo, en los 50 años sub-

siguientes varios autores intentaron correlacionar mediciones químicas de la proteólisis post-mortem con la tiernización de la carne, pero no obtuvieron resultados aceptables, ya que la fracción proteica en la cual ocurre el mayor grado de autólisis es la sarcoplasmática, que no está directamente involucrada en la textura (89). Pero a fines de la década del '60 se cambió el enfoque del problema, y se emplearon técnicas electroforéticas y microscópicas que permitieron visualizar algunos cambios post-mortem. A nivel ultraestructural se observó que las miofibrillas no sufren cambios muy drásticos durante el almacenamiento de la carne, pero ocurre una degradación de las líneas Z que les provoca una fragmentación en segmentos más pequeños, y, en menor medida, una alteración de las líneas M (159-164). Por otro lado, se observaron cambios en las interacciones entre miosina y actina, que se reflejan en variaciones de las actividades ATPasa de la actomiosina y en las menores concentraciones de ATP necesarias para disociar la actomiosina (165-167). Desde el punto de vista de la proteólisis ocurre muy poca alteración en las proteínas contráctiles y regulatorias, siendo sólo evidente la desaparición de la troponina T con la aparición concomitante de un producto de degradación de 30 kDa (168-170).

Además de la conocida ultraestructura de fibras gruesas (miosina) y delgadas (actina), el músculo estriado presenta una extensa red de filamentos transversales y longitudinales que fue descubierta recientemente, a la cual se atribuye un

papel muy importante en el mantenimiento de la integridad muscular. Los tres componentes proteicos principales de dicha red son la titina, la nebulina y la desmina. La titina es una proteína larga y flexible de muy alto peso molecular (1000 kDa), que aparentemente constituye una serie de filamentos longitudinales que se extienden de una línea Z a la otra dentro de un mismo sarcómero (171-174). La nebulina es otra proteína de alto peso molecular (500 kDa) localizada principalmente en la línea  $N_2$ , que es una estructura transversal ubicada dentro de la banda I (171,173-175). Y por último, la desmina es una proteína minoritaria de la miofibrilla, con un peso molecular de 55 kDa, localizada en las inmediaciones de la línea Z, capaz de formar filamentos de diámetro intermedio (10 nm), que servirían de conexión entre líneas Z de miofibrillas adyacentes (173,174,176,177). La función individual de estas tres proteínas, que constituyen el citoesqueleto de la fibra muscular, no se conoce con exactitud, pero parece claro que están relacionadas con la elasticidad, la integridad y la continuidad estructural del músculo.

En algunos trabajos se mostró que la titina (178), la nebulina (178) y la desmina (174,179) de músculo bovino sufren proteólisis post-mortem, lo cual podría estar relacionado mucho más directamente con la tiernización de la carne que la degradación de troponina T con producción del polipéptido de 30 kDa, cuya correlación con la terneza (169,180)

parece más una coincidencia temporal que una relación de causa a efecto, ya que a esa proteína no se le conocen funciones estructurales. De todas maneras, la incerteza respecto de cuáles son los eventos degradativos que causan la tiernización post-mortem sigue sin resolverse, y además de la proteólisis de componentes miofibrilares también merecería estudiarse en mayor detalle la acción de proteínas tales como la gelsolina (181), capaces de fragmentar filamentos de actina, así como los cambios que sufren los componentes proteicos extracelulares que actúan como nexos entre células adyacentes, de los cuales prácticamente lo único que se sabe es que el colágeno no sufre proteólisis post-mortem, ni aún en un año de almacenamiento de músculo estéril a 37°C (157).

Con respecto a cuáles son las proteasas responsables de los cambios post-mortem, algunas características de la acción de las calpaínas sobre miofibrillas aisladas, tales como su capacidad de degradar las líneas Z y M (96-98), troponina T con producción del polipéptido de 30 kDa (169,170) y nebulina (182,183), y la modificación de las actividades ATPasa miofibrilares (89) sugieren la intervención de dichas enzimas en la tiernización de la carne, por su similitud con los cambios post-mortem. La desmina purificada también es muy buen sustrato de la calpaína (184), y en cuanto a la proteólisis de titina hay algunas controversias, ya que dicha proteína es susceptible a calpaína bovina (182) pero resistente a calpaína de pollo (183). Sin embargo, las condicio-

nes de pH y concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el músculo post-mortem, así como la presencia del calpastatín, no son compatibles con una actividad significativa de la calpaína, por lo cual no puede asegurarse que actúe durante el almacenamiento de la carne, así como tampoco puede descartarse la intervención de otras proteasas, tales como las catepsinas L y D, cuya acción sobre miofibrillas aisladas también muestra algunos aspectos similares a los de la calpaína (93, 185,186).

Si bien el músculo de pescado es similar en estructura y funcionamiento a los de los animales de sangre caliente, hay algunas diferencias que es importante remarcar. Por un lado, su composición proteica es distinta, ya que tiene una mayor proporción de proteínas miofibrilares (65-75% frente a 52-56%) y una menor proporción de tejido conectivo (3-10% frente a 10-20%) que el músculo de mamíferos, lo cual, sumado a la menor temperatura necesaria para gelatinizar el colágeno (30-45°C frente a los 63-65°C del colágeno bovino) explica al mismo tiempo la relativa blandura y el alto valor nutritivo de la carne de pescado (156). Por otra parte, las proteínas miofibrilares de pescado son más susceptibles a la agregación y desnaturalización y a la digestión trípica que las de mamíferos (187). El desarrollo y la desaparición de la rigidez cadavérica son mucho más rápidos que en mamíferos (30 horas frente a 15 días a 0°C), y el descenso de pH post-mortem es mucho menor (pH 6,2-6,6 frente a 5,4-5,5 en rigor mortis), lo cual contribuye a su alterabilidad des-



pués de la muerte al no inhibirse la proliferación microbiana (156). Por estos motivos, los procesos que ocurren en el músculo durante su almacenamiento en hielo, que es la forma habitual de conservación desde su captura hasta su procesamiento o consumo, son de interés no por su aspecto beneficioso, tal como sucede en la maduración de las carnes bovinas, sino por su acción perjudicial para la calidad del producto final.

Hay en la literatura una gran cantidad de trabajos en los cuales se describen los cambios en aspectos físicos (firmeza de la carne, propiedades eléctricas de la piel y músculos adyacentes, índice de refracción y opacidad de las lentes oculares, viscosidad de extractos de músculo, etc.), químicos (pH, bases volátiles totales, trimetilamina, ácidos grasos libres, hipoxantina, histamina, peróxidos, aminoácidos libres, etc.), enzimáticos (actividad de ATPasas miofibrilares y actomiosínicas) y organolépticos que sufre el pescado almacenado en distintas condiciones (entero o descabezado y eviscerado, en hielo o agua de mar refrigerada, irradiado, con el agregado de conservadores, etc.). Sin embargo, la mayoría de estos estudios han sido encarados desde un aspecto fenomenológico, pero muy poco es lo que se sabe respecto de cuáles son los factores que los producen, y hay una hipótesis ampliamente aceptada que es que las primeras etapas del deterioro del pescado consisten en reacciones hidrolíticas catalizadas por enzimas endógenas, con formación de

nutrientes que permiten la penetración y proliferación bacteriana (188). Entre esas hidrolasas endógenas parece obvio que las proteasas deben ser consideradas con especial atención, debido a su muy probable influencia en los evidentes cambios texturales que ocurren durante el almacenamiento del pescado en hielo, aún en períodos de tiempo más cortos que los necesarios para la proliferación bacteriana y la aparición de compuestos indicadores de la misma, tales como trimetilamina (189,190).

Es muy poco lo que se conoce respecto de los cambios proteolíticos post-mortem que sufren las proteínas miofibrilares de pescado refrigerado, y los escasos resultados publicados son dispares en distintas especies. Por ejemplo, las proteínas contráctiles del granadero no sufren proteólisis post-mortem en 15 días de almacenamiento (191), mientras que en sardina se observa una degradación de miosina en 6 días de conservación (192). En cuanto a los cambios sufridos por las proteínas del citoesqueleto, los resultados de los dos únicos trabajos publicados son contradictorios a pesar de haber sido realizados sobre la misma especie (carpa): en uno de ellos se muestra que tanto la titina como la nebulina se degradan en un día de almacenamiento post-mortem (193), mientras que en el otro la titina permanece intacta después de 10 días a 0°C (194).

Con respecto a la acción de proteasas de músculo de pescado sobre proteínas miofibrilares lo único que se conoce

es que la calpaína de carpa es capaz de producir fragmentación de miofibrillas, degradación de las subunidades T e I de la troponina y solubilización de  $\alpha$ -actinina (121), al igual que su par de mamíferos y aves. En cuanto a las proteasas ácidas y alcalina, su acción sobre miofibrillas no ha sido descripta, y su participación en la proteólisis in vivo o post-mortem se desconoce por completo.

#### I.6. OBJETIVOS DEL TRABAJO

El objetivo central de este trabajo fue aislar y caracterizar proteasas alcalinas presentes en músculo de corvina y estudiar su acción sobre sustratos endógenos, poniendo especial atención en las proteínas miofibrilares por todo lo expuesto anteriormente. Además, se investigó la presencia de inhibidores endógenos de dichas proteasas, por su importancia como elementos de control de la degradación proteica. También se estudiaron los niveles de dichas enzimas a lo largo del tiempo de conservación del pescado en hielo, con el objeto de poder evaluar su posible participación en el deterioro.

Se utilizó a la corvina como material de estudio a pesar de no ser una especie de gran importancia comercial en la Argentina, porque se la captura en condiciones biológicas y nutricionales bastante constantes durante todo el año, debido a que en el área de operaciones de la flota pesquera

comercial del puerto de Mar del Plata no aparecen en ningún momento ejemplares maduros sexualmente, ya que la zona de puesta es en aguas de baja salinidad del Rfo de la Plata, desde donde los ejemplares ya desovados migran hacia el sur (195-197). Además, la posibilidad de obtener ejemplares capturados por embarcaciones costeras y de media altura garantiza las condiciones adecuadas de frescura de las muestras.

MATERIALES

Y

MÉTODOS

### M.1. PESCADO

Se utilizó corvina rubia (*Micropogon opercularis*) capturada en la plataforma continental argentina durante todo el año por la flota pesquera comercial del puerto de Mar del Plata. Los ejemplares fueron almacenados en cajones con hielo hasta su arribo al laboratorio, el cual se produjo entre 2 y 48 horas después de su captura, para luego ser procesados inmediatamente.

### M.2. REACTIVOS

El DEAE-Sephacel y el Sephadex G-200 fueron adquiridos a Pharmacia Fine Chemicals, la azocasefina, el EDTA, el 2-MCE, el pepstatín, el SBTI, el p-OHE4B, el TLCK, el TPCK, el BAEE, el TAME, el BTEE y los patrones de peso molecular a Sigma Chemical Co. y la tripsina a Difco Laboratories. Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

### M.3. PREPARACION DE EXTRACTOS DE MUSCULO

Se extrajeron los filetes del pescado, se los lavó y se los raspó con una espátula para separar el músculo del tejido conectivo. Se separó manualmente el músculo rojo del blanco, y a este último se lo homogeneizó durante 1 minuto con 2 volúmenes de KCl 2% en un homogeneizador Virtis. Se

dejó reposar el homogenato durante 30 minutos y luego se lo centrifugó a 10.000 x g por espacio de 20 minutos. El sobrenadante se dializó durante una noche contra NaCl 0,1 M en buffer borato 5 mM pH 7,5 (buffer A) y la solución así obtenida se denominó extracto crudo. El extracto calentado se obtuvo sometiendo una porción del sobrenadante de la centrifugación anterior a un calentamiento a 60°C durante 5 minutos, tras lo cual se separó el material insoluble mediante una centrifugación de 20 minutos a 10.000 x g y la solución resultante se dializó durante la noche contra buffer A. Todas las operaciones se efectuaron a 0-4°C.

#### M.4. CROMATOGRAFIA DE EXTRACTOS CRUDOS DE MUSCULO EN COLUMNA DE DEAE-SEPHACEL

Se empleó una columna de 1,7 x 25 cm previamente equilibrada con buffer A. Se sembraron 150 ml (2 g de proteínas) de extracto crudo, se lavó la columna con buffer A hasta que la densidad óptica a 280 nm del eluato alcanzó la línea de base y luego se conectó un gradiente lineal de NaCl entre 0,1 y 0,5 M en borato 5 mM pH 7,5, cuyo volumen total fue de 400 ml. Se recogieron fracciones de 3 ml, en las cuales se midió actividad proteolítica y actividad inhibitoria de tripsina. La velocidad de flujo fue de 20-30 ml/hora a lo largo de toda la corrida, la cual se realizó a 0-4°C.

#### M.5. MEDICION DE ACTIVIDADES PROTEOLITICA E INHIBITORIA DE TRIPSINA

La actividad proteolítica se midió en mezclas de incubación de 1 ml que contenían azocaseína 1%, la cantidad de solución enzimática que se detalla en cada experimento y buffer en concentración 0,1 M. Los buffers utilizados fueron: fosfato para pH menor que 8,1, Tris-ClH para pH entre 8,1 y 9,1 y carbonato para pH mayor que 9,1. Las mezclas se incubaron durante 3 horas a la temperatura indicada en cada caso, tras lo cual se les agregó 1 ml de TCA 10%, se centrifugó y se midió densidad óptica a 335 nm en el sobrenadante. Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que produce un  $\Delta DO_{335}=1$  cuando se la incuba a 60°C por espacio de 1 hora en la mezcla estándar de reacción.

La actividad inhibitoria se ensayó en una mezcla de reacción similar, empleando azocaseína 1%, buffer Tris ClH 0,1 M pH 8,1 (salvo en el experimento descrito en la Fig. 3, en el que se estudió la dependencia de la inhibición con el pH), 1 unidad de tripsina y la cantidad de solución inhibidora que se detalla en cada caso, incubando a 37°C durante 1 hora. Una unidad de tripsina se define como la cantidad de tripsina que produce un  $\Delta DO_{335}=1$  cuando se la incuba a 37°C durante 1 hora en la mezcla estándar de reacción. Una unidad de inhibidor se define como la cantidad que inhibe en un 50% a una unidad de tripsina en las condiciones estándar.



dar de ensayo.

#### M.6. MEDICION DE ACTIVIDAD ESTERASICA DE LA PROTEASA I.

La actividad esterásica de la proteasa I se determinó frente a dos sustratos de tripsina (BAEE y TAME) y uno de quimotripsina (BTEE). Los medios de incubación contenían cada sustrato en concentración 0,5 mM, buffer Tris-ClH 50 mM pH 8,5 y 0,02 UA/ml de proteasa I, en un volumen de 0,5 ml. Las mezclas se incubaron a 60°C y cada 10 minutos se registraron variaciones de densidad óptica a 253 nm para el BAEE, 247 nm para el TAME y 256 nm para el BTEE. Las velocidades de reacción se calcularon a partir de los siguientes valores de coeficientes de absortividad molar:  $1150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para el BAEE (198) y  $409 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para el TAME (199).

#### M.7. DETERMINACION DE PESOS MOLECULARES POR CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE SEPHADEX G-200

Se empleó una columna de 1,2 x 74 cm previamente equilibrada con buffer A. Se sembraron muestras obtenidas a partir de las fracciones activas de la cromatografía en columna de DEAE-Sephacel, y la elución se efectuó con buffer A a una velocidad de flujo de 7-8 ml/hora. Se recogieron fracciones de 0,75 ml, en las cuales se midió actividad proteolítica y actividad inhibitoria de tripsina. La temperatura de corri-

da fue 0-4°C. Los pesos moleculares de las muestras analizadas se calcularon por interpolación en una curva de calibración construida con los siguientes patrones: tiroglobulina (PM=650 kDa), ureasa (PM=120 kDa) y seroalbúmina bovina (PM=66 kDa). El volumen de exclusión (Vo) de la columna se determinó con Azul de Dextrano 2000.

#### M.8. PREPARACION DE MIOSINA, ACTOMIOSINA Y MIOFIBRILLAS

La miosina se preparó por un método diseñado en este laboratorio (200). La actomiosina se preparó según la técnica de Tsuchiya y col. (201), y las miofibrillas siguiendo el método de Gill y col. (202).

#### M.9. TRATAMIENTO ENZIMATICO DE MIOSINA Y ACTOMIOSINA

Las proteínas sustrato (1,6 mg/ml de miosina ó 2,5 mg/ml de actomiosina) fueron incubadas con 0,1 UA/ml de cada proteasa (salvo en el experimento descrito en la Fig. 16) en buffer Tris-ClH 0,1 M (pH 8,5 para la proteasa I y 9,1 para la proteasa II) en un volumen final de 0,5 ml, a la temperatura indicada en cada caso. En los controles se reemplazó el agregado de enzima por el de igual volumen de buffer A. Después de los tiempos de incubación que se señalan para cada experimento, las reacciones se detuvieron por el agregado de 2 volúmenes de urea 8 M, SDS 2,5%, EDTA 5 mM, 2-MCE

1%, buffer Tris-glicina 0,1 M pH 8,8, y las mezclas se calentaron a 100°C durante 5 minutos. Alícuotas conteniendo 50 µg de miosina o 100 µg de actomiosina originales se analizaron por electroforesis como se describirá más adelante.

#### M.10. TRATAMIENTO DE MIOFIBRILLAS CON PROTEASA I.

Las miofibrillas fueron incubadas con 0,08 UA/ml de proteasa I en buffer Tris-ClH 0,1 M pH 7,5 (salvo en el experimento descrito en la Fig. 24 en que se estudia el efecto del pH sobre la proteólisis), conteniendo EDTA 0,5 mM por distintos tiempos, en un volumen final de 125 µl. Esta concentración de EDTA no afecta la proteólisis de miofibrillas por la proteasa I, pero se agregó rutinariamente a los medios de incubación para evitar la acción de metalo-proteasas que pudieran contaminar las preparaciones de enzima o de miofibrillas. La temperatura de incubación fue de 37°C en todos los casos excepto en el experimento descrito en la Fig. 29, que se realizó a 0°C. Las digestiones (salvo las que se describen en la Fig. 26) fueron detenidas por el agregado de 10 µl de SBTI 20 mg/ml y las mezclas se prepararon para el análisis electroforético como se describió en la sección M.9, o bien se examinaron directamente al microscopio óptico en contraste de fase o se prepararon para su examen al microscopio electrónico como se describirá más adelante. En los experimentos control el SBTI fue agregado al comienzo de las

incubaciones. Los análisis electroforéticos se efectuaron empleando alícuotas de 100  $\mu$ g de proteína miofibrilar original.

Cuando se estudió la acción del inhibidor endógeno sobre la degradación de miofibrillas por la proteasa I (Fig. 27), las miofibrillas fueron incubadas durante 2 horas con la enzima en presencia de cantidades crecientes de inhibidor, en condiciones similares a las descritas anteriormente. Las reacciones se detuvieron por enfriamiento rápido a 0°C y las mezclas se prepararon inmediatamente para el análisis electroforético tal como se describió en la sección M.9.

Cuando se estudió el material solubilizado por acción de la proteasa I sobre miofibrillas (Fig. 23), las incubaciones se efectuaron en las mismas condiciones que se describió anteriormente, pero duplicando el volumen de todos los componentes del medio. Después de incubadas, las mezclas se enfriaron a 0°C, se centrifugaron a 5.000 x g durante 30 minutos y 100  $\mu$ l de los sobrenadantes se trataron para su análisis electroforético como se describió en la sección M.9.

#### M.11. INCUBACION DE HOMOGENATOS TOTALES DE MUSCULO

El músculo fue homogeneizado con 5 volúmenes de NaCl 0,1 M fosfato 20 mM pH 7,0, y 8 mg de proteínas de ese homogenato se incubaron durante 2 horas a 37°C en buffer Tris-ClH 0,1 M (pH 7,5 y 8,5) en un volumen final de 0,5 ml, tras

lo cual las mezclas de reacción se prepararon para el análisis electroforético como se describió en la sección M.9. Para dichos análisis se emplearon alícuotas conteniendo 150 µg de proteínas del homogenato original.

#### M.12. ELECTROFORESIS

Los análisis electroforéticos se efectuaron según el método de Portzio y Pearson (203), empleando geles de SDS-poliacrilamida al 10% (salvo en donde se indique otra concentración), con una relación acrilamida-bisacrilamida de 100:1 (p/p). La intensidad de corriente aplicada fue de 3 mA/gel y el tiempo de corrida fue de alrededor de 4 horas, hasta que el marcador del frente (azul de bromofenol) llegó a 1 cm del extremo inferior del gel.

