

Tesis de Posgrado

Purificación y propiedades de proteasas alcalinas de músculo de pescado

Busconi, Liliana

1988

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Busconi, Liliana. (1988). Purificación y propiedades de proteasas alcalinas de músculo de pescado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2167_Busconi.pdf

Cita tipo Chicago:

Busconi, Liliana. "Purificación y propiedades de proteasas alcalinas de músculo de pescado". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1988.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2167_Busconi.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**PURIFICACION Y PROPIEDADES DE PROTEASAS ALCALINAS DE
MUSCULO DE PESCADO**

Autor: Liliana BUSCONI

Director de tesis: Dr. Jorge J. SANCHEZ

Lugar de trabajo: Centro de Investigaciones de Tecnología Pesquera
Instituto Nacional de Tecnología Industrial

Tesis para optar al Título de Doctor en Ciencias Químicas

1988

- 2167 -
ef. 2

a mis padres
a mi abuela

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge J. Sánchez porque a través de sus actitudes dentro y fuera del laboratorio me brindó el estímulo para continuar en esta actividad, por lo que contribuyó a mi formación y especialmente por compartir su amistad a lo largo de estos años.

A la Dra. Celina B. Martone por haber contribuido a mi formación y por su amistad y apoyo siempre presentes.

Al Dr. Ricardo A. Wolosiuk quien permitió que me integrara temporariamente a su grupo de trabajo y que manifestó a través de los años una actitud de respeto hacia quienes compartimos el trabajo con él.

Al Dr. Pedro Cattáneo por haberme orientado hacia el trabajo científico y por su constante apoyo como Consejero de Estudios.

Al Dr. Raúl E. Trucco por haberme dado la posibilidad de trabajar en investigación.

A los compañeros del CITEP: a Tatiana Zirulnikow por su permanente colaboración, a Olga Vergara y José Porretto que desde sus tareas de apoyo colaboraron en la realización de este trabajo y a Viviana Beas por haber ayudado en la impresión de esta tesis.

A Dante Giménez, Natalio de Vicenzo y Necker Vegliante por su excelente asistencia técnica en la preparación de las muestras de microscopía electrónica y al Centro de Virología Animal y a la Facultad de Odontología de la UBA por haber

permitido el uso de los microscopios de transmisión y barrido respectivamente.

A los Drs. Rubén Conde y Gustavo Daleo y a quienes colaboran con ellos por haberme permitido trabajar en sus laboratorios y por el uso del espectrofluorómetro.

A la Dra. Claudia Casalongué por su excelente predisposición y asistencia técnica en la preparación de los anticuerpos contra la proteasa II.

Al INTI, CONICET, SECYT y CIC por haber otorgado los medios necesarios para llevar a cabo esta investigación.

ABREVIATURAS

A₂₈₀: absorbancia a 280 nm

Act: actividad

Act.Esp: actividad específica

ATP: adenosín 5'-fosfato

Boc: N-ter-butoxicarbonil

Bz: benzoil

CBz: carbobenzoxi

CTAB: bromuro de cetiltrimetilamonio

DEAE: dietilaminoetil

DTT: ditiotreitól

EDTA: etilendiaminotetraacetato sódico

LBTI: inhibidor de tripsina de semilla de lima

LC: cadena liviana

2-MCE: 2-mercaptoetanol

N.D: no determinado

NEM: N-etilmaleimida

NMec: 4-metil-7-cumarilamida

Prot: proteínas

Furif: purificación

Rend: rendimiento

SBTI: inhibidor de tripsina de semilla de soja

SDS: dodecil sulfato de sodio

Suc: succinil

TCA: ácido tricloroacético

TLCK: N- α -p-tosil-L-lisina clorometil cetona

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

Tris: tris(hidroximetil)amino metano

INDICE

INTRODUCCION

I.1	Consideraciones generales.....	1
I.2	Mecanismos degradativos.....	2
I.3	Factores que regulan la degradación.....	6
I.3.1	Compartimentalización.....	6
I.3.2	Susceptibilidad del sustrato.....	7
I.3.3	Inhibidores y activadores.....	9
I.3.4	Síntesis y degradación de proteasas.....	11
I.3.5	Especificidad.....	11
I.4	Proteasas.....	11
I.4.1	Serín proteasas.....	13
I.4.2	Cisteín proteasas.....	16
I.4.3	Metaloproteasas.....	19
I.4.4	Aspartil proteasas.....	20
I.5	Funciones de las proteasas.....	21
I.6	Proteínas musculares.....	23
I.7	Proteasas musculares.....	30
I.7.1	Proteasas de músculo de pescado.....	33
I.8	Cambios en el músculo post-mortem.....	35
I.9	Objetivos del trabajo.....	43