Los pesos moleculares de los polipéptidos de interés se calcularon por medio de una curva de calibración construida con los siguientes patrones: seroalbúmina bovina polimerizada (PM=264, 198, 132 y 66 kDa), ovalbúmina (PM=45 kDa), pepsina (PM=34,7 kDa), tripsinógeno (PM=24 kDa), SBTI (PM=21,5 kDa) y lisozima (PM=14,3 kDa).

#### M.13. MICROSCOPIA ELECTRONICA

Las muestras para ser examinadas al microscopio electrónico fueron fijadas en glutaraldehído al 3% seguido de OsO<sub>4</sub>

1,5%, teñidas en bloque con citrato de plomo de acuerdo a la técnica de Reynolds (204) y observadas en un microscopio de transmisión JEM 100 C.

#### M.14. DETERMINACION DE PROTEINAS.

La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry (205), utilizando seroalbúmina bovina como estándar.



R.1. DETECCION DE ACTIVIDADES PROTEOLITICA ALCALINA E INHIBITORIA DE TRIPSINA EN EXTRACTOS DE MUSCULO

En una etapa preliminar de este trabajo se investigó la presencia de actividad proteolítica alcalina y actividad inhibitoria de tripsina en extractos de músculo de corvina. En el método de preparación de proteasa alcalina de músculo de carpa (130) se incluye un paso de calentamiento de 5 minutos a 60°C que resulta bastante efectivo para la purificación de la enzima. Por tal motivo, se midió actividad proteolítica en extractos crudos y calentados en esas condiciones. Como puede observarse en la Tabla I, ambos extractos mostraron actividad detectable tanto a 37 como a 65°C, y los valores obtenidos a esta última temperatura fueron de aproximadamente el doble que a la primera. Además, las actividades específicas del extracto calentado fueron 5 a 7 veces superiores a las del extracto crudo, por lo que el empleo de este sistema pareció adecuado para una primera caracterización de la actividad.

En la Tabla II puede observarse que el extracto crudo también mostró apreciable actividad inhibitoria de tripsina, parte de la cual se perdió en el extracto calentado.



Tabla I. Detección de actividad proteolítica alcalina en extractos de músculo

| Temp. | <u>Extracto crudo</u> |          | <u>Extracto calentado</u> |          |
|-------|-----------------------|----------|---------------------------|----------|
|       | Act.                  | Act.esp. | Act.                      | Act.esp. |
| 37°C  | 0,116                 | 0,008    | 0,130                     | 0,053    |
| 65°C  | 0,260                 | 0,018    | 0,231                     | 0,094    |

La actividad (pH 8,0) se determinó como se describió en la sección M.5, empleando alícuotas de 0,7 ml de los extractos correspondientes como fuente de enzima. Concentración de proteínas de los extractos: crudo, 20,4 mg/ml; calentado, 3,5 mg/ml. La actividad se expresa como  $\Delta DO_{335}/3h$ , y la actividad específica como  $\Delta DO_{335}/3h \cdot mg \text{ prot.}$

Tabla II. Detección de actividad inhibitoria de tripsina en extractos de músculo.

|                         | Act. tripsina | % inhibición |
|-------------------------|---------------|--------------|
| Control                 | 1,480         | —            |
| + Extracto<br>crudo     | 0,192         | 87           |
| + Extracto<br>calentado | 0,860         | 42           |

La actividad inhibitoria de tripsina se midió como se describió en la sección M.5, empleando alícuotas de 0,65 ml de los extractos correspondientes como fuente de inhibidor. Concentración de proteínas de los extractos: crudo, 19,0 mg/ml; calentado, 3,7 mg/ml. La actividad de tripsina se expresa como  $\Delta DO_{335}/h$ .

## R.2. CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA ALCALINA PRESENTE EN EXTRACTOS CALENTADOS DE MUSCULO

Empleando el extracto calentado de músculo como fuente de proteasas alcalinas, se estudió la dependencia de la actividad con la temperatura y el pH, obteniéndose valores máximos a 60°C y pH 8,0-8,7, tal como puede observarse en las Figs. 1 y 2 respectivamente. En la curva de actividad en función del pH apareció también un pico menor con un máximo a pH 6,0-6,5, que probablemente corresponda a algún otro tipo de proteasa presente en el extracto, y que está fuera del interés de este estudio.

## R.3. CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE TRIPSI-NA PRESENTE EN EXTRACTOS CRUDOS DE MUSCULO

La Fig. 3 muestra la dependencia de la actividad inhibitoria de tripsina del extracto crudo con el pH, pudiendo observarse que su acción fue efectiva en todo el rango de pH ensayado (6,0-8,7).

Se estudió también la dependencia de la actividad inhibitoria con la concentración de proteínas del extracto crudo (Fig. 4), obteniéndose mayor grado de inhibición de tripsina a medida que aumenta la cantidad de extracto agregado al medio de incubación. La curva inferior de la Fig. 4 se construyó efectuando las mediciones con cantidades crecien-

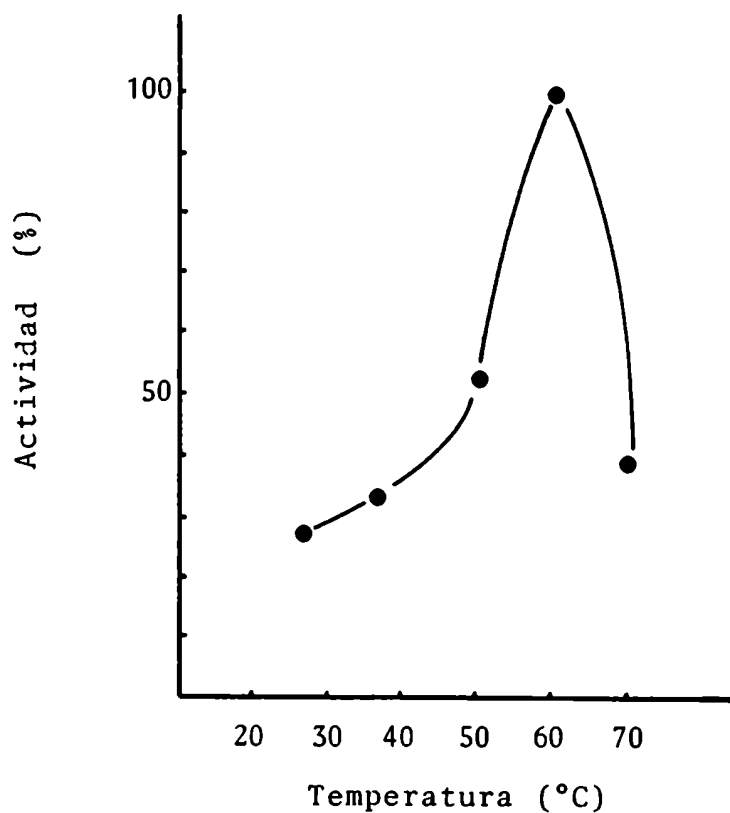


Fig. 1. Dependencia de la actividad proteolítica de extractos calentados de músculo con la temperatura. La actividad proteolítica (pH 8,0) se determinó como se describió en la sección M.5, empleando alícuotas de 0,70 ml de extracto calentado como fuente de enzima. Concentración de proteínas del extracto: 3,5 mg/ml.

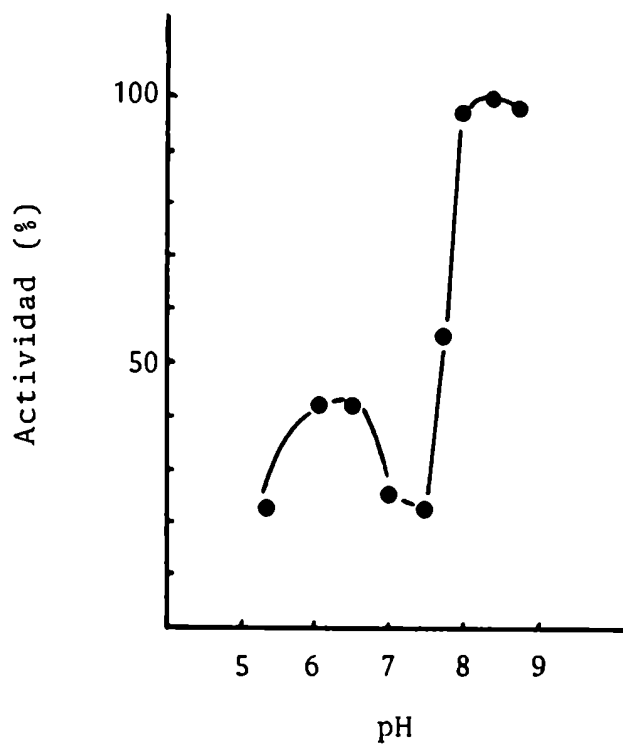


Fig. 2. Dependencia de la actividad proteolítica de extractos calentados de músculo con el pH. La actividad proteolítica (60°C) se determinó como se describió en la sección M.5, empleando alícuotas de 0,70 ml de extracto calentado como fuente de enzima. Concentración de proteínas del extracto: 4,4 mg/ml.

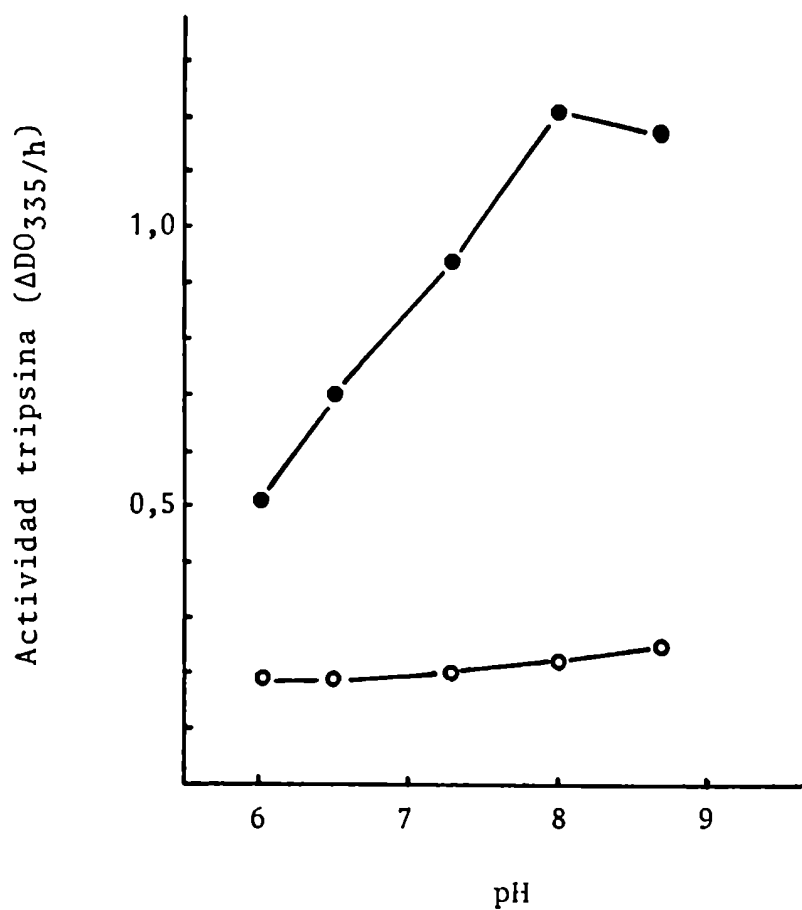


Fig. 3. Dependencia de la actividad inhibitoria de tripsina de extractos crudos de músculo con el pH. Se determinó actividad de tripsina a distintos valores de pH como se describió en la sección M.5, en ausencia (●-●) o en presencia (o-o) de 0,65 ml de extracto crudo como fuente de inhibidor. Concentración de proteínas del extracto: 19,0 mg/ml.

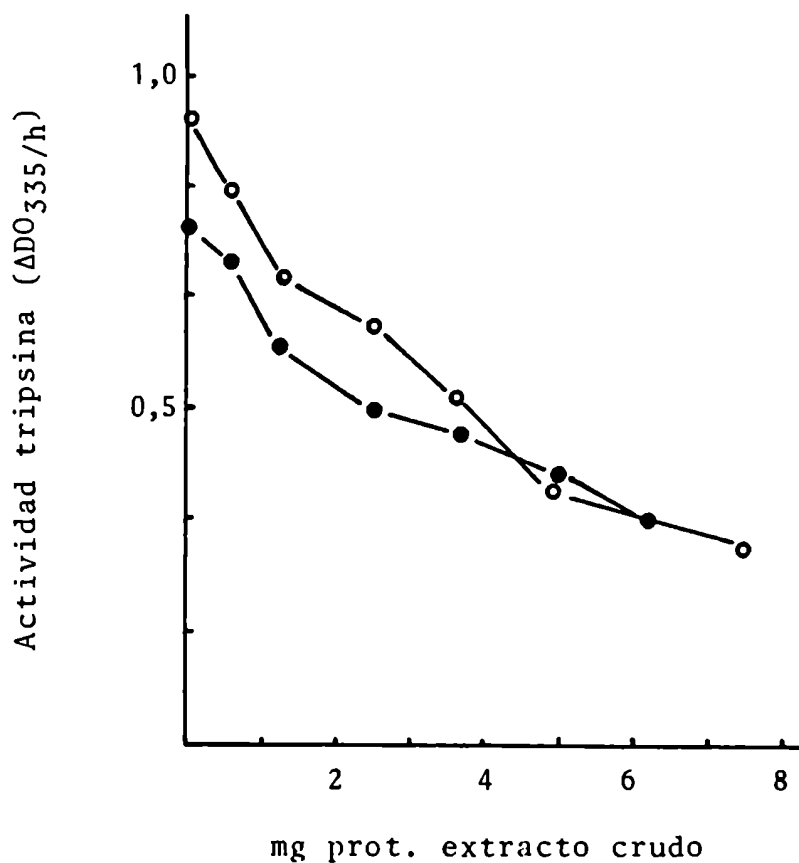


Fig. 4. Dependencia de la actividad inhibitoria de tripsina de extractos crudos de músculo con la concentración de proteínas. La actividad de tripsina se determinó como se describió en la sección M.5, en presencia de concentraciones crecientes de proteínas del extracto crudo (o-o) o de las mismas concentraciones más el agregado de cantidad suficiente de albúmina bovina para uniformar la concentración total de proteínas en 7,5 mg/ml en todos los puntos (●-●).

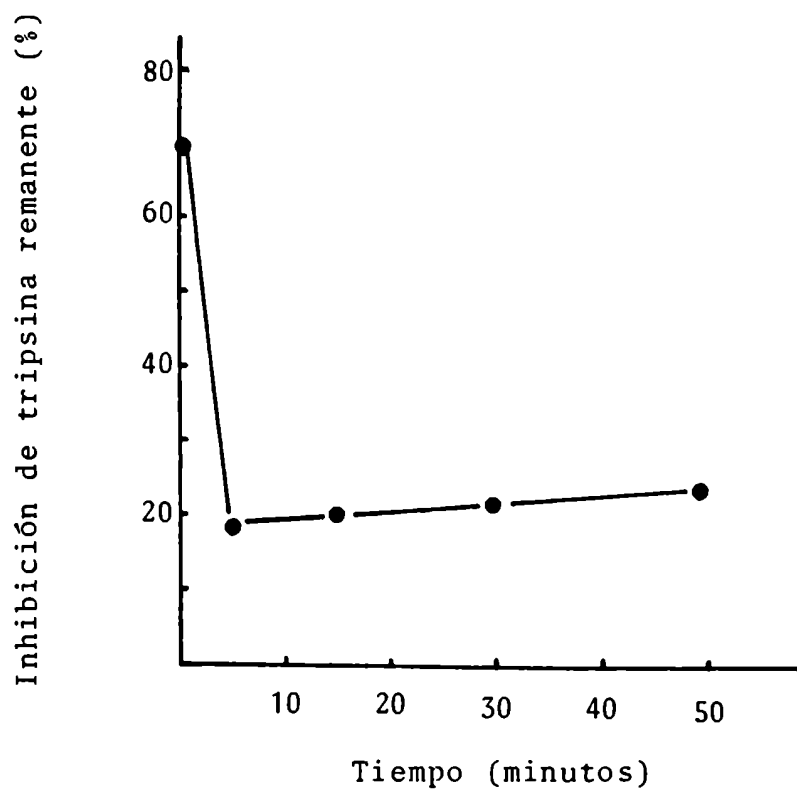


Fig. 5. Efecto del precalentamiento sobre la actividad inhibitoria de tripsina de extractos crudos de músculo. Alícuotas de 0,60 ml del extracto crudo se precalentaron a 70°C durante los tiempos indicados en abscisas, tras lo cual se enfriaron a 0°C y se midió actividad inhibitoria de tripsina remanente como se describió en la sección M.5. Concentración de proteínas del extracto: 19,0 mg/ml.



tes de proteínas del extracto crudo, pero uniformando las concentraciones totales de proteínas en los medios de incubación con el agregado de albúmina, e indica que la inhibición de tripsina se debe a algún componente de dicho extracto y no a un efecto inespecífico por la cantidad de proteína presente en el medio.

La Fig. 5 muestra el resultado de calentar el extracto crudo a 70°C por distintos períodos de tiempo previamente a la medición de su capacidad inhibitoria de tripsina. Puede observarse que el extracto pierde su potencia inhibitoria aún a tiempos cortos de calentamiento, lo cual indica que el componente responsable del efecto es termolábil.

#### R.4. AISLAMIENTO DE PROTEASAS ALCALINAS E INHIBIDOR DE TRIPSINA POR CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO

Una vez estudiadas algunas propiedades de las actividades proteolítica e inhibitoria del extracto crudo, se procedió a su aislamiento por cromatografía en columna de DEAE-Sephacel. Como puede observarse en la Fig. 6, al eluir el material unido a la columna con un gradiente lineal de NaCl se obtuvieron dos picos de actividad proteolítica, a los cuales se denominó proteasas I y II, y un pico de actividad inhibitoria de tripsina. Es interesante señalar que la posición de las dos proteasas fue reproducible en las distintas preparaciones realizadas, pero la del inhibidor mostró algunas

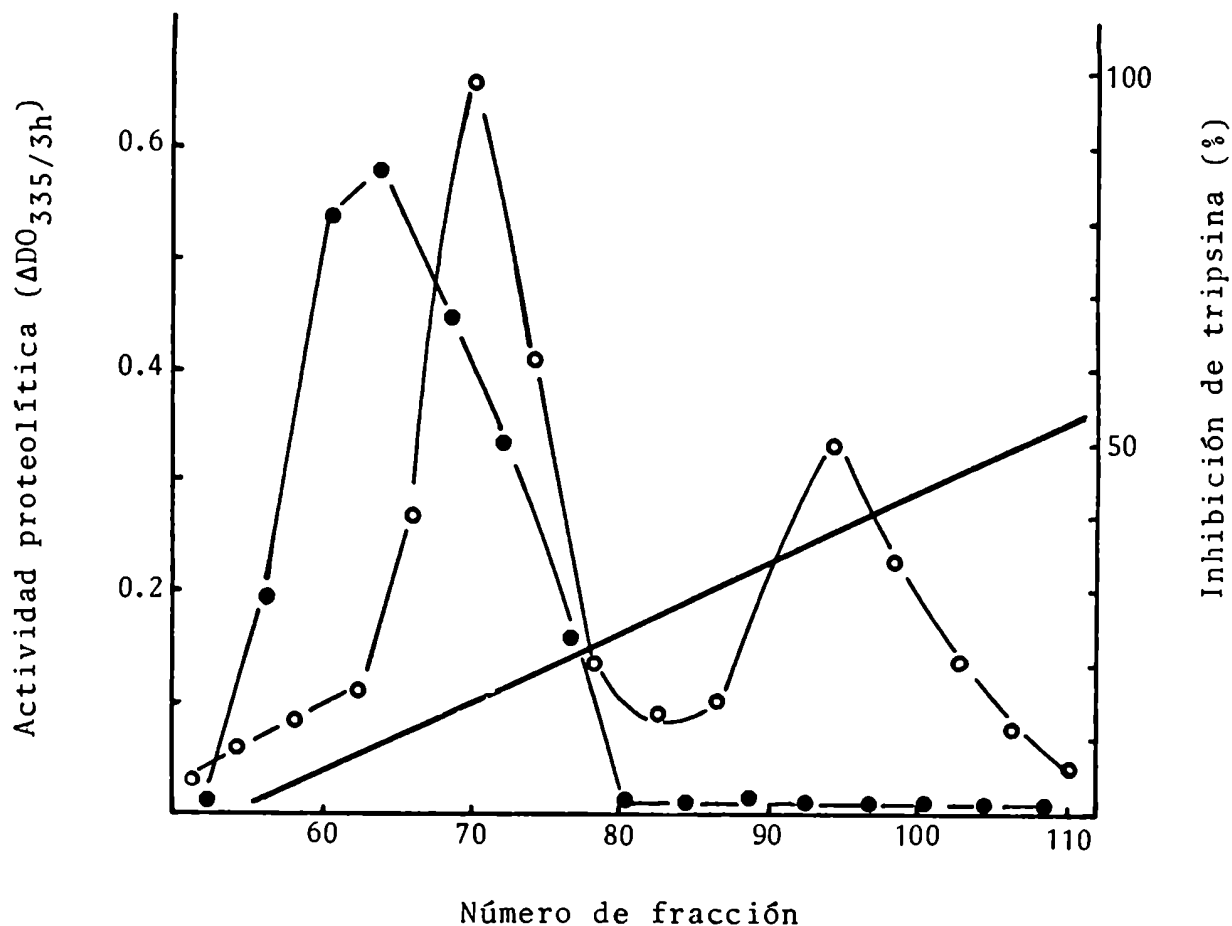


Fig. 6. Aislamiento de proteasas alcalinas e inhibidor de tripsina por cromatografía en columna de DEAE-Sephacel. Las condiciones de preparación de extracto y corrida cromatográfica que se emplearon se detallaron en la sección M.4. Las actividades proteolítica (60°C, pH 8,5) (o-o) e inhibitoria de tripsina (●-●) se midieron como se describió en la sección M.5, empleando alícuotas de 0,30 ml de cada fracción como fuente de enzima e inhibidor respectivamente. Se agruparon las fracciones 55-63, 66-76 y 89-100, y a estas tres mezclas se las utilizó en los experimentos subsiguientes como fuente de inhibidor, proteasa I y proteasa II respectivamente.

variaciones, ya que si bien en la mayoría de los experimentos eluyó de la columna en la posición indicada en la Fig. 6, en otros, y por causas que se desconocen, su máximo se superpuso con el de la proteasa I.

#### R.5. DEPENDENCIA DE LAS ACTIVIDADES PROTEOLITICAS CON LA TEMPERATURA Y EL pH

En la Fig. 7 puede observarse que la actividad de ambas proteasas toma valores máximos a 60°C, pero su comportamiento es diferente a temperaturas menores: la proteasa II es prácticamente inactiva por debajo de 50°C, mientras que la proteasa I tiene a 37°C un 25% de su actividad a 60°C.

La Fig. 8 muestra las curvas de actividad en función del pH. Se obtuvieron valores máximos a pH 8,5 y 9,1 para las proteasas I y II respectivamente.

#### R.6. EFEECTO DE LA UREA SOBRE LA DEPENDENCIA DE LAS ACTIVIDADES PROTEOLITICAS CON LA TEMPERATURA

La proteasa alcalina de músculo de carpa, cuya dependencia con la temperatura es similar a la de la proteasa II de músculo de corvina (Fig. 7), tiene la inusual propiedad de disminuir su óptimo de temperatura en presencia de altas concentraciones de urea (133). Se investigó el efecto de la urea sobre la dependencia de las proteasas I y II con la tem-

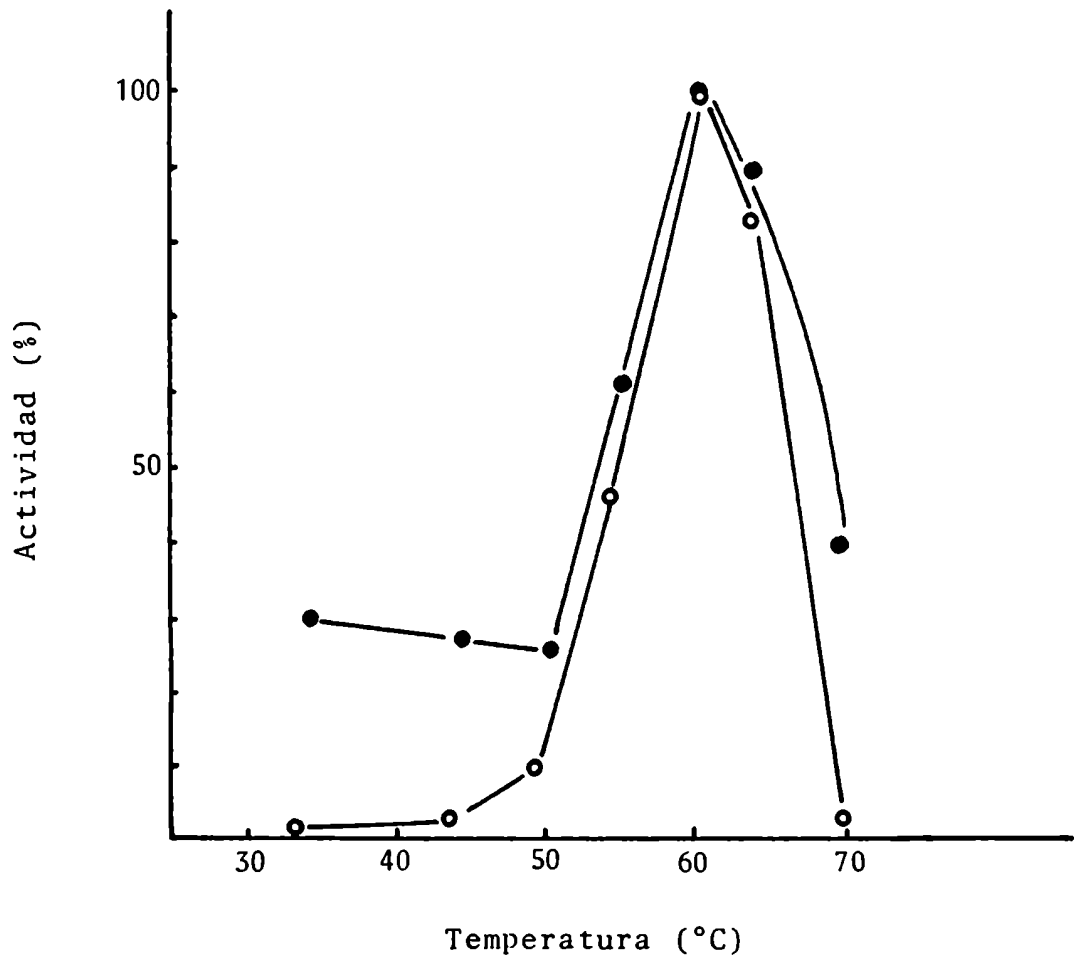


Fig. 7. Dependencia de las actividades proteolíticas con la temperatura. La actividad proteolítica se midió como se describió en la sección M.5, empleando alícuotas de 0,3 ml de las proteasas I (●-●) y II (o-o) como fuente de enzima, a pH 8,5 para la proteasa I y pH 9,1 para la proteasa II.

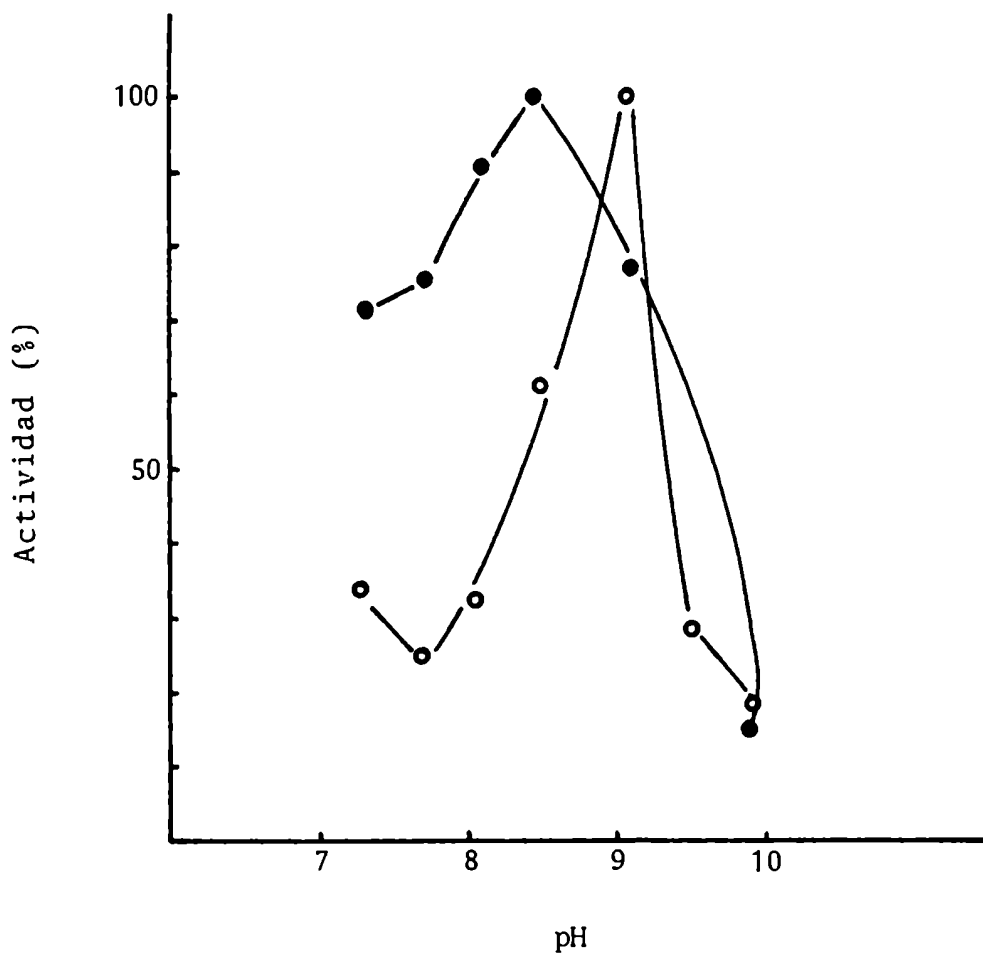


Fig. 8. Dependencia de las actividades proteolíticas con el pH. La actividad proteolítica (60°C) se midió como se describió en la sección M.5, empleando alícuotas de 0,3 ml de las proteasas I (●-●) y II (○-○) como fuente de enzima.

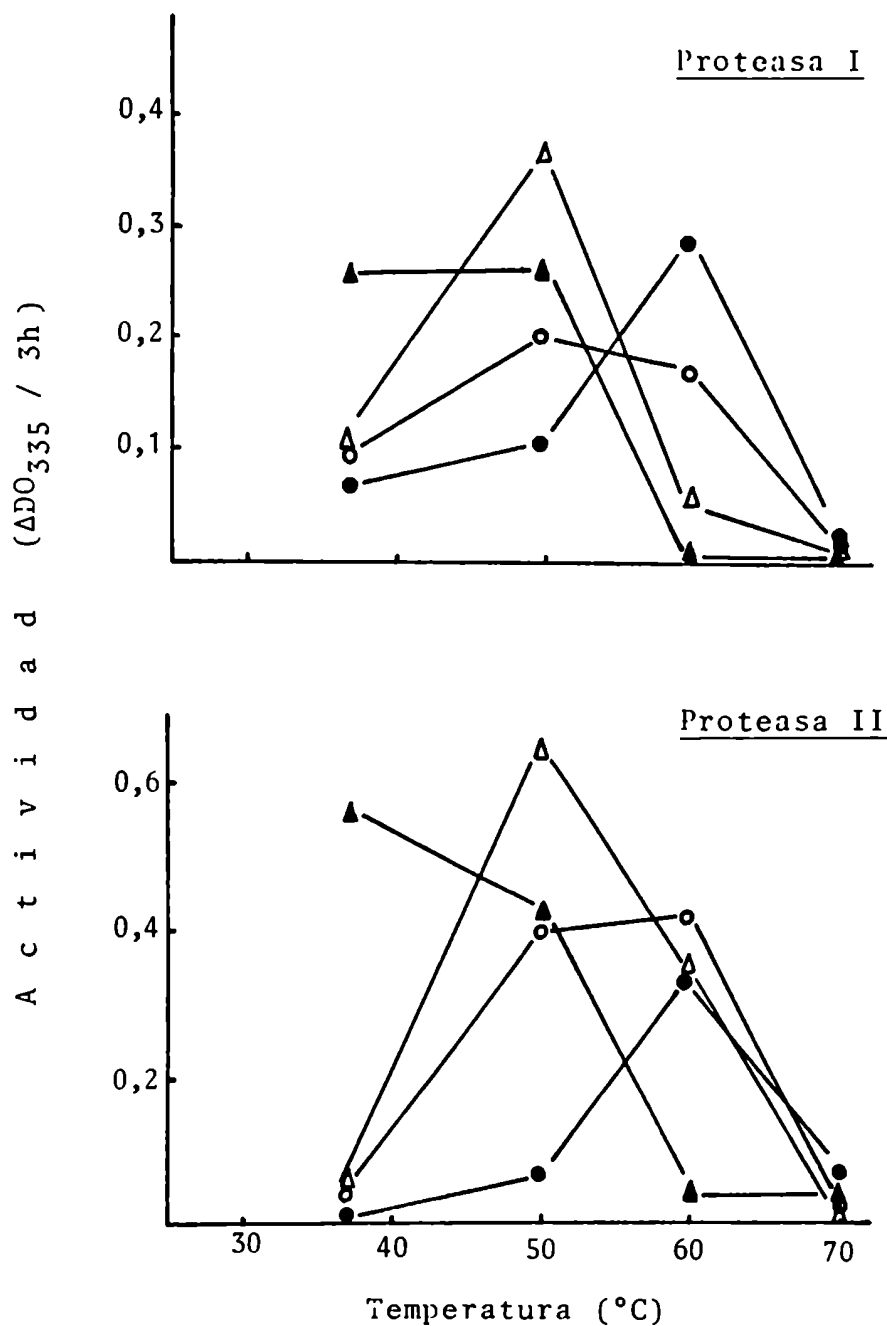


Fig. 9. Efecto de la urea sobre la dependencia de las actividades proteolíticas con la temperatura. La actividad proteolítica (pH 8,5) se midió a distintas temperaturas como se describió en la sección M.5, empleando alícuotas de 0,30 ml de las proteasas I y II como fuente de enzima, en presencia de las siguientes concentraciones de urea: 0,95M (o-o), 1,9M (Δ-Δ), 3,8M (▲-▲) y el control, sin el agregado de urea (●-●).

peratura, observándose un comportamiento similar en ambas: con una concentración de 1,9 M el óptimo se desplaza a 50°C, mientras que con 3,8 M la máxima actividad se obtiene alrededor de 37°C (Fig. 9).

#### R.7. TIPIFICACION DE LAS PROTEASAS

Se ensayó la influencia de varios compuestos químicos sobre la actividad de ambas proteasas con el objeto de definir a cuál de los cuatro tipos de enzimas proteolíticas pertenecen. Los resultados más significativos de este estudio son la fuerte inhibición de la proteasa I por SBTI y de la proteasa II por p-OHMB, así como la activación de esta última por EDTA y 2-MCE (Tabla III). Este comportamiento, sumado a la inhibición de la proteasa I por TLCK (específico para tripsina) y no por TPCK (específico para quimotripsina) (Tabla III), y a la alta actividad esterásica de esta enzima sobre sustratos de tripsina (BAEE y TAME) y no de quimotripsina (BTÉE) que se observa en la Tabla IV, permite establecer que la proteasa I es una serín-proteasa de tipo tripsina y la proteasa II es una tiol-proteasa.

Debe señalarse que no se pudo detectar actividad de la proteasa II a 37°C ni aún incluyendo EDTA y 2-MCE, ambos en concentración 10 mM, en el medio de incubación.

Tabla III. Efecto de varios compuestos químicos sobre la actividad azocaseinolítica de las proteasas I y II.

| Reactivo  | Concentración | Actividad (%) |             |
|-----------|---------------|---------------|-------------|
|           |               | Proteasa I    | Proteasa II |
| Ninguno   | —             | 100           | 100         |
| SBTI      | 1 mg/ml       | 16            | 90          |
| TLCK      | 1 mM          | 48            | 97          |
| TPCK      | 1 mM          | 115           | N.D.        |
| p-OHMB    | 1 mM          | 55            | 6           |
| Pepstatín | 1,5 µg/ml     | 61            | 73          |
| EDTA      | 10 mM         | 45            | 127         |
| 2-MCE     | 10 mM         | 25            | 152         |

La actividad (60°C, pH 8,5) se midió como se indicó en la sección 2.5, empleando alícuotas de 0,3 ml de ambas proteasas.



Tabla IV. Actividad esterásica de la proteasa I.

| Sustrato | Concentración (mM) | Actividad |
|----------|--------------------|-----------|
| BAEE     | 0,5                | 4,9       |
| TAME     | 0,5                | 10,7      |
| BTEE     | 0,5                | 0         |

La actividad se expresa en nmoles de sustrato hidrolizado por minuto, y se determinó como se describió en la sección 2.6.

#### R.8. EFFECTO DEL NaCl SOBRE LAS ACTIVIDADES PROTEOLITICAS

En la Fig. 10 puede observarse que ambas proteasas fueron inhibidas por NaCl, pero en distinto grado. Las concentraciones salinas que produjeron 50% de inhibición fueron 250 mM para la proteasa I y 450 mM para la proteasa II.

#### R.9. ESTIMACION DE LOS PESOS MOLECULARES DE LAS PROTEASAS Y EL INHIBIDOR DE TRIPSINA

Se analizaron las proteasas y el inhibidor por cromatografía en Sephadex G-200, obteniéndose pesos moleculares de 132, 363 y 65 kDa para las proteasas I y II y el inhibidor de tripsina respectivamente (Fig. 11).

#### R.10. INACTIVACION TERMICA DEL INHIBIDOR DE TRIPSINA

El punto central del estudio del inhibidor de tripsina es investigar sobre cuáles enzimas endógenas puede ejercer su acción. Pero para ensayar su efecto sobre las proteasas alcalinas a la temperatura óptima de las mismas se hizo necesario estudiar previamente su termoestabilidad en las condiciones de reacción, ya que los resultados obtenidos con el extracto crudo que se describieron en la Fig. 5 mostraron que el inhibidor era un componente termolábil.

La Fig. 12 muestra la estabilidad del inhibidor de trip-

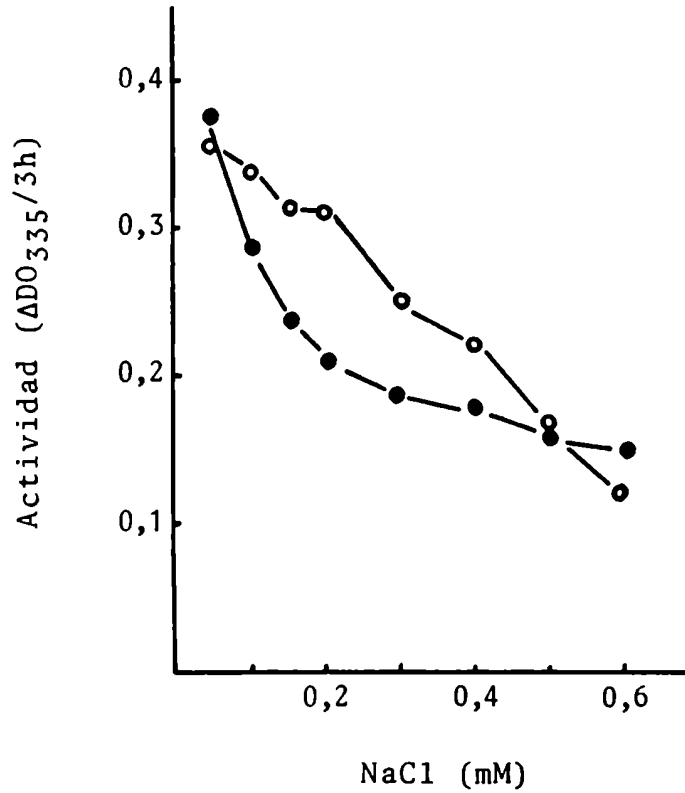


Fig. 10. Efecto del NaCl sobre las actividades proteolíticas. La actividad proteolítica (60°C) se midió como se describió en la sección M.5, empleando alícuotas de 0,30 ml de las proteasas I (●-●) y II (o-o) como fuente de enzima, a pH 8,5 para la proteasa I y pH 9,1 para la proteasa II.