MATERIALES Y METODOS

M.1	Pescado.....	45
M.2	Reactivos.....	45
M.3	Purificación de la proteasa I.....	45
M.4	Purificación de la proteasa II.....	47
M.5	Mediciones de actividad.....	49
M.5.1	Actividad azocaseinolítica.....	49
M.5.2	Actividad hidrolizante de los derivados 4-metil-7-cumarilamida de péptidos con el amino terminal bloqueado.....	50
M.6	Electroforésis en geles de poliacrilamida.....	50
M.6.1	Geles en condiciones desnaturalizantes.....	50
M.6.2	Geles en condiciones no desnaturalizantes.....	51
M.6.2.1	Determinación de la actividad proteolítica en geles.....	51
M.6.3	Densitometría.....	51
M.7	Incubación de miofibrillas con la proteasa I..	51
M.8	Determinación de proteínas.....	52

RESULTADOS

R.I	Proteasa I.....	54
R.I.1	Purificación de la proteasa I.....	54
R.I.2	Dependencia de la actividad hidrolizante de Boc-Val-Pro-Arg-NMec de la proteasa I con el pH.....	58
R.I.3	Dependencia de la actividad hidrolizante de Boc-Val-Pro-Arg-NMec de la proteasa I con la temperatura.....	58

R.I.4	Separación del inhibidor endógeno de la proteasa I.....	58
R.I.5	Especificidad de sustrato.....	62
R.I.6	Efecto de varios compuestos químicos sobre la actividad de la proteasa I.....	65
R.I.7	Degradación de la red exosarcómerica del citoesqueleto por la proteasa I.....	65
R.II	Proteasa II.....	78
R.II.1	Efecto del SDS y ácidos grasos sobre la curva de temperatura de la proteasa II.....	78
R.II.2	Activación de la proteasa II por SDS.....	78
R.II.3	Activación de la proteasa II por ácidos grasos	81
R.II.4	Efecto comparativo de distintos ácidos grasos y SDS sobre la actividad de la proteasa II	85
R.II.5	Purificación de la proteasa II.....	85
R.II.6	Especificidad de sustrato.....	92
R.II.7	Efecto de los ácidos grasos y detergentes sobre la proteasa II purificada.....	92
R.II.8	Curva de pH.....	99
R.II.9	Curva de temperatura.....	99
R.II.10	Estabilidad térmica.....	103
R.II.11	Efecto de reactivos tiólicos.....	105
R.III	Cambios post-mortem.....	109
	<u>DISCUSION</u>	115
	<u>CONCLUSIONES</u>	130
	<u>REFERENCIAS</u>	132

INTRODUCCION

I.1 CONSIDERACIONES GENERALES

La síntesis y degradación proteica son funciones comunes a todas las células. Cada una juega un papel indispensable en el recambio proteico, determinando los niveles intracelulares de proteínas (1-3).

Frente a un conocimiento profundo de los mecanismos de síntesis proteica, los estudios de degradación de proteínas solubles intracelulares hasta hace pocos años han estado relacionados principalmente con la descripción de varios aspectos a nivel fenomenológico (4), mientras que los mecanismos no eran demasiado conocidos.

En la última década, en cambio, ha habido progresos sustanciales en el conocimiento de los procesos celulares que involucran proteólisis, desde los que comprenden una degradación controlada llevada a cabo por proteasas específicas hasta aquellos en los cuales ocurre una proteólisis extensiva que conduce a la degradación de proteínas a aminoácidos y que involucra la participación de distintas proteasas.

Las proteínas dentro de la célula difieren notoriamente en sus velocidades de degradación. Por ejemplo en hígado de rata hay gran heterogeneidad en la vida media de las proteínas la cual varía desde 12 minutos (5) hasta 15-25 días (6). Esta diversidad en la vida media debe otorgar al organismo algún tipo de ventaja adaptativa, así como también indica la especificidad de la degradación.

Se pueden definir distintas clases de proteínas celulares según su vida media. Si bien esta clasificación es bastante arbitraria, resultará útil para discutir más adelante la evidencia sobre la existencia de distintos caminos proteolíticos.

1- Proteínas de vida media larga: constituyen la mayor parte de las proteínas celulares, tienen una velocidad de recambio baja (7-10), y son relativamente poco importantes para el control metabólico.

2- Proteínas de vida media corta: son proteínas normales de la célula con alta velocidad de recambio. Dentro de este grupo se encuentran enzimas que participan en puntos de control metabólico (11).

3- Proteínas anormales: son degradadas aún a mayor velocidad que las proteínas de vida media corta. En este grupo se ubican las proteínas que resultan de errores en la síntesis, de una mutación sin sentido o que son incompletas.

I.2 MECANISMOS DEGRADATIVOS

Si bien existe abundante información sobre los efectos de la nutrición (12-13), la estimulación hormonal (14), el crecimiento (15-16) y el envejecimiento (17) sobre las velocidades totales de degradación proteica, aún permanece poco claro el o los mecanismos involucrados en la degradación selectiva de las proteínas intracelulares.

Desde muchos años atrás se pensó que los lisosomas podrían participar en la degradación de proteínas intracelulares, ya que contienen un conjunto de proteasas ácidas; además había fuerte evidencia que las proteínas extracelulares que entran por vía endocítica a la célula son degradadas en esas organelas (18-21). Si bien se sabía que la autofagia lisosomal ocurre bajo una gran variedad de condiciones fisiológicas y patológicas (22), fueron los trabajos de Mortimore los primeros en aportar evidencias a que la autofagia lisosomal es importante en la degradación exaltada por el ayuno. Este grupo realizó sus estudios con hígado de rata perfundido con un medio no suplementado (23) y halló correlaciones entre la velocidad de degradación y alteraciones físicas y morfológicas de los lisosomas (24-27).

Trabajos posteriores también efectuados en hígado perfundido, en los cuales se cuantificó la proteólisis lisosomal y se comparó con las velocidades absolutas de degradación pusieron en evidencia que prácticamente toda la degradación de proteínas intracelulares incrementada por el ayuno es llevada a cabo por los lisosomas, pero que aún en condiciones basales el sistema lisosomal está involucrado en el catabolismo proteico (28-30).

Estos resultados sobre degradación exaltada fueron confirmados en trabajos más recientes efectuados en células animales usando compuestos que inhiben la proteólisis lisosomal. Se usaron la cloroquina (31), un agente lisoso-

motrópico que aumenta el pH intralisosomal y una variedad de péptidos inhibidores (32) tales como pepstatin (33), leupeptin, antipain, etc.

En los últimos años varios investigadores (11,34-35) recopilaron información que avala la presencia de un mecanismo lisosomal y otro extralisosomal. Cada uno de ellos participaría en distintos aspectos del catabolismo. Apoyando la existencia de la vía extralisosomal, los trabajos de Bigelow muestran que las proteínas microinyectadas en células en cultivo son degradadas principalmente en el citosol (36).

También se ha comprobado que la mayoría de la degradación de las proteínas de vida media corta o anormales es extralisosomal. Esa degradación no es influenciada por el ayuno, las hormonas o inhibidores de la síntesis proteica (37-39), contrariamente a lo que ocurre con las proteínas de vida media larga. Trabajos más recientes sostienen que los inhibidores lisosomales tampoco la afectan (38, 40).

Con respecto al catabolismo de las proteínas de vida media larga habría que hacer una distinción entre degradación exaltada (bajo condiciones de ayuno) o basal (suplementada con nutrientes, insulina o factores de crecimiento). Como se ha mencionado anteriormente no hay dudas que la mayoría o toda la degradación exaltada ocurre dentro de los lisosomas pero aún queda sin aclarar el grado de participación de los mismos en condiciones basales.

Es difícil suponer que toda la degradación basal ocurre dentro de los lisosomas porque resultaría complejo justificar la heterogeneidad de la vida media de las proteínas.

Se han propuesto varios modelos para justificar la especificidad de la degradación si ésta ocurriera totalmente dentro de los lisosomas. Uno de ellos postula que, de modo análogo a la endocitosis mediada por receptor, las proteínas solubles pueden adsorberse selectivamente a la superficie de membranas, formar vacuolas autofágicas y fusionarse con los lisosomas (41). Otros modelos sostienen que ocurre una internalización selectiva de las proteínas directamente por los lisosomas (42) o bien que ocurre una ingesta masiva de proteínas acompañada por la liberación selectiva de las proteínas resistentes a la proteólisis (43). Sin embargo no existen pruebas rigurosas que apoyen un modelo u otro.

Los estudios mencionados anteriormente, así como la descripción de proteasas citosólicas indicarían que existen diferentes vías de degradación y que el proceso degradativo es mucho más complejo de lo que inicialmente se pensó.

Con respecto al requerimiento de energía para la degradación, en 1953 Simpson (44) descubrió que el ATP es necesario, a pesar que la degradación de proteínas es un proceso exergónico.