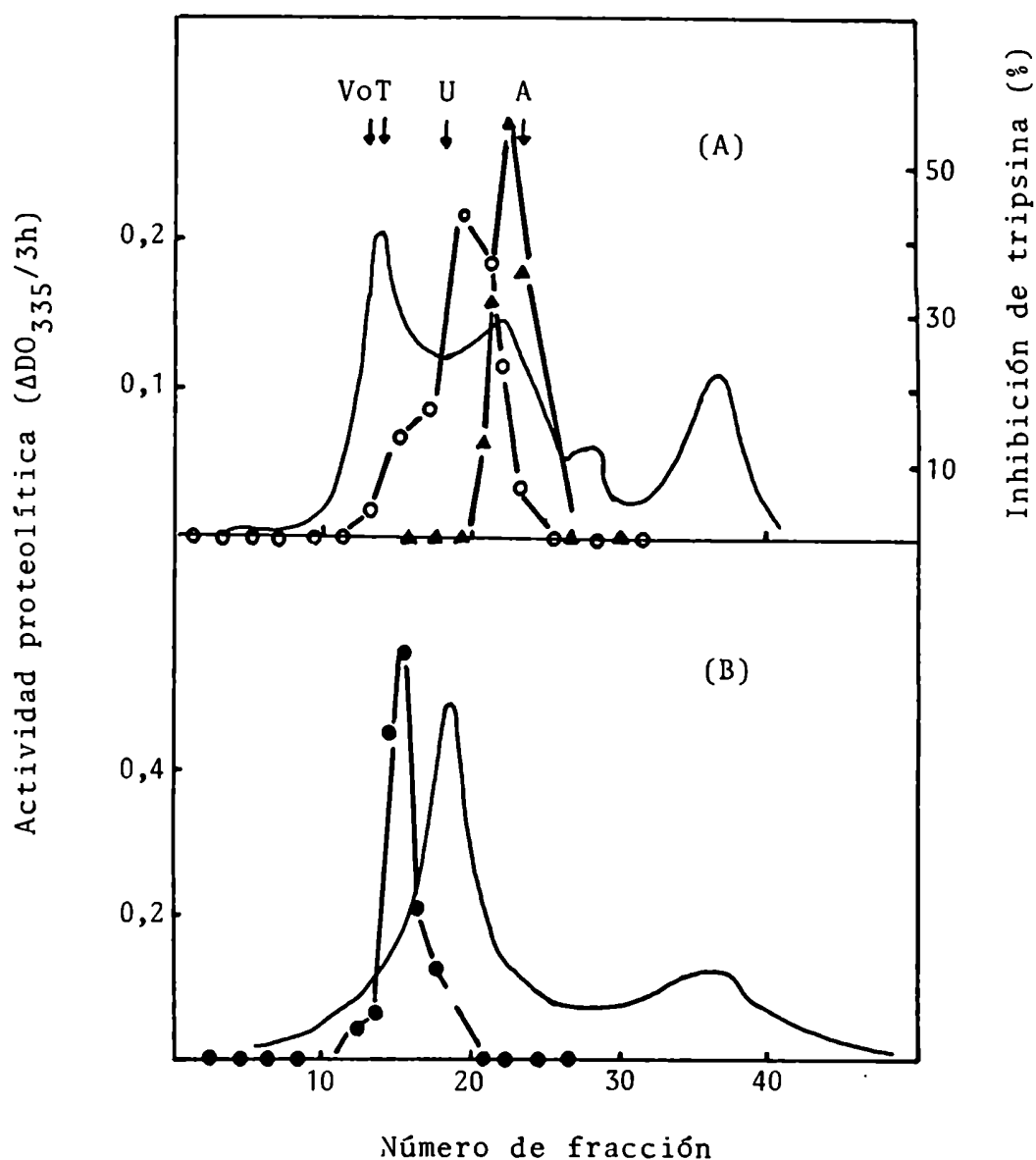


Fig. 11. Cromatografía de proteasas alcalinas e inhibidor de tripsina en columna de Sephadex G-200. Las condiciones de corrida se detallaron en la sección M.7. La actividad proteolítica (60°C) se determinó como se describió en la sección M.5, empleando alícuotas de 0,5 ml de cada fracción, a pH 8,5 para la proteasa I (o-o) y pH 9,1 para la proteasa II (●-●). La actividad inhibitoria de tripsina (▲-▲) se determinó como se indicó en la sección M.5, empleando alícuotas de 0,2 ml de cada fracción. Siembra: (A): 2 ml de la mezcla de fracciones 66-76 de la Fig. 6; (B): 2 ml de la mezcla de fracciones 89-100 de la Fig. 6. Vo, volumen de exclusión; T, tiroglobulina; U, ureasa; A, seroalbúmina bovina.

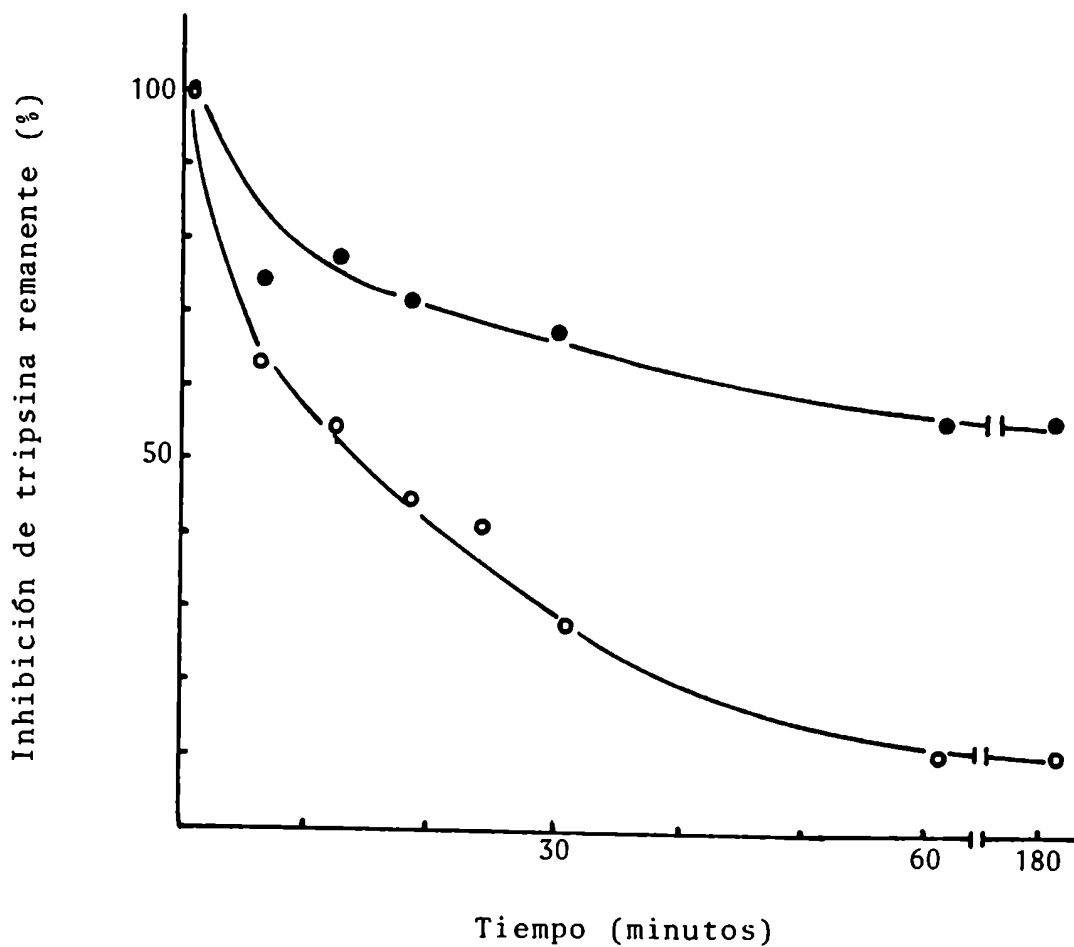


Fig. 12. Estabilidad térmica del inhibidor de tripsina. El inhibidor aislado (o-o, 1 mg prot./ml, 9 UI/mg prot.) o el extracto crudo (●-●, 13 mg prot./ml, 0,3 UI/mg prot.) fueron calentados a 60°C durante distintos períodos de tiempo, tras lo cual se midió la actividad inhibitoria remanente como se describió en la sección M.5. Los datos están graficados como porcentajes de la actividad inhibitoria en ausencia de calentamiento.

sina al calentamiento a 60°C. Puede observarse que el inhibidor parcialmente purificado se inactiva rápidamente, pero el extracto crudo retiene un 50% de su capacidad inhibitoria después de 3 horas de calentamiento. Un efecto protector similar se observó cuando el inhibidor parcialmente purificado se calentó en presencia de azocaseína al 1%.

#### R.11. EFEECTO DEL INHIBIDOR SOBRE LAS PROTEASAS I Y II

El hecho de que el inhibidor conserva un 50% de su capacidad inhibitoria al ser calentado a 60°C en presencia de azocaseína al 1% fue utilizado para ensayar su acción sobre las proteasas I y II. Como puede observarse en la Tabla V, la actividad de la proteasa II no se modificó por la presencia del inhibidor, pero se obtuvo un 39% de inhibición de la proteasa I en las mismas condiciones, a pesar de la inactivación térmica parcial del inhibidor. Al ensayar el efecto del inhibidor sobre la actividad de la proteasa I a 37°C se observó una inhibición progresivamente mayor a medida que aumenta la concentración de inhibidor (Fig. 13).

Tabla V. Acción del inhibidor de tripsina sobre las proteasas I y II.

| Proteasa | Actividad |             | % Inhibición |
|----------|-----------|-------------|--------------|
|          | Control   | + Inhibidor |              |
| I        | 0,389     | 0,237       | 39           |
| II       | 0,309     | 0,319       | 0            |

Las actividades están expresadas como  $\Delta DO_{335}/3h$  a  $60^{\circ}C$ . Se emplearon 2 UI/ml.

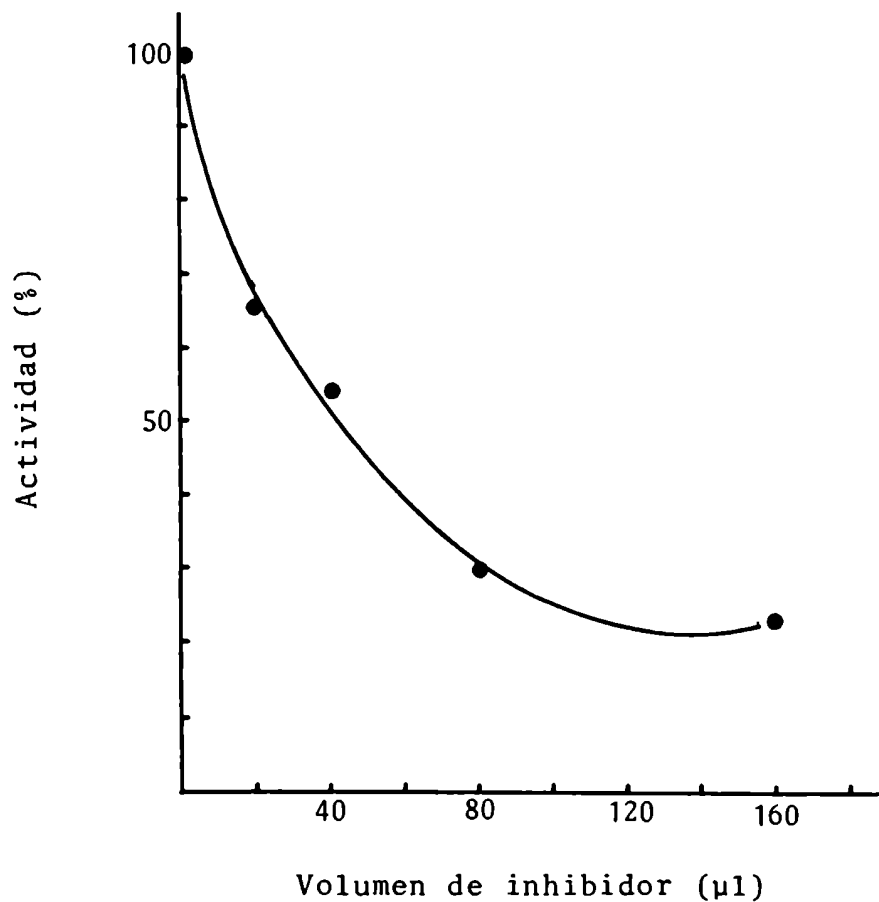


Fig. 13. Efecto del inhibidor sobre la actividad azo-caseinolítica de la proteasa I a 37°C. La actividad proteolítica se determinó como se describió en la sección M.5, empleando alícuotas de 0,3 ml de la proteasa I precalentada a 60°C durante 20 minutos como fuente de enzima. Los valores se expresan como porcentajes de la actividad obtenida en ausencia de inhibidor.



R.12. EFFECTO DE LAS PROTEASAS I Y II SOBRE MIOSINA Y ACTOMIOSINA AISLADAS

Una vez estudiadas las principales propiedades enzimáticas de las proteasas I y II, se investigó su acción sobre sustratos endógenos por electroforesis, con el objeto de obtener información que contribuya a conocer las funciones de las enzimas en el tejido in vivo, y su efecto post-mortem durante el almacenamiento del pescado. Se inició el estudio utilizando miosina purificada como sustrato, ya que esta proteína es la más abundante del músculo y cumple funciones estructurales de gran importancia. Puede verse en las Figs. 14 y 15 que las dos proteasas son capaces de degradar rápidamente a la cadena pesada de miosina en fragmentos progresivamente más pequeños. La manera en que ambas enzimas atacan a la miosina es diferente, a juzgar por los distintos perfiles electroforéticos de los productos de degradación. Además, cuando se sometió a la miosina a digestión exhaustiva por cada una de las dos proteasas, se obtuvieron distintos productos finales de proteólisis (Fig. 16). Es interesante señalar que los productos finales de la degradación de miosina por las proteasas I y II no sufrieron proteólisis ulterior al ser tratados durante dos horas adicionales con las proteasas II y I respectivamente (resultados no mostrados).

A pesar de la gran capacidad mostrada por las dos enzi-

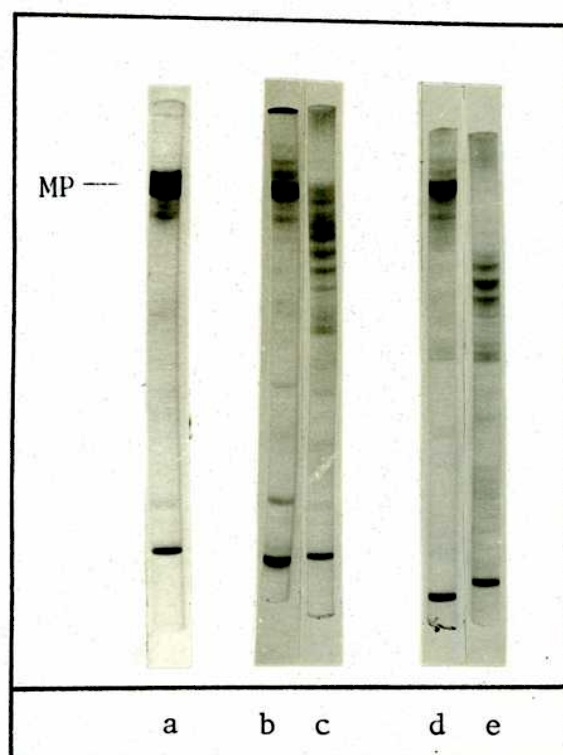


Fig. 14. Acción de la proteasa I sobre miosina a 60°C.  
(a) Miosina no incubada. (b) Control, 30 minutos. (c) Miosina incubada 30 minutos con proteasa I. (d) Control, 120 minutos. (e) Miosina incubada 120 minutos con proteasa I.

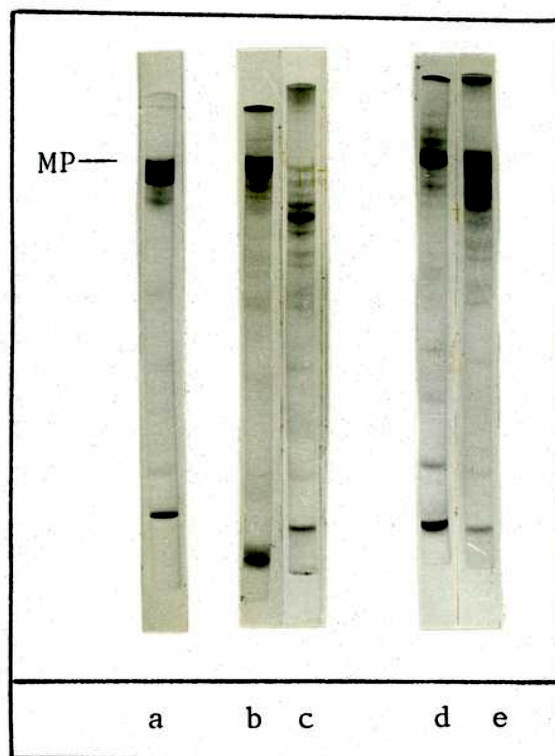


Fig. 15. Acción de la proteasa II sobre miosina a 60°C.  
(a) Miosina no incubada. (b) Control, 30 minutos. (c) Miosina incubada 30 minutos con proteasa II. (d) Control, 120 minutos. (e) Miosina incubada 120 minutos con proteasa II.

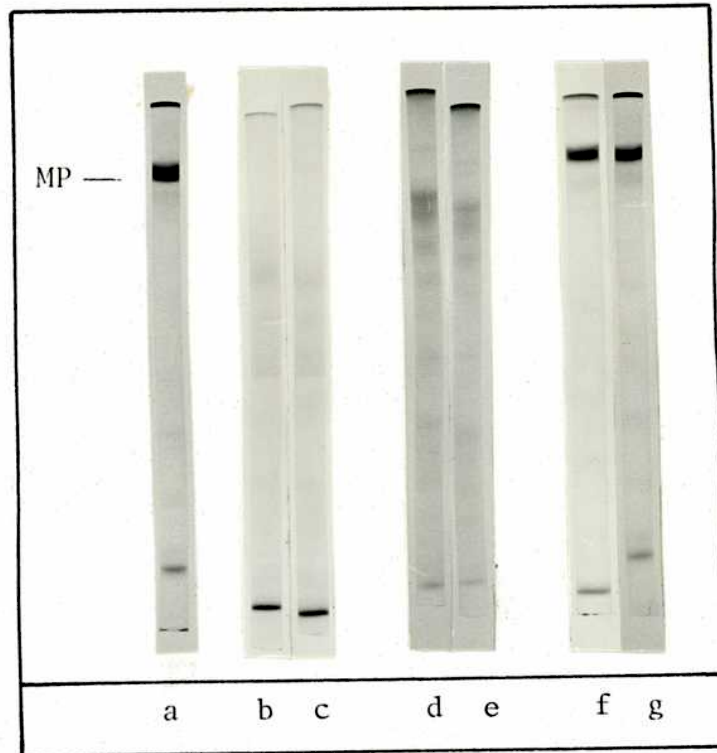


Fig. 16. Digestión exhaustiva de miosina por las proteasas I y II a 60°C. Se incubó miosina con 0,15 UA/ml de proteasas I (b y c) ó II (d y e) durante 2 horas, en condiciones similares a las descritas en la sección M.9. Después de este período de tiempo, las mezclas (b) y (d) se prepararon para el análisis electroforético, y a las mezclas (c) y (e) se les agregó una segunda porción de 0,15 UA/ml de las proteasas I y II respectivamente y se continuó las incubaciones durante otras 2 horas, tras lo cual fueron preparadas para el análisis electroforético. (a) Miosina no incubada. (f) Control, 4 horas a pH 8,5. (g) Control, 4 horas a pH 9,1.

mas para degradar miosina aislada, cuando se estudió su acción sobre complejos de actomiosina se obtuvo un resultado interesante: sólo la proteasa I fue capaz de degradar las cadenas pesadas de miosina del complejo, mientras que la actomiosina permaneció intacta tras ser incubada con la proteasa II en las mismas condiciones (Figs. 17 y 18).

#### R.13. EFEECTO DEL INHIBIDOR SOBRE LA DEGRADACION DE MIOSINA POR LA PROTEASA I.

Habiéndose observado que la actividad azocaseinolítica de la proteasa I se afectaba por el inhibidor (Tabla V y Fig. 13), se investigó la acción de éste sobre la proteólisis de miosina por dicha enzima. El experimento se realizó a 37°C para evitar la inactivación del inhibidor que ocurriría a 60°C. Como puede observarse en la Fig. 19, la miosina no es degradada por la proteasa I (e) a menos que la enzima sea preincubada a 60°C antes de la incubación (f). En este paso presumiblemente ocurre la inactivación del inhibidor presente en la fracción enzimática (Figs. 6 y 12), ya que el agregado de inhibidor parcialmente purificado después de la preincubación a 60°C (g) evita nuevamente la degradación de miosina.

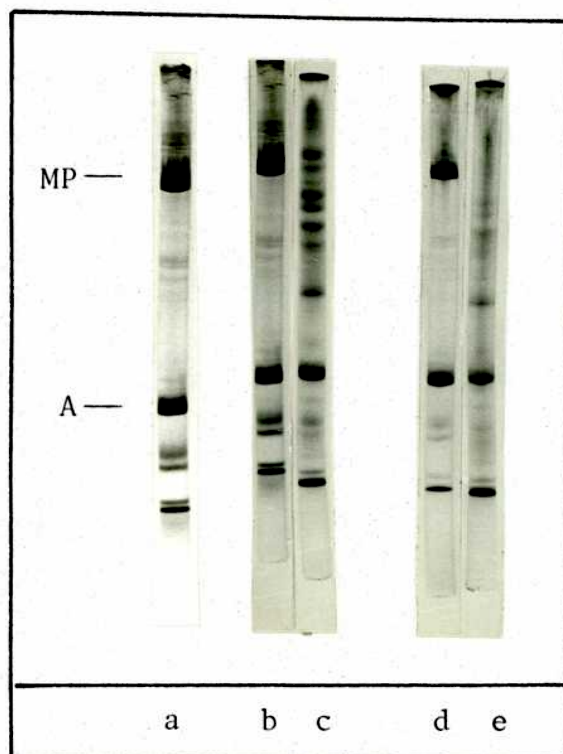


Fig. 17. Acción de la proteasa I sobre actomiosina a 60°C. (a) Actomiosina no incubada. (b) Control, 30 minutos. (c) Actomiosina incubada 30 minutos con proteasa I. (d) Control, 120 minutos. (e) Actomiosina incubada 120 minutos con proteasa I.

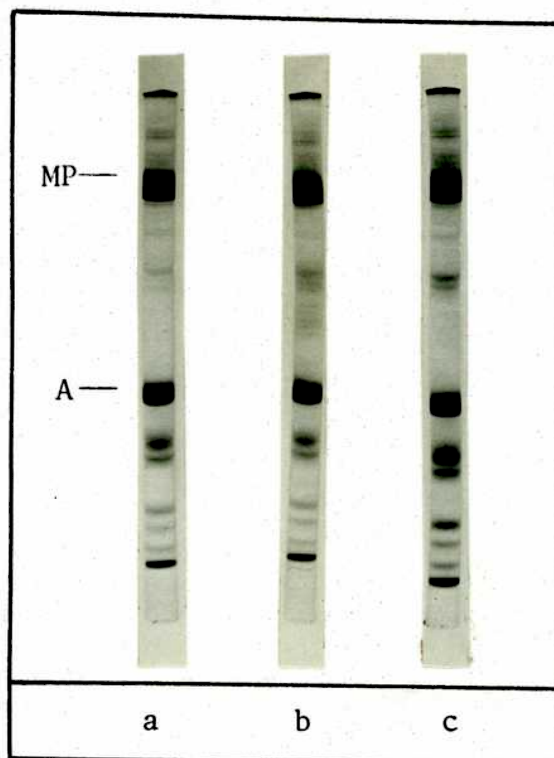


Fig. 18. Acción de la proteasa II sobre actomiosina a 60°C. (a) Actomiosina no incubada. (b) Control, 120 minutos. (c) Actomiosina incubada 120 minutos con proteasa II.



Fig. 19. Acción del inhibidor sobre la degradación de miosina por la proteasa I. (a-c) Muestras no incubadas. (a) Miosina. (b) Miosina + proteasa I. (c) Inhibidor. (d-g) Muestras incubadas 3 horas a 37°C. (d) Miosina, control. (e) Miosina + proteasa I. (f) Miosina + proteasa I pre-calentada 20 minutos a 60°C. (g) Igual que (f), con el agregado de 1 UI/ml.



#### R.14. ACCION DE LA PROTEASA I SOBRE MIOFIBRILLAS INTACTAS

Ya que la proteasa I había mostrado capacidad para degradar miosina aislada y complejos de actomiosina, se emprendió el estudio de la acción de dicha enzima sobre miofibrillas intactas, en lo que probablemente sea un sistema más representativo de lo que puede suceder en el músculo. Las incubaciones se efectuaron a 37°C para evitar la desorganización de la estructura miofibrilar que se produciría por efecto de temperaturas más altas. Las miofibrillas fueron incubadas con la proteasa I por distintos tiempos, y los resultados se examinaron por microscopía óptica y electrónica, y se analizaron por electroforesis.

##### R.14.1. Microscopía óptica.

En las Figs 20 a y b, que corresponden a miofibrillas no incubadas (a) e incubadas durante 60 minutos con la enzima inhibida (b), pueden observarse estructuras con alto grado de organización, con numerosos sarcómeros perfectamente alineados. Las Figs. 20 c y d corresponden a 30 minutos de incubación con la proteasa I, y muestran dos grados distintos de alteración: en la Fig. 20 c se observa una estructura en forma de "Y", que probablemente represente un estadio temprano de modificación en el cual se produciría una separación de miofibrillas adyacentes, mientras que la Fig. 20 d

muestra una alteración más pronunciada, ya que se observan fragmentos de miofibrillas constituidos por un pequeño número de sarcómeros, en los cuales se perdió el alto grado de ordenamiento e integridad estructural que presentaban las miofibrillas no incubadas. La Fig. 20 e, que corresponde a 1 hora de incubación con la proteasa I, permite observar una pérdida de organización mucho más marcada aún.

#### R.14.2. Microscopía electrónica.

La Fig. 21 muestra micrografías electrónicas obtenidas tras incubar miofibrillas con la proteasa I por distintos períodos de tiempo. Comparando las Figs. 21 c y d, correspondientes a 30 y 60 minutos de incubación respectivamente, con los controles (Figs. 21 a y b), pueden observarse varios signos de una alteración progresiva, tales como la remoción de las líneas Z, la pérdida de interacción entre miofibrillas adyacentes y entre sarcómeros contiguos de una misma miofibrilla, la pérdida de la ultraestructura filamentosa en el interior de cada sarcómero y la alteración de su clásica forma rectangular y regular, y la liberación de gran cantidad de material particulado de las miofibrillas. La Fig. 21 e, correspondiente a una incubación de 2 horas, muestra una zona muy dañada, en la cual quedan muy pocos elementos estructurales reconocibles.

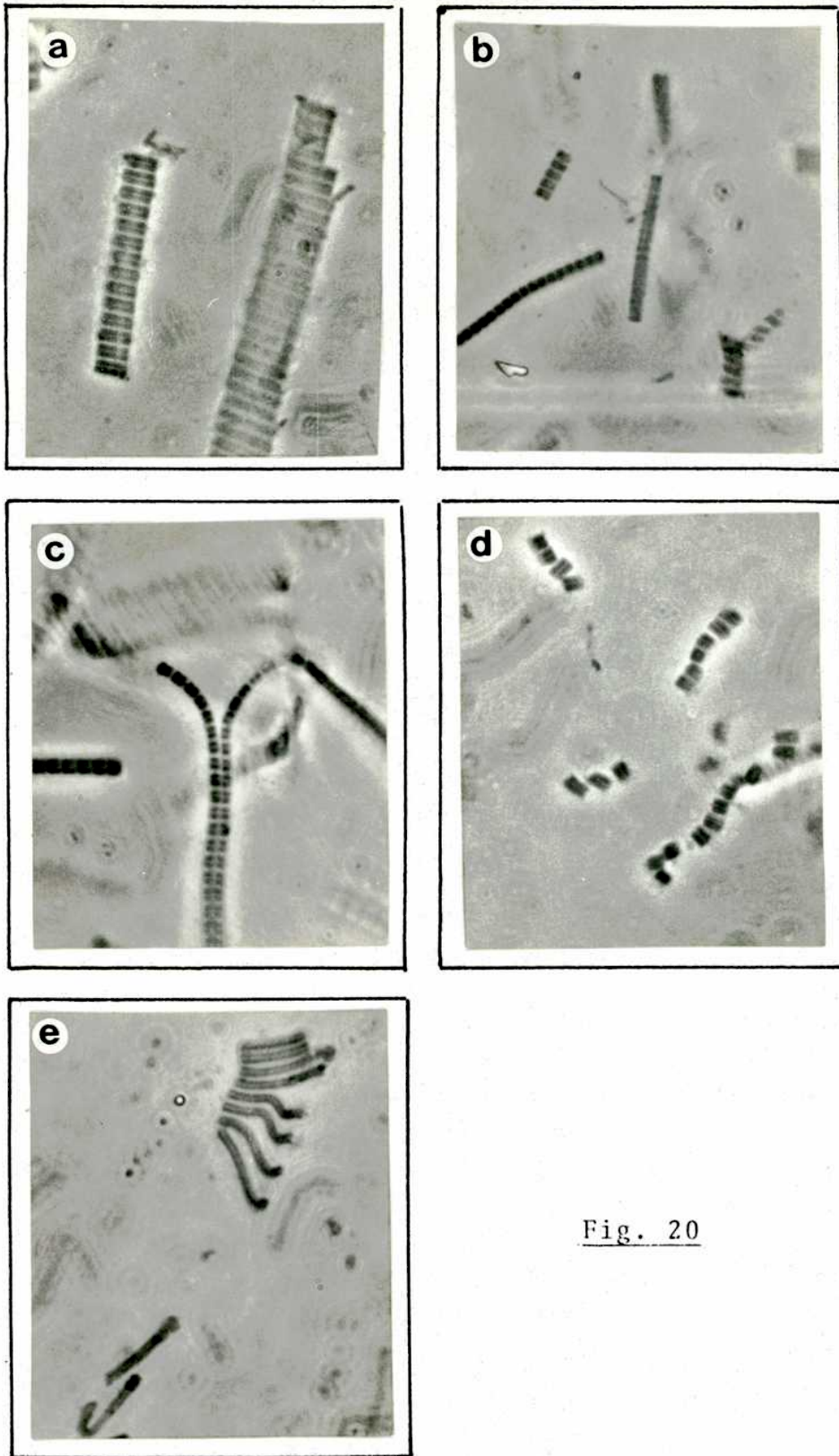


Fig. 20

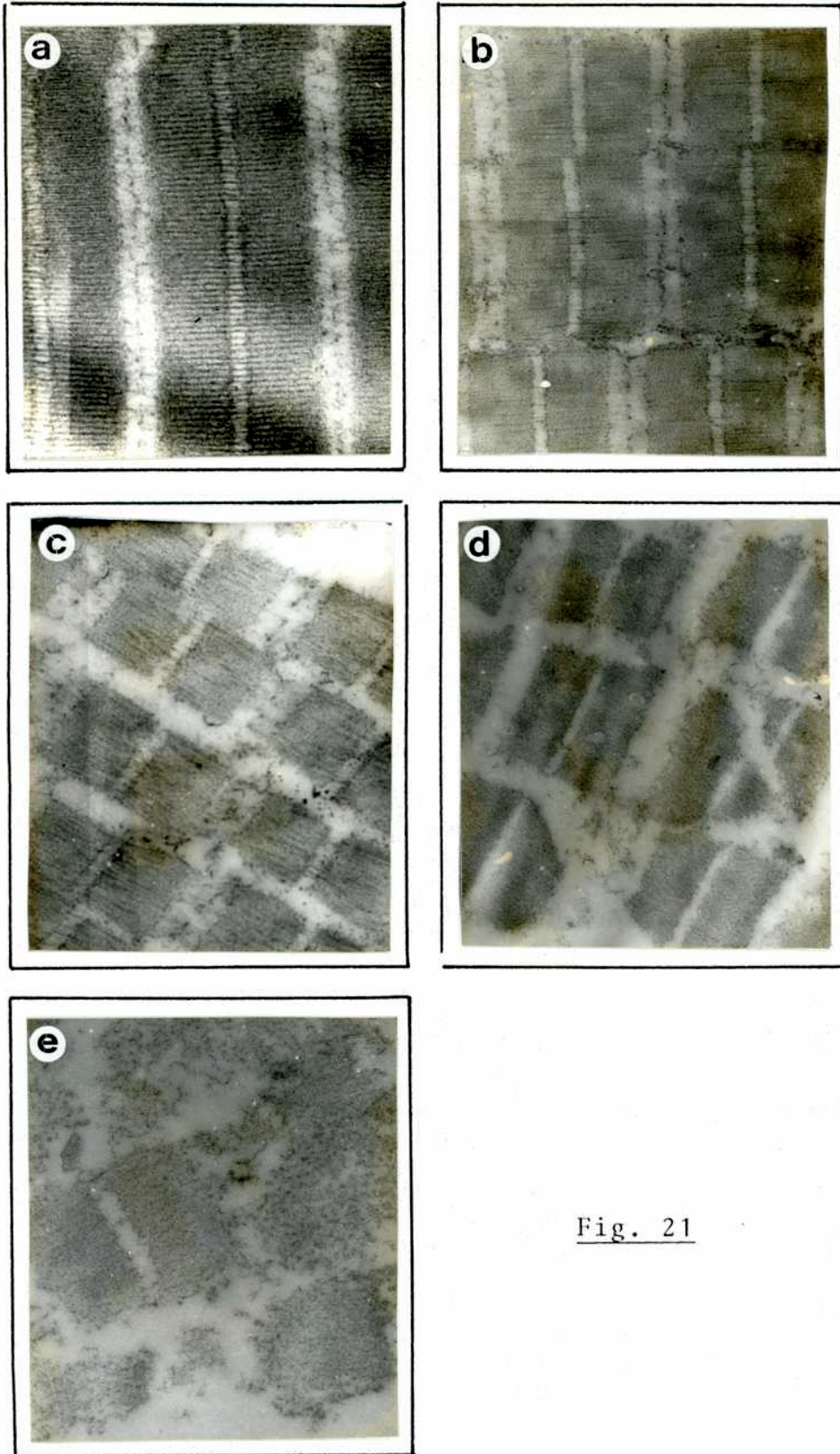


Fig. 21

Fig. 20. Micrografías ópticas de la degradación de miofibrillas por la proteasa I. (a) Miofibrillas no incubadas. (b) Control, 60 minutos. (c) y (d) Miofibrillas incubadas 30 minutos con proteasa I. (e) Miofibrillas incubadas 60 minutos con proteasa I. Aumento: 1250x.

Fig. 21. Micrografías electrónicas de la degradación de miofibrillas por la proteasa I. (a) Miofibrillas no incubadas. (b) Control, 60 minutos de incubación. (c-e) Miofibrillas incubadas con proteasa I: (c) 30 minutos; (d) 60 minutos; (e) 120 minutos. Los controles correspondientes a 30 y 120 minutos de incubación fueron similares al de 60 minutos y a las miofibrillas no incubadas. Aumento: 20000x. Escala: 1 cm = 0,8  $\mu$ m.

### R.14.3. Análisis electroforético.

La Fig. 22 muestra los perfiles electroforéticos en geles de poliacrilamida al 10% (22 A) y al 5% (22 B) de miofibrillas incubadas con la proteasa I por distintos períodos de tiempo. A medida que aumenta el tiempo de incubación se observa una disminución progresiva de la banda correspondiente a la cadena pesada de miosina, la aparición transitoria de dos productos de degradación con pesos moleculares de 175 y 147 kDa, y la conversión de los mismos a un fragmento con un peso molecular de 134 kDa en dos horas de incubación. Este polipéptido y otro con un peso molecular de 36 kDa producido durante la incubación parecen ser resistentes a una proteólisis ulterior, ya que los perfiles que se observan en la línea 4 de las Figs. 22 A y 22 B no se modificaron significativamente al extender el tiempo de incubación hasta 4 horas ni al duplicar la concentración de enzima empleada (resultados no mostrados).

Además de lo expresado para la cadena pesada de miosina, se puede observar la desaparición de los cuatro polipéptidos que migran entre la actina y el SBTI, cuyos pesos moleculares coinciden con los descritos en bibliografía para la tropomiosina, las subunidades T e I de la troponina y la cadena liviana 1 de la miosina (81). En cambio, las bandas correspondientes a actina y  $\alpha$ -actinina no se modifican sustancialmente como resultado de la incubación.

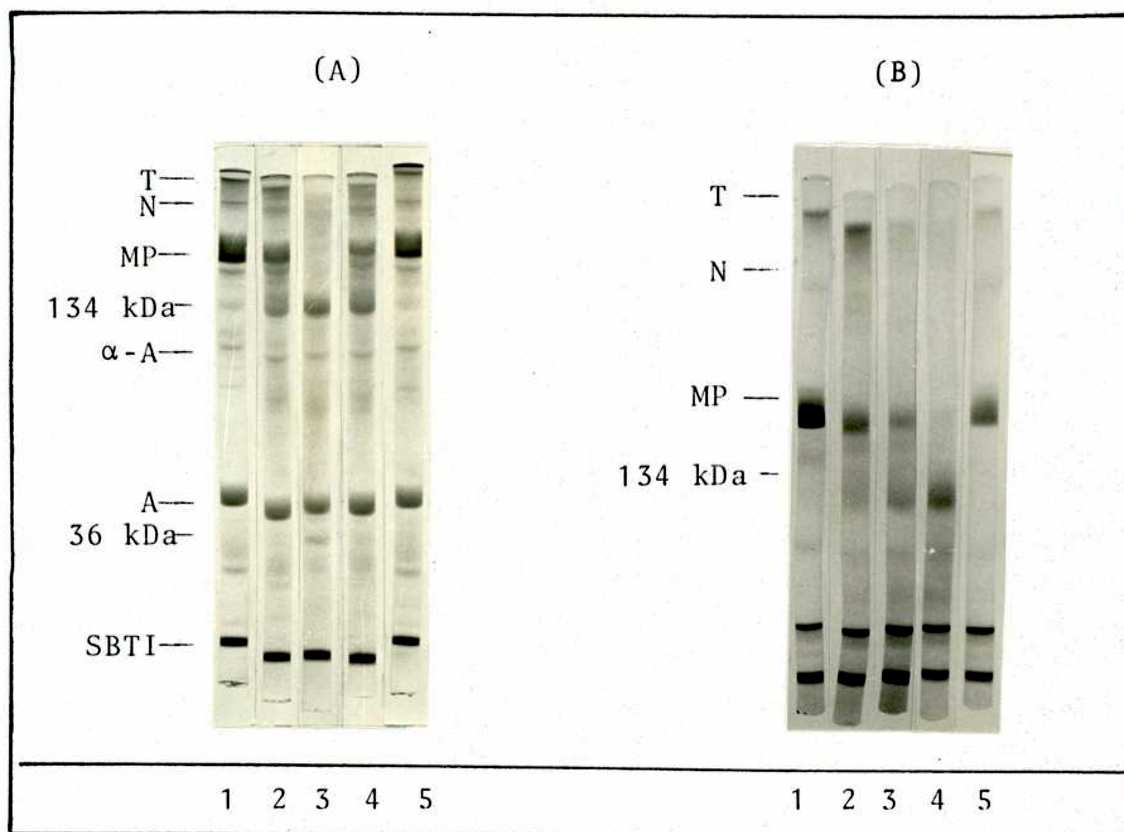


Fig. 22. Análisis electroforético de la degradación de miofibrillas por la proteasa I. (1) Miofibrillas no incubadas. (2-4) Miofibrillas incubadas con proteasa I. (2) 30 minutos. (3) 60 minutos. (4) 120 minutos. (5) Control, 120 minutos. Las muestras fueron sembradas en gels de SDS-poliacrilamida al 10% (A) y al 5% (B).

Un punto importante en la digestión de las miofibrillas por la proteasa I es la desaparición de las bandas correspondientes a titina y nebulina, por la importancia de estas proteínas en el mantenimiento de la integridad muscular (175). Este efecto también puede observarse en las Figs. 22 A y 22 B.

La Fig. 23 muestra el resultado de analizar por electroforesis los polipéptidos solubilizados por acción de la proteasa I sobre miofibrillas. Puede observarse en (d) que el sobrenadante de la digestión se enriquece de actina,  $\alpha$ -actinina y los principales productos de degradación si se lo compara con el material soluble que resulta de incubar miofibrillas sin el agregado de enzima (c).

La Fig. 24 muestra la influencia del pH en la acción de la proteasa I sobre miofibrillas. Puede observarse que la enzima presenta gran capacidad de degradar miofibrillas en todo el rango de pH analizado, que se extiende desde 6,8 hasta 9,1.

En las Figs. 25 y 26 se compara el modo en que la proteasa I y la tripsina degradan miofibrillas. Los resultados obtenidos muestran que ambas enzimas se comportan de manera similar, ya que se obtienen prácticamente los mismos perfiles electroforéticos (Fig. 25) y la banda de miosina desaparece a la misma velocidad (Fig. 26) en ambos casos.