La dependencia de la degradación con el ATP es un fenómeno que ocurre en una gran variedad de sistemas, desde

bacterias (45-46) y levaduras (47-48) hasta células de mamífero (36,38,49).

El requerimiento de energía puede parecer razonable en la vía lisosomal, que podría necesitarla directa o indirectamente, por ejemplo en los eventos iniciales de la autofagia o en el mantenimiento del pH intralisosomal (50-52). Sin embargo, en la vía extralisosomal resulta sorprendente la necesidad de energía. Se ha postulado que en este caso podría servir para determinar el alto grado de selectividad de la degradación. Se han descrito varios sistemas extralisosomales dependientes de ATP, entre ellos el de inactivación del represor del bacteriófago lambda en *E. coli* (53-54), pero el que más exhaustivamente se ha estudiado es el del sistema ATP/Ubiquitina de reticulocito (55-61).

I.3 FACTORES QUE REGULAN LA DEGRADACION

I.3.1 Compartimentalización

La acción de una proteasa puede estar limitada por su ubicación subcelular. Las catepsinas, proteasas ácidas que se encuentran dentro del lisosoma limitan su acción a aquellas proteínas que entran a la organela. De manera similar, las proteasas unidas a membranas restringen su acción a los sustratos que pueden interactuar con los componentes de la membrana.

1.3.2 Susceptibilidad del sustrato

Los tiempos de vida media de las proteínas pueden diferir entre sí tanto como mil veces. Esa observación ha provocado muchos interrogantes sobre qué hecho estructural de la proteína determina que sea más o menos susceptible al ataque por proteasas. Durante muchos años se han buscado correlaciones entre la velocidad de degradación y propiedades físicas y químicas de las proteínas. Entre las propiedades estudiadas se hallaban el tamaño, la carga, la hidrofobicidad de los aminoácidos, la susceptibilidad a la desnaturalización por temperatura y pH. Hay trabajos según los cuales en diversos tejidos de mamíferos los péptidos de mayor peso molecular (62-64) y las proteínas con menor pH isoeléctrico se degradan más rápido (10).

Concordando con los resultados precedentemente expuestos, las histonas, péptidos pequeños y de naturaleza básica son los más estables que se conocen en la célula (65-66). Sin embargo el hecho de que existan excepciones así como también trabajos más recientes realizados microinyectando en células HeLa proteínas de secuencia y estructura conocida y con tiempos de vida media muy distintos y en los cuales no se halló ninguna correlación entre velocidad de degradación y tamaño, carga neta, contenido de aminoácidos hidrofóbicos, acilación del amino terminal y estabilidad térmica (67), ponen en duda que se pueda establecer una correlación simple

entre propiedades estructurales y degradación e indican la necesidad de continuar los estudios para determinar qué propiedades de las proteínas condicionan su estabilidad intracelular.

En los últimos años se han descrito dos sistemas distintos que producen modificaciones en las proteínas; esas modificaciones implicarían un aumento en la susceptibilidad a la degradación. Uno de los sistemas fue descrito por Hershko y colaboradores (68-69) quienes demostraron la importancia del extremo amino terminal libre para la conjugación de las proteínas con un péptido llamado ubiquitina, esta modificación sería la señal para el inicio de la degradación. El otro sistema, propuesto por Stadtman, consistiría en la inactivación de ciertas enzimas por oxidación del aminoácido histidina o lisina y su posterior degradación por proteasas específicas (70-72), esta hipótesis ha sido avalada por trabajos realizados en *E. coli* (73) e hígado de rata (74).

Actualmente se sabe que las proteínas tienen no sólo secuencias que determinan su destino final en la célula sino también secuencias que las marcan para su destrucción. Se encontró que proteínas con una vida media intracelular menor de dos horas tienen una o más regiones ricas en prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T) (75). Esas regiones, llamadas PEST tienen entre 12 y 60 residuos de longitud y están generalmente flanqueadas por grupos de aminoácidos cargados positivamente. Cuando se analizaron

proteínas cuya vida media varía entre 20 y 220 horas, menos del 10% tenían la secuencia PEST, mientras que todas las proteínas que se conocen con esta secuencia son importantes moléculas regulatorias.

Finalmente, habría que mencionar que los sustratos y activadores pueden proteger a las proteínas de la degradación (76) mientras que los inhibidores y productos pueden hacerlas más susceptibles (77).