Contrariamente a la gran capacidad exhibida por la proteasa I para degradar miofibrillas, cuando se realizaron experimentos similares con la proteasa II no se pudo detectar



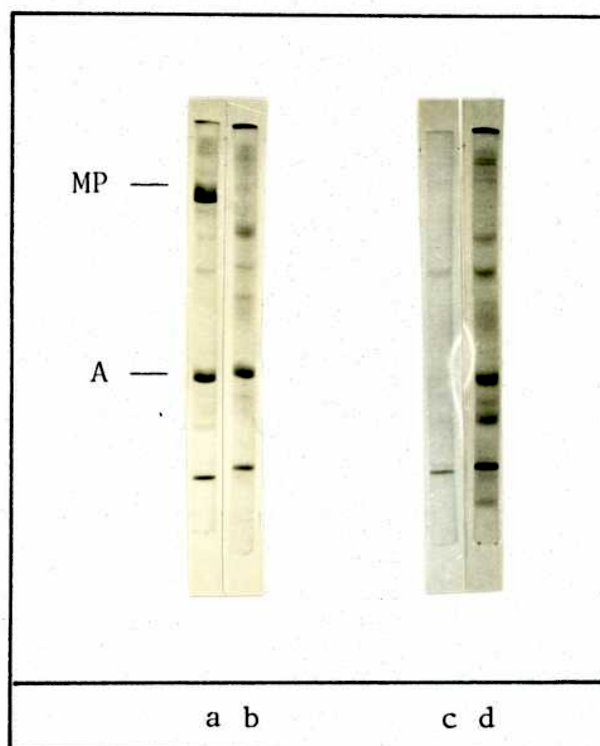


Fig. 23. Material solubilizado por la acción de la proteasa I sobre miofibrillas. (a) Miofibrillas no incubadas. (b) Miofibrillas incubadas 2 horas con proteasa I. (c) y (d) Sobrenadantes de 5000xg de la incubación de miofibrillas durante 2 horas. (c) Control, sin el agregado de proteasa I. (d) Con proteasa I.

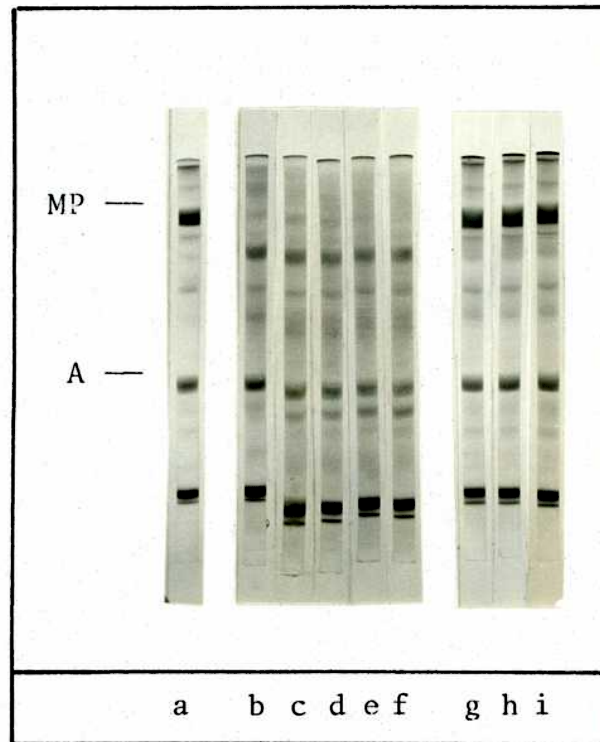


Fig. 24. Dependencia de la degradación de miofibrillas por la proteasa I con el pH. (a) Miofibrillas no incubadas. (b-f) Miofibrillas incubadas 2 horas con proteasa I a pH: 6,8 (b); 7,5 (c); 8,1 (d); 8,5 (e) y 9,1 (f). (g-i) Controles, 2 horas de incubación a pH: 6,8 (g); 8,1 (h) y 9,1 (i). Los buffers empleados fueron los mismos que se describieron en la sección M.6.

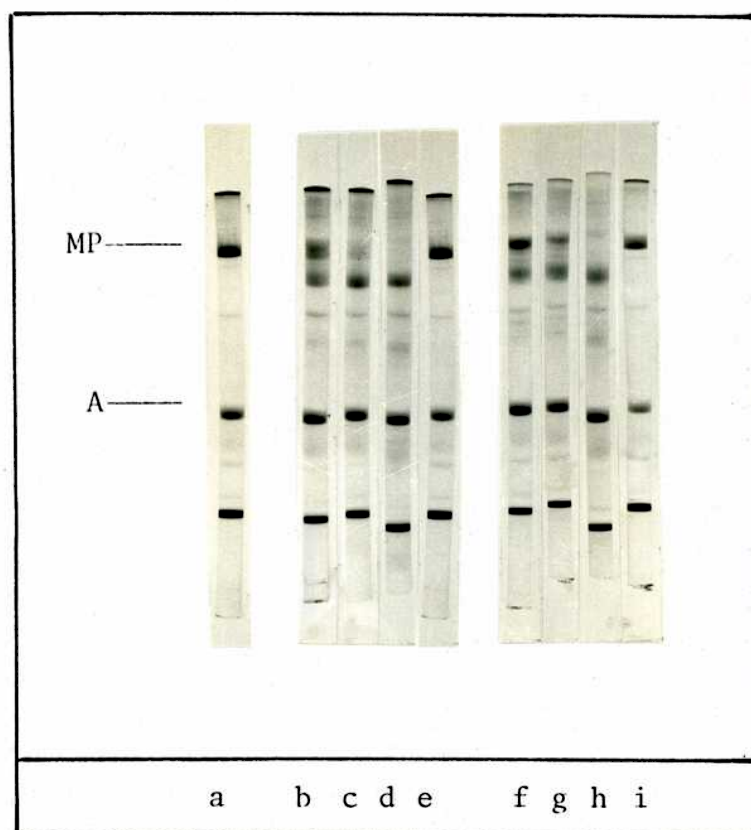


Fig. 25. Análisis electroforético de la degradación de miofibrillas por proteasa I y tripsina. Se incubaron miofibrillas con 0,15 UA/ml de proteasa I (b-e) y con la cantidad de tripsina que presenta la misma actividad azocaseinolítica que esa cantidad de proteasa I a 37°C y pH 7,5 (f-i). (a) Miofibrillas no incubadas. (b) y (f), 15 minutos de incubación. (c) y (g), 30 minutos de incubación. (d) y (h), 60 minutos de incubación. (e) y (i), controles, 60 minutos de incubación.

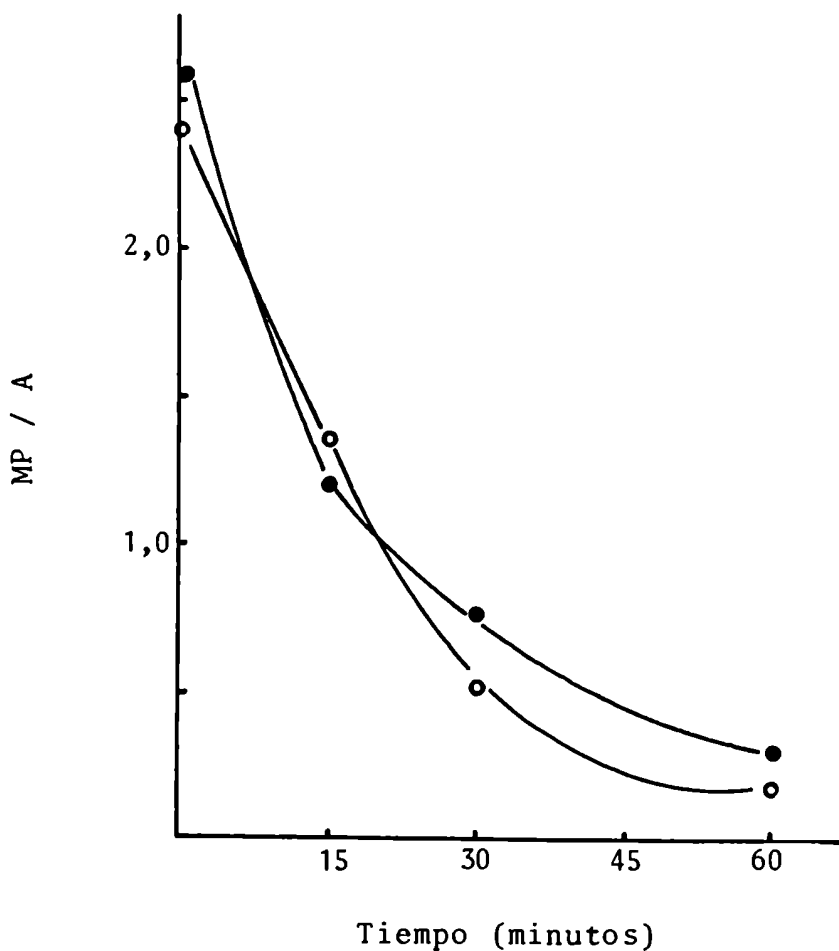


Fig. 26. Análisis densitométrico de la degradación de miosina presente en miofibrillas por proteasa I y tripsina. Los geles (a-d) y (f-i) del experimento descrito en la Fig. 25 fueron analizados densitométricamente, y se calcularon las áreas correspondientes a las bandas de miosina pesada para cada tiempo de incubación, normalizándolas con respecto a las áreas correspondientes a las bandas de actina en cada gel (se supone despreciable la proteólisis sufrida por la actina en los tiempos empleados). (o-o) Tratamiento con proteasa I; (●-●) tratamiento con tripsina. MP/A, relación miosina pesada/actina.

ningún efecto degradativo, ni aún en presencia de agente reductor en el medio de incubación. Además, los resultados obtenidos por la acción combinada de ambas proteasas sobre miofibrillas no difirieron de los descritos anteriormente empleando únicamente proteasa I (resultados no mostrados).

#### R.15. EFFECTO DEL INHIBIDOR SOBRE LA DEGRADACION DE MIOFIBRILLAS POR LA PROTEASA I

Cuando los homogenatos totales de músculo se incubaron en condiciones similares a las empleadas en los experimentos anteriores y se analizaron por electroforesis, las proteínas miofibrilares no sufrieron cambios apreciables durante la incubación, lo que indica que la proteasa I se encontraba totalmente inactiva (Fig. 27). Probablemente esa inactividad se deba a la presencia de un exceso de inhibidor en el medio, ya que, como puede observarse en la Fig. 28, la acción de la proteasa I sobre miofibrillas puede hacerse gradualmente menos intensa a medida que se agregan al medio de incubación cantidades crecientes de inhibidor.

#### R.16. EVALUACION DE LA POSIBLE PARTICIPACION DE LA PROTEASA I EN LA PROTEOLISIS MIOFIBRILAR POST-MORTEM

Para considerar la participación de la proteasa I en la proteólisis miofibrilar durante el almacenamiento del pes-

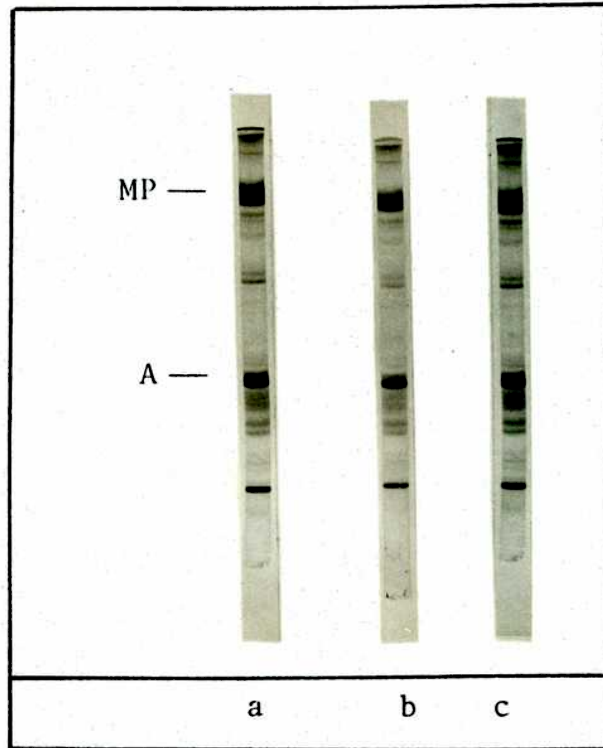


Fig. 27. Análisis electroforético de la incubación de homogenatos totales de músculo. (a) Homogenato no incubado. (b) Homogenato incubado 2 horas a pH 7,5. (c) Homogenato incubado 2 horas a pH 8,5.

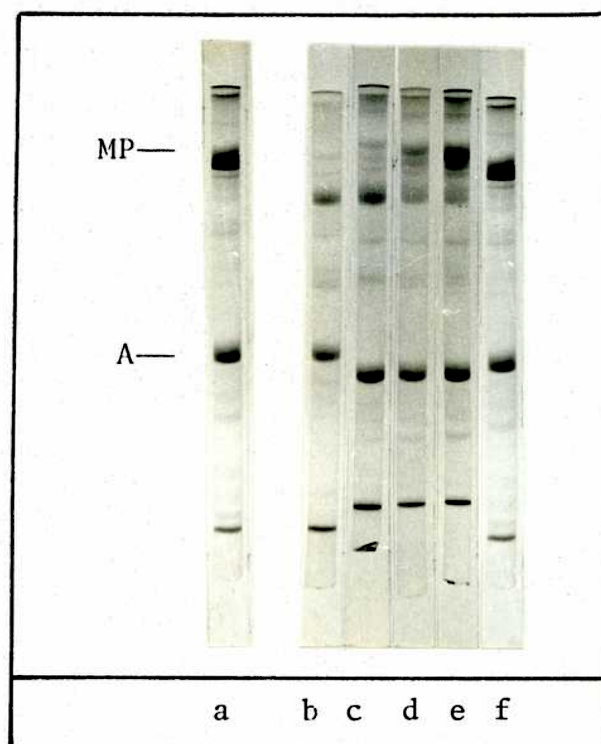


Fig. 28. Análisis electroforético del efecto del inhibidor sobre la degradación de miofibrillas por la proteasa I. (a) Miofibrillas no incubadas. (b-f) Miofibrillas incubadas con proteasa I: (b) sin el agregado de inhibidor; (c) con 0,13 UI/ml; (d) con 0,26 UI/ml; (e) con 0,60 UI/ml; (f) con 0,90 UI/ml.

cado en hielo es necesario investigar si la enzima cumple con los siguientes requisitos: (i) si es capaz de actuar sobre miofibrillas a 0°C; (ii) si no se inactiva durante el período de almacenamiento.

#### R.16.1. Acción de la proteasa I sobre miofibrillas a 0°C

La Fig. 29 muestra los perfiles electroforéticos de miofibrillas incubadas a 0°C con la proteasa I por distintos períodos de tiempo. Puede observarse que ocurrió una proteólisis cuyas características generales fueron similares a las observadas a 37°C (sección R.15.3 y Fig. 22), pero aparecieron algunas diferencias en cuanto a los productos de degradación obtenidos: (i) la cadena pesada de miosina se convirtió también en el polipéptido de 134 kDa, pero sin que pudieran visualizarse los productos de degradación transitorios que se observaban en la incubación a 37°C; (ii) aparecieron bandas correspondientes a polipéptidos de 57 y 23,5 kDa además de la del producto de 36 kDa que se observaba tras la incubación a 37°C.

#### R.16.2. Cromatografía en DEAE-Sephacel de extractos crudos de músculo almacenado a 0°C.

La Tabla VI muestra el resultado de la integración de los picos correspondientes a las dos proteasas alcalinas en



los perfiles cromatográficos de extractos preparados a 0, 5 y 12 días de conservación del músculo a 0°C. Puede observarse que los valores obtenidos no arrojaron variaciones importantes a lo largo de 12 días de almacenamiento, ya que en ningún caso se obtuvieron diferencias superiores al 15% con respecto a las actividades presentes en extractos de músculo fresco. La inhibición de tripsina no se cuantificó debido a la menor simetría de sus perfiles cromatográficos, aunque los mismos también resultaron ser bastante similares a lo largo del almacenamiento.

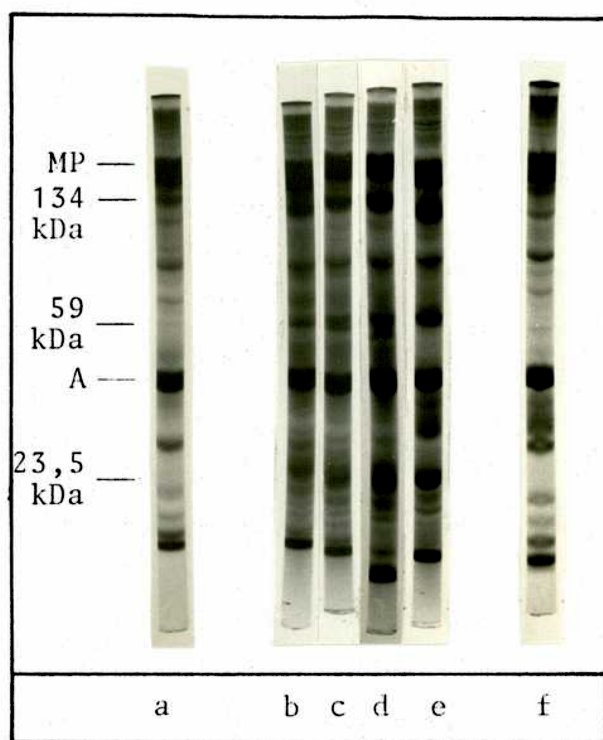


Fig. 29. Análisis electroforético de la acción de la proteasa I sobre miofibrillas a 0°C. (a) Miofibrillas no incubadas. (b-f) Miofibrillas incubadas con proteasa I. (b) 4 horas. (c) 8 horas. (d) 12 horas. (e) 24 horas. (f) Control, 24 horas.

Tabla VI. Niveles de proteasas alcalinas en músculo almacenado a 0°C.

|                | Días de almacenamiento | Act. total proteasa I | Act. total proteasa II |
|----------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
| Experimento I  | 0                      | 620                   | 1020                   |
|                | 5                      | 670                   | 900                    |
|                | 12                     | 670                   | 870                    |
| Experimento II | 0                      | 410                   | 650                    |
|                | 12                     | 360                   | 570                    |

Se separaron los dos filetes de una corvina fresca, se bañaron en azida sódica 0,1 M y se almacenaron a 0°C. Se prepararon extractos crudos a los días de almacenamiento que se indican y se cromatografiaron en columna de DEAE-Sephacel. Las condiciones de preparación de extractos, análisis cromatográficos y medición de actividad proteolítica fueron similares a las descritas en la sección M.4 y en la leyenda de la Fig. 6, con la salvedad de que se redujo la escala de trabajo: dimensiones de la columna: 1,2 x 13 cm; cantidad de

proteína sembrada: experimento I, 800 mg, experimento II, 560 mg; volumen total del gradiente de NaCl, 100 ml; volumen de las fracciones, 1,5 ml. Los valores de actividad total representan las áreas de los picos correspondientes a las proteasas I y II en los perfiles cromatográficos, calculadas por triangulación y expresadas en unidades arbitrarias.



En la parte inicial de este trabajo se describen los estudios preliminares efectuados para detectar y caracterizar las actividades proteolíticas alcalinas presentes en extractos de músculo de corvina. Los resultados obtenidos son similares a los descritos para extractos crudos de músculo de más de 20 especies pesqueras, en todas las cuales se obtuvo máxima actividad a temperaturas cercanas a los 60°C y pH alrededor de 8,0 (124). Asimismo, después de un paso de calentamiento de 5 minutos a 60°C, el extracto conserva su actividad proteolítica alcalina pero pierde apreciable cantidad de proteína contaminante, obteniéndose soluciones enzimáticas con 5 a 7 veces mayor actividad específica que los extractos crudos correspondientes. Este comportamiento es similar al descrito para extractos de músculo de carpa (130).

También fue detectada en extractos crudos la presencia de un inhibidor de tripsina, capaz de actuar sobre ella en un rango de pH relativamente amplio, y en una manera dependiente de la concentración de proteínas del extracto. Dicho inhibidor es termolábil, tal como el inhibidor de tripsina de músculo de carpa (153).

Si bien estos resultados preliminares no fueron sustancialmente distintos a los obtenidos por otros autores, la diferencia principal apareció al cromatografiar los extractos en columna de DEAE-Sephacel. En efecto, en todas las otras especies estudiadas se había logrado aislar un único pico de actividad proteolítica alcalina a 60°C (130-132),

mientras que los resultados aquí presentados (Fig. 6) muestran la existencia en músculo de corvina de dos actividades perfectamente separables por cromatografía de intercambio iónico, que fueron denominadas proteasas I y II.

Si bien esta disparidad con otras preparaciones podría atribuirse a diferencias entre especies, no puede descartarse la posibilidad del enmascaramiento de actividades enzimáticas por altos niveles de inhibidores endógenos, ya que la necesidad de las células de controlar perfectamente la acción de sus proteasas puede llevar a la formación de complejos enzima-inhibidor lo suficientemente estables como para dificultar la detección de ciertas enzimas. Con respecto a esto, hay en bibliografía numerosos ejemplos de serín-proteasas capaces de formar complejos con inhibidores proteicos con constantes de asociación tan altas como  $10^{-8}$ - $10^{-10}$  M<sup>-1</sup> (206).

Pero además, existen diferencias entre esta preparación y las descritas por otros autores en cuanto al tratamiento de las muestras con anterioridad a la siembra en la columna de intercambio iónico. En efecto, mientras en este trabajo se emplea el extracto crudo de músculo, en las otras preparaciones se incluyen etapas previas de purificación (fraccionamiento con sulfato de amonio y calentamiento) que, si bien parecen efectivas, pueden haber modificado de alguna manera el perfil de proteasas en las muestras. Con respecto a esto es interesante señalar que cuando se sometió el extracto crudo de músculo de corvina a 5 minutos de calentamiento a 60°C,

se centrifugó, y el sobrenadante se cromatografió en columna de DEAE-Sephacel, la proteasa II no apareció en el eluato (resultados no mostrados). Las causas de este hecho se desconocen, pero difícilmente puedan atribuirse a desnaturalización térmica de la enzima, ya que la proteasa aislada resiste períodos de calentamiento a 60°C mucho más prolongados que 5 minutos. Podría pensarse que la enzima hubiera sido arrastrada por el material insoluble que se separa en la centrifugación, aunque tampoco pudo recuperarse la actividad resuspendiendo ese precipitado. De todos modos, por este hecho y porque el paso de calentamiento produce la inactivación parcial del inhibidor de tripsina presente en el extracto, es que las preparaciones se efectuaron a partir de los extractos crudos y no de los calentados, si bien estos últimos aparecían inicialmente como ventajosos por su mayor actividad específica sin pérdida de rendimiento (sección R.1). Esa conservación de la actividad total del extracto calentado con respecto al crudo podría explicarse por una compensación entre la pérdida de la proteasa II y la inactivación del inhibidor por efecto del calentamiento.

Comparando las propiedades de las dos proteasas alcalinas de músculo de corvina con datos de la bibliografía puede concluirse que la proteasa II es similar a la enzima identificada previamente en numerosas especies pesqueras (124), ya que comparte muchas de sus características más significativas:



- a) Tiene una temperatura óptima de 60°C y no presenta actividad por debajo de 50°C en los medios estándar de incubación (130,131,206).
- b) Su óptimo de temperatura se corre hacia valores menores a medida que aumenta la concentración de urea en el medio de incubación (133).
- c) Es una tiol-proteasa, a juzgar por su comportamiento frente a reactivos bloqueantes y protectores de grupos tiol (131).
- d) Es una proteína de alto peso molecular, probablemente multimérica. El valor de 363 kDa obtenido para la enzima de corvina es menor que el de *Argyrosomus argentatus* (920 kDa), carpa y barracuda (780 kDa) (132), y mayor que el de *Micropogon undulatus* (80 kDa) (207).

En cambio, la proteasa I es una enzima diferente a las descritas previamente en músculo de pescado, y su comportamiento frente a inhibidores y sustratos sintéticos y naturales (Tablas III y IV, Fig. 25) permite tipificarla como serín-proteasa de tipo tripsina. Si bien la existencia de una enzima de este tipo en músculo parecería obvia teniendo en cuenta que varios inhibidores de tripsina han sido aislados de tejido muscular de distintas fuentes (141,149,150,153), en ninguno de esos casos se encontró una proteasa capaz de ser regulada por los mencionados inhibidores en el mismo tejido.

Los resultados presentados en este trabajo no permiten establecer el origen de las proteasas aisladas de músculo, para lo cual se requerirían estudios inmunohistoquímicos, pe-

ro sí puede descartarse la posibilidad de que las mismas provengan de mastocitos, debido a que estas células no han sido encontradas en músculo de pescado bajo condiciones fisiológicas normales (208), observación que fue confirmada por examen histológico del músculo de corvina. Además, la quimasa, que es la proteína más abundante de los gránulos de los mastocitos, es una proteasa de tipo quimotripsina (209), diferente a las proteasas I y II de músculo de corvina.

Una peculiaridad de estas dos proteasas es su comportamiento frente a la temperatura y el pH, ya que su máxima actividad in vitro se presenta en condiciones de reacción bastante inusuales para la medición de una actividad enzimática (60°C y pH 8,5 y 9,1). Aunque las causas de este hecho se desconocen, parece probable que la estructura de ambas enzimas sea tan rígida como para que se necesite la aplicación de tratamientos tales como calor o agentes desnaturantes para la formación de sitios activos con la conformación adecuada. Con respecto a este punto, es interesante señalar que la proteasa alcalina de músculo de carpa también sufre un desplazamiento en la curva de actividad en función de la temperatura al ser pretratada con radiaciones gamma (133). Una explicación alternativa o complementaria a la expuesta, en especial para el caso de la proteasa I, podría ser la disminución de su interacción con el inhibidor a 60°C, teniendo en cuenta la termolabilidad del mismo (Fig. 12), o en presencia de urea. De todas maneras, es evidente que

las condiciones de pH y temperatura en que ambas enzimas trabajan en la célula viva son muy diferentes a las empleadas para medir su actividad in vitro, y probablemente adquieran las conformaciones adecuadas en presencia de ciertos compuestos químicos o por interacción con determinadas estructuras celulares. Pero más allá de cuál sea el mecanismo de activación de las enzimas en la célula viva, su termoestabilidad puede ser un elemento importante para su aplicación industrial en procesos tales como la elaboración de hidrolizados proteicos, ya que su temperatura de trabajo está por encima de la temperatura de crecimiento de la mayor parte de la flora microbiana perjudicial al producto. Con respecto a esto, en el laboratorio se investigó la presencia de proteasas termoestables en los distintos órganos que constituyen los residuos de fileteado de pescado, obteniéndose en varios de ellos niveles enzimáticos mucho más elevados que en el músculo (210).

Tal como se detalló en la Introducción, el esfuerzo central de este trabajo se volcó hacia el estudio de la acción de las proteasas alcalinas sobre las proteínas miofibrilares, por su importancia desde los puntos de vista nutricional y textural en el músculo y por la falta de conocimientos acerca de los mecanismos mediante los cuales dichas proteínas se degradan. El estudio se inició en un sistema simple, utilizando miosina aislada como sustrato por ser la proteína más abundante del músculo y un buen sustrato para muchas proteasas (91-93,107,112,113), se continuó empleando actomiosi-

na aislada como sustrato de mayor complejidad, y se concluyó estudiando la acción de las enzimas sobre miofibrillas intactas, en un sistema que puede ser bastante representativo de lo que sucede en el músculo in vivo o post-mortem.

Los experimentos descriptos en las Figs. 14 y 15 muestran que las dos proteasas alcalinas actúan sobre la miosina aislada, por lo cual serían potencialmente capaces de intervenir en la degradación de las proteínas miofibrilares. Sin embargo, si bien la proteasa I también es capaz de degradar a las cadenas pesadas de miosina que conforman el complejo actomiosínico, el tratamiento con la proteasa II no afecta a la actomiosina en las mismas condiciones de reacción, lo cual sugiere que esta enzima probablemente cumpla funciones diferentes a las de intervenir en el catabolismo de proteínas miofibrilares. En cambio, la proteasa I no sólo es capaz de actuar sobre la actomiosina sino también de producir una destrucción completa de la integridad estructural de las miofibrillas y degradar la mayoría de sus principales proteínas constituyentes, por lo que puede considerarse un buen candidato para intervenir al menos en las primeras etapas de la degradación de proteínas miofibrilares. Como ya ha sido comentado en la Introducción (sección I.3), este proceso es considerado, al menos en sus etapas iniciales, de naturaleza no lisosomal, pero hay controversias acerca de cuáles son los sistemas proteolíticos responsables del mismo: algunos autores han atribuído a la calpaína la función de iniciar

la proteólisis miofibrilar (96,211) y otros han obtenido resultados que parecen invalidar esa posibilidad (83,88). Los efectos del tratamiento de miofibrillas con la proteasa I son mucho más drásticos que la acción proteolítica limitada que ha sido descrita para la calpaína (96-98). Esto sugiere que si la enzima tuviera acceso a las miofibrillas in vivo podría ocasionar profundas alteraciones a la estructura de la unidad contráctil, ya que después de un tratamiento intensivo con la enzima quedan muy pocos elementos miofibrilares ultraestructuralmente reconocibles (Fig. 21 e) y sólo la actina y la  $\alpha$ -actinina son resistentes a la proteólisis (Fig. 22 A, línea 4). Varios autores han demostrado que la actina es mucho menos susceptible que la miosina a la acción de distintas proteasas (92,93,113), aunque ambas proteínas son resistentes a la acción de la calpaína (96-98). Es interesante señalar que si bien la actividad azocaseinolítica de la proteasa I es máxima a 60°C y pH 8,5, su acción sobre miofibrillas es fácilmente detectable a temperaturas más bajas y pH neutro, según puede observarse en las Figs. 24 y 29.

Aunque la proteólisis de miosina aparece como el hecho más saliente en el estudio electroforético de la acción de la proteasa I sobre miofibrillas, un punto muy importante es la degradación de titina y nebulina, dos elementos citoesqueléticos de la célula muscular. Estas dos proteínas conforman junto con la desmina un extenso tramado de filamentos

transversales y longitudinales que sirven de conexión entre miofibrillas adyacentes por medio de puentes Z-Z y M-M, unen la periferia de líneas Z sucesivas por medio de largos filamentos paralelos, y refuerzan el contacto entre sarcómeros contiguos mediante pares de anillos de filamentos entrecruzados que flanquean a las líneas Z y se interconectan mediante cortas hebras laterales (173). Si bien las funciones que desempeña individualmente cada uno de los componentes proteicos que conforman esa red no están perfectamente establecidas, distintas evidencias sugieren que esa estructura tridimensional está relacionada con el mantenimiento de la integridad, la continuidad mecánica y la elasticidad de la fibra muscular (171-177). Por tales motivos, las proteólisis de titina y nebulina, que son eventos tempranos en la acción de la proteasa I sobre las miofibrillas, podrían ser pasos determinantes de la desorganización estructural ocasionada por la enzima, que se observa en las Figs. 20 y 21.

La titina y la nebulina son componentes relativamente abundantes de la miofibrilla, ya que juntas constituyen alrededor del 15% de la proteína miofibrilar total (171). En cambio, la desmina es un componente minoritario (0,35% de la proteína miofibrilar total (174)), por lo cual su visualización en los análisis electroforéticos de miofibrillas no resultó posible. Para lograrla se intentó reproducir técnicas descritas en bibliografía que consisten en tratar a las miofibrillas con soluciones de alta fuerza iónica de ma-

nera de extraer las proteínas contráctiles y obtener las del citoesqueleto en el residuo de centrifugación (173,174). Sin embargo, los residuos obtenidos no pudieron ser solubilizados para su análisis electroforético a pesar de haberse ensayado diversas condiciones de desnaturalización. Este inconveniente metodológico ha sido mencionado en la bibliografía, y algunos autores han podido subsanarlo incorporando cloruro de guanidinio al medio solubilizante (173), pero ese tratamiento tampoco dio resultado para este caso.

Si bien la determinación de la localización subcelular de estas proteasas puede ser importante para conocer como operan in vivo, es evidente que su acción debe estar cuidadosamente controlada en la célula bajo condiciones fisiológicas. Una consecuencia de dicho control sería el hecho de que tras la incubación de homogenatos totales de músculo no se observen signos de proteólisis en el análisis electroforético (Fig. 28). Considerando las características de ambas enzimas, es factible que estén reguladas por diferentes mecanismos: la proteasa I mediante la interacción con su inhibidor endógeno y la proteasa II a través del estado de oxidación de sus grupos tiol. Por este motivo, parece más probable que ambas desempeñen funciones fisiológicas diferentes y no que ocurra una activación simultánea de las dos enzimas para participar en forma combinada en una determinada vía degradativa. De todos modos, el conocimiento detallado de la manera en que la célula viva controla a estas proteasas

sería de gran interés, no sólo como aporte al conocimiento de las bastante poco exploradas vías proteolíticas extralisosomales sino también para poder determinar su participación en la degradación post-mortem de las proteínas musculares, con los efectos perjudiciales a la calidad de la carne de pescado que ésta implica. Con respecto a esta cuestión, es importante destacar que el perfil cromatográfico de las proteasas no se modifica sustancialmente en el músculo conservado en frío (Tabla VI), por lo cual ambas enzimas podrían extender su acción a lo largo del período de almacenamiento, y que la proteasa I es capaz de actuar sobre miofibrillas aisladas a 0°C (Fig. 29), con lo cual, de tener acceso a esos sustratos en una forma activa, podría participar en los procesos degradativos que ocurren en el músculo durante el almacenamiento del pescado en hielo. Sin embargo, el hecho de que los niveles de inhibidor endógeno aparentemente tampoco se modifiquen durante el almacenamiento es un elemento contrario a esa posibilidad, por lo cual el conocimiento de los mecanismos de activación y desactivación de la enzima se hacen necesarios para considerar su participación en la proteólisis post-mortem.





-Se han aislado y caracterizado dos proteasas alcalinas, denominadas I y II, y un inhibidor de tripsina de músculo esquelético de corvina.

-Las dos proteasas son termoestables, presentando su óptimo de temperatura a 60°C, mientras que el inhibidor es termolábil.

-La proteasa I es una serín-proteasa de tipo tripsina, con propiedades diferentes a las de las otras enzimas proteolíticas conocidas en músculo de pescado hasta el presente, mientras que la proteasa II es una tiol-proteasa similar a las descritas para numerosas especies pesqueras.

-El inhibidor de tripsina es capaz de actuar específicamente sobre la proteasa I, constituyéndose en un potencial elemento de regulación de la proteólisis extralisosomal.

-Las dos proteasas son capaces de degradar a la miosina aislada, pero sólo la proteasa I actúa sobre las cadenas pesadas de miosina presentes en el complejo actomiosínico.

-La proteasa I es capaz de producir una destrucción completa de la estructura de las miofibrillas y de degradar a la mayoría de sus componentes contráctiles y citoesqueléticos, por lo que podría participar en el catabolismo de pro-

tefnas miofibrilares in vivo.

-Los niveles de las dos proteasas y el inhibidor no se modifican significativamente a lo largo del período de almacenamiento del músculo a 0°C.

-La proteasa I es capaz de degradar miofibrillas aisladas a 0°C, por lo cual podría participar en la proteólisis miofibrilar en las condiciones post-mortem de almacenamiento del pescado.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'A. J. J.' with a long horizontal stroke extending to the right.A handwritten signature in black ink, appearing to be 'E. J. J.' with a long horizontal stroke extending to the right.



1. De Duve, C. y Wattiaux, R. (1966) *Ann. Rev. Physiol.* 28, 435-492.
2. Willingham, M.C. y Pastan, I. (1980) *Cell* 21, 67-77.
3. Mortimore, G.E. y Mondon, C.E. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 2375-2383.
4. Woodside, K. y Mortimore, G.E. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 6474-6481.
5. Neely, A.N., Cox, J.R., Fortney, J.A., Schworer, C.M. y Mortimore, G.E. (1977). *J. Biol. Chem.* 252, 6948-6954.
6. Mortimore, G.E. y Schworer, C.M. (1977) *Nature* 270, 174-176.
7. Pfeifer, J. (1978) *J. Cell Biol.* 78, 152-167.
8. Schworer, C.M., Shiffer, K.A. y Mortimore, G.E. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 7652-7658.
9. Long, W.M., Chua, B.H., Munger, B.L. y Morgan, H.E. (1984) *Fed. Proc.* 43, 1295-1300.
10. Hershko, A. y Ciechanover, A. (1982) *Ann. Rev. Biochem.* 51, 335-364.
11. Dice, J.F., Walker, C.D., Byrne, B. y Cardiel, A. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 2093-2097.
12. Russell, D.H. y Snyder, S.H. (1969) *Mol. Pharmacol.* 5, 253-262.
13. Wang, C. y Touster, O. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 4896-4902.
14. Goldberg, A.L. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 2640-2644.
15. Goldberg, A.L., Howell, E.M., Li, J.B., Martel, S.B. y Prouty, W.F. (1974) *Fed. Proc.* 33, 1112-1120.
16. Dice, J.F., Dehlinger, P.J. y Schimke, R.T. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 4220-4228.
17. Segal, H.L., Winkler, J.R. y Miyagi, M.P. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 6364-6365.
18. Bohley, P. Langner, J., Ansorge, S., Miede, M., Miede, C. y Hanson, H. (1972) *Acta Biol. Med. Germ.* 28, 321-328.

19. Dean, R.T. (1975) *Eur. J. Biochem.* 58, 9-14.
20. Bohley, P., Kirschke, H., Langner, J., Wiederanders, B., Ansorge, S. y Hanson, H. (1976). En: *Intracellular Protein Catabolism* (Turk, V., ed.), 2º Int. Symp., J. Stefan Inst., Ljubljana, Yugoslavia.
21. Dehlinger, P.J. y Schimke, R.T. (1972) *J. Biol. Chem.* 246, 2574.
22. Dice, J.F. y Goldberg, A.L. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 3893-3897.
23. Poole, B., Okhuma, S. y Warburton, M. (1978). En: *Protein Turnover and Lysosomal Function* (Segal, H.L. y Doyle, D.J., eds.), pp. 43-58. Academic Press, New York.
24. Livesey, G., Williams, K.E., Knowles, S.E. y Ballard, E.J. (1980) *Biochem. J.* 188, 895-903.
25. Libby, P., Bursztajn, S. y Goldberg, A.L. (1980) *Cell* 19, 481-491.
26. Libby, P. y Goldberg, A.L. (1981) *J. Cell. Physiol.* 107, 185-194.
27. Amenta, J.S., Hlivko, T.J., McBee, A.G., Shinozuka, H. y Brocher, S. (1978) *Exp. Cell. Res.* 115, 357-366.
28. Knowles, S.E., Ballard, F.J., Livesey, G. y Williams, K.E. (1981) *Biochem J.* 196, 41-48.
29. Amenta, J.S., Sargus, M.J. y Baccino, F.M. (1977) *Biochem. J.* 168, 223-227.
30. Bigelow, S., Hough, R. y Rechsteiner, M. (1981) *Cell* 25, 83-93.
31. Dean, R.T. (1979) *Biochem. J.* 180, 339-345.
32. Ward, W.F., Chua, B.L., Li, J.B., Morgan, H.E. y Mortimore, G.E. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87, 92-98.
33. Neff, N.T., De Martino, G.N. y Goldberg, A.L. (1979) *J. Cell. Physiol.* 101, 439-458.
34. Bohley, P. (1968) *Naturwissenschaften* 55, 211-217.
35. Bohley, P. y Riemann, S. (1977) *Acta Biol. Med. Germ.*

- 36, 1823-1827.
36. Segal, H.L., Rothstein, D.M. y Winkler, J.R. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 73, 79-84
  37. Dean, R.T. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 67, 604-609.
  38. Novikoff, A.B. y Shin, W.Y. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5039-5042.
  39. Goldberg, A.L. y St. John, A.C. (1976) Ann. Rev. Biochem. 45, 747-803.
  40. Poole, B. y Wibo, M. (1973) J. Biol. Chem. 248, 6221-6226.
  41. Epstein, D., Elias-Bishko, S. y Hershko, A. (1975) Biochemistry 14, 5199-5204.
  42. Knowles, S.E. y Ballard, F.J. (1976) Biochem. J. 156, 609-617.
  43. Vandeburgh, H. y Kauffman, S. (1980) J. Biol. Chem. 255, 5826-5833.
  44. Grinde, E. y Seglen, P.O. (1980) Biochim. Biophys. Acta 632, 73-86.
  45. Hopgood, M.F., Clark, M.G. y Ballard, F.J. (1977) Biochem. J. 164, 399-407.
  46. Levine, R.L., Oliver, C.N., Fulks, R.M. y Stadtman, E.R. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2120-2124.
  47. Levine, R.L. (1983) J. Biol. Chem. 258, 11823-11827.
  48. Oliver, C.N., Levine, R.L. y Stadtman, E.R. (1982). En: Experiences in Biochemical Perception (Ornston, L.N. y Sligar, S.G., eds.) pp. 233-249. Academic Press, New York.
  49. Roseman, J.E. y Levine, R.L. (1985) Fed. Proc. 44, 1092 (Abstract).
  50. Rivett, A.J. (1985) J. Biol. Chem. 260, 300-305.
  51. Fucci, L., Oliver, C.N., Coon, M.J. y Stadtman, E.R. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1521-1525.
  52. Oliver, C.N., Ahn, B., Wittenberger, M.E. y Stadtman, E.R. (1985). En: Cellular Regulation and Malignant Growth

- (Ebashi, S., ed.) pp. 320-331. Springer-Verlag.
53. Stadtman, E.R. (1986) TIBS 11, 11-12.
  54. Stadtman, E.R. y Wittenberger, M.E. (1985) Arch. Biochem. Biophys. 239, 379-387.
  55. Nakamura, K., Oliver, C.N. y Stadtman, E.R. (1985) Arch. Biochem. Biophys. 240, 319-329.
  56. Etlinger, J.D. y Goldberg, A.L. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 54-58.
  57. Ciechanover, A., Hod, Y. y Hershko, A. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 81, 1100-1105.
  58. Hershko, A., Ciechanover, A. y Rose, I.A. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3107-3110.
  59. Ciechanover, A., Elias, S., Heller, H., Ferber, S. y Hershko, A. (1980) J. Biol. Chem. 255, 7525-7528.
  60. Wilkinson, K.D., Urban, M.K. y Haas, A.L. (1980) J. Biol. Chem. 255, 7529-7532.
  61. Ciechanover, A., Heller, H., Elias, S., Haas, A.L. y Hershko, A. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1365-1368.
  62. Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A.L. y Rose, I.A. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1783-1786.
  63. Holzer, H. y Heinrich, P.C. (1980) Ann. Rev. Biochem. 49, 63-91.
  64. Goldberg, A.L. y Dice, J.F. (1974) Ann. Rev. Biochem. 43, 835-869.
  65. Milman, G., Portnoff, L.S. y Tiemeier, D.C. (1975) J. Biol. Chem. 250, 1393-1399.
  66. Goldberg, A.L. y Chang, T.W. (1978) Fed. Proc. 37, 2301-2307.
  67. Rudermann, N.B. (1975) Ann. Rev. Med. 26, 245-258.
  68. Goldberg, A.L. (1972) En: Muscle Biology (Cassens, R. G., ed.), Vol. 1, pp. 89-118. Marcel Dekker, New York.
  69. Goldberg, A.L. (1969) J. Biol. Chem. 244, 3223-3229.



70. Morgan, H.E., Rannels, D.E., Wolpert, E.B., Giger, K. E., Robertson, J.W. y Jefferson, L.S. (1972) En: *Insulin Action*, pp. 437-459. Academic Press, New York.
71. Clowes, G.H.A., Randall, H.T. y Cha, C.J. (1980) *J. Parent. Enter. Nutr.* 4, 195-205.
72. Garlick, P.J., McNurlan, M., Fern, E., Tomkins, A. y Waterlow, J.C. (1980) *Br. Med. J.* 281, 263-265.
73. Long, C.L., Birkhahn, R.H., Geiger, J.W., Betts, J.E., Schiller, W.R. y Blakemore, W.S. (1981) *Metabolism* 30, 765-776.
74. Simon, E.J., Gross, C.S. y Lessell, I.M. (1962) *Arch. Biochem. Biophys.* 96, 41-46.
75. Rannels, D.E., McKee, E.E. y Morgan, H.E. (1977) En: *Biochemical Action of Hormones* (Litwack, G., ed.), Vol. 4, pp. 135-195. Academic Press, New York.
76. Millward, D.J., Bates, P.C., Laurent, G.J. y Lo, C.C. (1978) En: *Protein Turnover and Lysosome Function* (Segal, H.L. y Doyle, D.J., eds.), pp. 619-644. Academic Press, New York.
77. Chua, B., Kao, R., Rannels, D.E. y Morgan, H.E. (1978) *Biochem. Soc. Symp.* 43, 1-15.
78. Millward, D.J. y Garlick, P.J. (1976) En: *Intracellular Protein Catabolism* (Turk, V., ed.), 2<sup>o</sup> Int. Symp., J. Stefan Inst., Ljubljana, Yugoslavia.
79. Goldberg, A.L., Baracos, V., Rodemann, P., Waxman, L. y Dinarello, C. (1984) *Fed. Proc.* 43, 1301-1306.
80. Travis, D.F. y Travis, A. (1972) *J. Ultrastruct. Res.* 39, 124-148.
81. Goll, D.E., Robson, R.M. y Stromer, M.H. (1977) En: *Food Proteins* (Whitaker, J.R. y Tannenbaum, S.R., eds.), pp. 121-174. Avi Publishing Co., Westport, Connecticut.
82. Zak, R., Martin, A.F., Prior, G. y Rabinowitz, M. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 3430-3435.
83. Wildenthal, K., Wakeland, J.R., Ord, J.M. y Stull, J.T.

- (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96, 793-798.
84. Riebow, J.F. y Young, R.B. (1980) *Biochem. Med.* 23, 316-323.
85. Lockshin, R.A. (1975) *Life Sci.* 17, 403-410.
86. Lockshin, R.A. y Beaulaton, J. (1979) *Tissue and Cell* 11, 803-819.
87. Lockshin, R.A., Colon, A. y Dorsey, A. (1980) *Fed. Proc.* 39, 48-52.
88. Lowell, B.B., Ruderman, N.B. y Goodman, M.N. (1986) *Biochem. J.* 234, 237-240.
89. Goll, D.E., Otsuka, Y., Nagainis, P.A., Shaunon, J.D., Sathe, S.K. y Muguruma, M. (1983) *J. Food Biochem.* 7, 137-177.
90. Coffey, J.W. y de Duve, C. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 3255-3263.
91. Bird, J.W.C., Spanier, A.M. y Schwartz, W.N. (1978) En: *Protein Turnover and Lysosomal Function* (Segal, H.L. y Doyle, D.J., eds.) pp. 589-604. Academic Press, New York.
92. Matsumoto, T., Okitani, A., Kitamura, Y. y Kato, H. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 755, 76-80.
93. Matsukura, U., Okitani, A., Nishimuro, T. y Kato, H. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 662, 41-47.
94. Smith, E.L. (1948) *J. Biol. Chem.* 173, 553-569.
95. Reddy, M.K., Etlinger, J.D., Rabinowitz, M., Fischman, D.A. y Zak, R. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 4278-4284.
96. Dayton, W.R., Goll, D.E., Stromer, M.H., Reville, W.J. Zeece, M.G. y Robson, R.M. (1975) En: *Proteases and Biological Control* (Reich, E., Rifkin, D.B. y Shaw, E., eds.), pp. 551-577. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
97. Dayton, W.R., Goll, D.E., Zeece, M.G., Robson, R.M. y Reville, W.J. (1976) *Biochemistry* 15, 2150-2158.
98. Dayton, W.R., Reville, W.J., Goll, D.E. y Stromer, M. H. (1976) *Biochemistry* 15, 2159-2167.

99. Murachi, T. (1983) TIBS 8, 167-169.
100. Murachi, T. (1983) En: Calcium and Cell Function, Vol IV (Cheung, W.Y., ed.), pp. 377-410. Academic Press, New York.
101. Rasmussen, H. y Goodman, D.B.P. (1977) *Physiol. Rev.* 57, 421-509.
102. Mellgren, R.L. (1980) *FEBS Lett.* 109, 129-133.
103. Katunuma, N., Kominami, E., Kobayashi, K., Banno, Y., Suzuki, K., Chichibu, K., Hamaguchi, Y. Katsunuma, T. (1975) *Eur. J. Biochem.* 52, 37-50.
104. Holmes, D., Parsons, M.E., Park, D.C. y Pennington, R. J. (1971) *Biochem. J.* 125, 98-104.
105. Mayer, M., Amin, R. y Shafrir, E. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* 161, 20-25.
106. Noguchi, T. y Kandatsu, M. (1976) *Agric. Biol. Chem.* 40, 927-933.
107. Murakami, U. y Uchida, K. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 525, 219-229.
108. Woodbury, R.G., Everitt, M., Sanada, Y., Katunuma, N., Lagunoff, D. y Neurath, H. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 5311-5313.
109. Woodbury, R.G., Fruzenski, G.M. y Lagunoff, D. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 2785-2789.
110. Dahlmann, B., Block, I., Kuehn, L., Rutschmann, M. y Reinauer, H. (1982) *FEBS Lett.* 138, 88-90.
111. Beynon, R.J. y Kay, J. (1978) *Biochem. J.* 173, 291-298.
112. Kay, J., Siemankowski, R.F., Siemankowski, L.M. y Goll, D.E. (1982) *Biochem. J.* 201, 267-278.
113. Kay, J., Siemankowski, L.M., Siemankowski, R.F., Greweling, J.A. y Goll, D.E. (1982) *Biochem. J.* 201, 279-285.
114. Dahlmann, B., Kuehn, L., Rutschmann, M. y Reinauer, H. (1985) *Biochem. J.* 228, 161-170.
115. Dahlmann, B., Rutschmann, M., Kuehn, L. y Reinauer,

- H. (1985) *Biochem. J.* 228, 171-177.
116. Makinodan, Y. e Ikeda, S. (1971) *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 37, 1002-1006.
117. Siebert, G., Smith, A. y Von Malortie, R. (1965) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 342, 20-39.
118. Bonete, M.J., Manjon, A., Llorca, F. e Iborra, J.L. (1984) *Comp. Biochem. Physiol.* 78B, 207-213.
119. Doke, S.N., Ninjoor, V. y Nadkarni, G.B. (1980) *Agric. Biol. Chem.* 44, 1521-1528.
120. Makinodan, Y., Akasaka, T., Toyohara, H. e Ikeda, S. (1982) *J. Food Sci.* 47, 647-652.
121. Taneda, T., Watanabe, T. y Seki, N. (1983) *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 49, 219-228.
122. Makinodan, Y. e Ikeda, S. (1976) *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 42, 665-670.
123. Makinodan, Y., Hirotsuka, M. e Ikeda, S. (1979) *J. Food Sci.* 44, 1110-1113.
124. Iwata, K., Kobashi, K. y Hase, J. (1974) *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 40, 201-209.
125. Shimidu, W., Shimizu, Y. y Nishide, T. (1960) *Bull. Res. Inst. Food Sci., Kyoto Univ.*, N° 23, pp. 1-8.
126. Makinodan, Y., Yamamoto, M. y Shimidu, W. (1963) *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 29, 776-780.
127. Makinodan, Y. e Ikeda, S. (1969) *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 35, 672-676.
128. Makinodan, Y. e Ikeda, S. (1969) *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 35, 749-757.
129. Makinodan, Y. e Ikeda, S. (1971) *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 37, 518-523.
130. Iwata, K., Kobashi, K. y Hase, J. (1973) *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 39, 1325-1337.
131. Iwata, K., Kobashi, K. y Hase, J. (1974) *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 40, 189-200.
132. Iwata, K., Kobashi, K. y Hase, J. (1974) *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 40, 1043-1050.

133. Makinodan, Y. e Ikeda, S. (1977) *J. Food Sci.* 42, 1026-1028.
134. Hase, J., Kobashi, K., Nakai, N., Mitsui, K., Iwata, K. y Takadera, T. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 611, 205-213.
135. Neurath, H. y Walsh, K.A. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 3825-3832.
136. Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L.J. y Truscheit, E. (1974) *Proteinase Inhibitors, Proc. Int. Res. Conf., 2nd. (Bayer Symp. V)*, Springer-Verlag, Berlin y New York.
137. Zbytniewski, Z. y Kanclerz, A. (1977) *Proteinase Inhibitors in Medicine, Postepy Hig. Med. Dosw.* 31, 393-407.
138. Kakade, M.L., Hoffa, D.E. y Liener, I.E. (1973) *J. Nutr.* 103, 1772-1778.
139. Rackis, J.J. (1974) *J. Am. Oil Chemists' Soc.* 51, 161A-174A.
140. Whitaker, J.R. (1981) *En Impact of Toxicology on Food Processing (J.C. Ayres y J.C. Kirschmann, eds.)*, pp. 57-104, Avi Publishing Co., Westport, Connecticut.
141. Waxman, L. y Krebs, E.G. (1978) *J. Biol. Chem* 253, 5888-5891.
142. Otsuka, Y. y Goll, D.E. (1980) *Seikagaku* 52, 615.
143. Takahashi-Nakamura, M., Tsuji, S., Suzuki, K. e Imahori, K. (1981) *J. Biochem.* 90, 1583-1589.
144. Cottin, P., Azanza, J.L., Vidalenc, P., Ducastaing, A., Valin, C. y Ouali, A. (1981) *Reprod. Nutr. Dev.* 21, 309-317.
145. Ishiura, S., Tsuji, S., Murofushi, H. y Suzuki, K. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 701, 216-223.
146. Schwartz, W.N. y Bird, J.W.C. (1977) *Biochem. J.* 167, 811-820.
147. Lenney, J.F., Tolan, J.R., Sugai, W.J. y Lee, A.G. (1979)

- Eur. J. Biochem. 101, 153-161.
148. Matsumoto, T., Okitani, A., Kitamura, Y. y Kato, H. (1983) Agric. Biol. Chem. 47, 2365-2371.
149. Noguchi, T. y Kandatsu, M. (1969) Agric. Biol. Chem. 33, 1226-1228.
150. Carney, I.T., Curtis, C.G., Kay, J. y Birket, N. (1980) Biochem. J. 185, 423-433.
151. Stauber, W.T., Ong, S.H., Fritz, V.K., Esnard, F. y Gauthier, F. (1983) Histochem. J. 15, 1079-1086.
152. Kuehn, L., Dahlmann, B. y Reinauer, H. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 120, 96-102.
153. Toyohara, H., Makinodan, Y., Tanaka, K. e Ikeda, S. (1983) Agric. Biol. Chem. 47, 1151-1154.
154. Toyohara, H., Makinodan, Y. e Ikeda, S. (1985) Comp. Biochem. Physiol. 80B, 949-954.
155. Toyohara, H. y Makinodan, Y. (1986) Comp. Biochem. Physiol. 83B, 283-285.
156. Cheftel, J.C. y Cheftel, H. (1976) Introducción a la Bioquímica y Tecnología de los Alimentos, Vol. I, pp. 65-98, Acribia, Zaragoza.
157. Lawrie, R.A. (1974) Meat Science, pp. 125-152, Pergamon Press, Oxford.
158. Hoagland, R., McBryde, C.N. y Powick, W.C. (1917) U.S.D.A. Bull. N<sup>o</sup> 433.
159. Stromer, M.H., Goll, D.E. y Roth, L.E. (1967) J. Cell Biol. 34, 431-445.
160. Takahashi, K., Fukazawa, T. y Yasui, T. (1967) J. Food Sci. 32, 409-413.
161. Davey, C.L. y Gilbert, K.V. (1969) J. Food Sci. 34, 69-74.
162. Henderson, D.W., Goll, D.E. y Stromer, M.H. (1970) Am. J. Anat. 128, 117-136.
163. Stromer, M.H., Goll, D.E., Reville, W.J., Olson, D.G., Dayton, W.R. y Robson, R.M. (1974) Proc. IV Internatio-

- nal Congress Food Sci. Tech., Vol. I, pp.401-418, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Valencia, España.
164. Olson, D.G., Parrish, F.C. y Stromer, M.H. (1976) J. Food Sci. 41, 1036-1041.
  165. Arakawa, N., Goll, D.E. y Temple, J. (1970) J. Food Sci. 35, 703-711.
  166. Goll, D.E. y Robson, R.M. (1967) J. Food Sci. 32, 323-329.
  167. Fujimaki, M., Arakawa, N., Okitani, A. y Takagi, O. (1965) J. Food Sci. 30, 937-943.
  168. Hay, J.D., Currie, R.W. y Wolfe, F.H. (1973) J. Food Sci. 38, 987-991.
  169. Olson, D.G. y Parrish, F.C. (1977) J. Food Sci. 42, 506-509.
  170. Olson, D.G., Parrish, F.C., Dayton, W.R. y Goll, D.E. (1977) J. Food Sci. 42, 117-124.
  171. Wang, K., McClure, J. y Tu, A. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3698-3702.
  172. Wang, K., Ramírez-Mitchell, R. y Palter, D. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3685-3689.
  173. Wang, K. y Ramírez-Mitchell, R. (1983) J. Cell Biol. 96, 562-570.
  174. Robson, R.M., O'Shea, J.M., Hartzler, M.K., Rathbun, W.E., Lasalle, F., Schreiner, P.J., Kasang, L.E., Stromer, M.H., Lusby, M.L., Ridpath, J.F., Pang, Y.Y., Evans, R.R., Zeece, M.G., Parrish, F.C. y Huiatt, T.W. (1984) J. Food Biochem. 8, 1-24.
  175. Wang, K. y Williamson, C.L. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3254-3258.
  176. Lazarides, E. y Hubbard, B.D. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 4344-4348.
  177. Granger, B.L. y Lazarides, E. (1978) Cell 15, 1253-1268.
  178. Lusby, M.L., Ridpath, J.F., Parrish, F.C. y Robson, R.M. (1983) J. Food Sci. 48, 1787-1790, 1795.

179. Young, O.A., Grafhuis, A.E. y Davey, C.L. (1980) *Meat Sci.* 5, 41-55.
180. Mac Bride, M.A. y Parrish, F.C. (1977) *J. Food Sci.* 42, 1627-1629.
181. Yin, H.L., Albrecht, J.H. y Fattoum, A. (1981) *J. Cell Biol.* 91, 901-906.
182. Zeece, M.G., Robson, R.M., Lusby, M.L. y Parrish, F. C. (1983) *Inst. Food Technol. Annual Meeting Program Abstract*, p. 153.
183. Maruyama, K., Kimura, M., Kimura, S., Ohashi, K., Suzuki, K. y Katunuma, N. (1981) *J. Biochem.* 89, 711-715.
184. O'Shea, J.M., Robson, R.M., Huiatt, T.W., Hartzler, M. K. y Stromer, M.H. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89, 972-980.
185. Okitani, A., Matsumoto, T., Kitamura, Y. y Kato, H. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 662, 202-209.
186. Robbins, F.M., Walker, J.E., Cohen, S.H. y Chatterjee, S. (1979) *J. Food Sci.* 44, 1672-1677, 1680.
187. Buttkus, H. y Tomlinson, N. (1966) *En The Physiology and Biochemistry of Muscle as a Food* (Briskey, E.J., Cassens, R.G. y Trautman, J.C., eds), pp. 197-204, The University of Wisconsin Press, Madison, Milwaukee and London.
188. Bramstedt, E.A. (1961) *En Fish in Nutrition* (Heen, E. y Kreuzer, R., eds.), FAO, Fishing News (Books) Ltd., London.
189. Shaw, D.H., Gare, R.L. y Kennedy, M.A. (1977) *J. Food Sci.* 42, 159-162.
190. Lupín, H.M., Giannini, D.H., Soulé, C.L., Davidovich, L.A. y Boeri, R.L. (1980) *J. Food Technol.* 15, 285-300.
191. Kremsdorf, D.L., Josephson, R.V., Spindler, A.A., y Phleger, C.F. (1979) *J. Food Sci.* 44, 1044-1048.
192. Seki, N., Oogane, Y. y Watanabe, T. (1980) *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 46, 607-615.



193. Seki, N. y Watanabe, T. (1984) *J. Biochem.* 95, 1161-1167.
194. Kimura, S., Miyaki, T., Takema, Y. y Kubota, M. (1981) *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 47, 787-792.
195. Haimovici, M. (1974) Sexta Reunión de la Comisión Asesora Regional de Pesca para el Atlántico Sudoccidental, Montevideo, Uruguay.
196. Ehrhardt, N.M. y Arena, G.J. (1977) Informe Técnico N° 8. Instituto Nacional de Pesca, Montevideo, Uruguay.
197. Arena, G.J. y Hertl, E. (1983) Informe Técnico N° 36. Instituto Nacional de Pesca, Montevideo, Uruguay.
198. Polakoski, K.L. y Zaneveld, L.J.D. (1976) En *Methods in Enzymology*, Vol. 45, p. 326, Academic Press, New York.
199. Walsh, K.A. (1970) En *Methods in Enzymology*, Vol. 19, p. 43, Academic Press, New York.
200. Martone, C., Busconi, L., Folco, E.J., Trucco, R.E. y Sánchez, J.J. (1986) *J. Food Sci.* 51, 1554-1555.
201. Tsuchiya, Y., Tsuchiya, T., Nomomura, Y. y Matsumoto, J.J. (1975) *J. Biochem.* 77, 853-862.
202. Gill, T.A., Keith, R.A. y Smith Lall, B. (1979) *J. Food Sci.* 44, 661-667.
203. Portzio, M. y Pearson, A. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 490, 27-34.
204. Reynolds, E.S. (1963) *J. Cell Biol.* 17, 208-212.
205. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 266-275.
206. Laskowski, M., Jr. y Sealock, R.W. (1971) En *The Enzymes*, Vol. 3, 3a. Edición (P.D. Boyer, ed.), pp. 375-473, Academic Press, New York.
207. Lin, T. y Lanier, T.C. (1980) *J. Food Biochem.* 4, 17-28.
208. Christiansen, H. Comunicación personal.

209. Kido, H., Fukusen, N. y Katunuma, N. (1984) Anal. Biochem. 137, 449-453.
210. Petruzzello, M.C. (1986) Seminario para optar al título de Lic. en Biología, Fac. C. Exactas, Naturales y Biológicas, Universidad Nacional de Mar del Plata.
211. Dayton, W.R., Schollmeyer, J.V., Lepley, R.A. y Cortés, L.R. (1981) Biochim. Biophys. Acta 659, 48-61.