I.3.3 Inhibidores y activadores

La actividad proteolítica debe estar rigurosamente controlada en las células para prevenir una degradación inapropiada o descontrolada. La presencia de inhibidores endógenos, que se han descrito en animales, plantas y microorganismos, puede ser un factor importante de regulación. Los inhibidores de tripsina están distribuidos en una variedad de tejidos y se encuentran entre los que han sido estudiados con más detalle. En tejido muscular, la descripción de un inhibidor de esta naturaleza data de 1969 (78) cuando se encontró en músculo esquelético de rata. También se demostró la presencia de inhibidores similares en músculo cardíaco bovino (79). En pescados, fueron hallados en músculo esquelético de carpa (80) y bacalao (81). A pesar de los numerosos intentos de hallar una enzima sobre la cual estos inhibidores pudieran actuar, los mismos fueron infructuosos. En nuestro laboratorio habíamos demostrado la exis-

tencia de un inhibidor de tripsina de 70 kDa (82) capaz de inhibir a una serín proteasa endógena (83-84) llamada I (82).

También se han descrito y caracterizado inhibidores proteicos de otras proteasas intracelulares. El calpastatin es un inhibidor específico de las calpainas y tiene un peso molecular que oscila entre 24 y 400 kDa, según la fuente y el método de extracción (85-87).

Más recientemente, se encontraron dos tipos de inhibidores polipeptídicos de bajo peso molecular (11-13 kDa) con capacidad para inhibir a las catepsinas y a los cuales se ha llamado cistatines y estefines (88).

Con respecto a los activadores proteicos, de cerebro de rata se aisló un polipéptido de 17-20 kDa que estimula la actividad de la calpaína pero no modifica su sensibilidad al calcio (89).

En esta sección también habría que mencionar a activadores no proteicos, entre los cuales se encuentra el Ca^{2+} que estimula la actividad de las calpainas. En la sección correspondiente a las cisteín proteasas se desarrollará más extensamente este tema.

Además existen proteasas de alto peso molecular que son activadas por ácidos grasos, pero la concentración a la cual producen activación es variable: la proteasa multicatalítica de músculo esquelético de rata requiere concentraciones micromolares (90) mientras que la ingensina necesita concentraciones en el rango milimolar (91-92).

I.3.4 Síntesis y degradación de proteasas

El hecho de que existan proteasas específicas de ciertos tejidos, constituye de por sí un factor de regulación. Para aquellas proteasas que en cambio están presentes en la mayoría de las células de mamíferos se encontraron distintas concentraciones según el tejido estudiado.

Hasta el presente se conoce poco sobre la velocidad de síntesis y degradación de proteasas de mamíferos bajo distintas condiciones metabólicas.

I.3.5 Especificidad

Existen proteasas que son tan específicas para un determinado sustrato que pueden seleccionarlo entre distintas proteínas sin requerir mecanismos de control adicionales (93).

I.4 PROTEASAS

En los últimos años ha habido avances notables en la caracterización bioquímica de numerosas proteasas pero aún se sabe muy poco sobre cuáles son sus sustratos biológicos.

Con respecto al tamaño, las proteasas tienen pesos moleculares que oscilan entre 20 y 800 kDa. Las catepsinas están en la categoría de proteasas pequeñas y monoméricas

pero un gran número de enzimas proteolíticas son de mayor tamaño que otros tipos de enzimas. Se han descrito proteasas oligoméricas con subunidades de peso molecular entre 50-100 kDa.

Tal vez el hecho de que las proteasas sean de gran tamaño y con varias subunidades resulte importante para la selectividad y la regulación de la actividad proteolítica.

Todas las proteasas en algún momento de su vida son intracelulares, pero luego algunas son secretadas al medio extracelular donde ejercen su acción. El conocimiento de estas proteasas extracelulares está muy desarrollado en comparación con el de las proteasas celulares.

Entre las proteasas extracelulares se encuentran la tripsina y quimotripsina, tal vez las proteasas más estudiadas hasta el momento, las proteasas que participan en la coagulación de la sangre y en el sistema de complemento y las proteasas de los mastocitos (triptasa y quimasa) que intervienen en los procesos inflamatorios.

Las proteasas llamadas intracelulares actúan sobre proteínas o péptidos intracelulares o extracelulares que penetran a la célula por fenómenos endocíticos.

Las proteasas pueden clasificarse usando diferentes criterios:

a) Según la ubicación de los enlaces peptídicos hidrolizados

Se dividen en dos grupos: exoproteasas, que solo pueden escindir enlaces peptídicos terminales y endoproteasas o

proteinasas, que rompen uniones peptídicas internas de la molécula de proteína.

b) Según el aminoácido del sitio activo esencial para la catálisis

Existen cuatro clases distintas: serín, cisteín, metalo y aspartil proteasas. Las enzimas se clasifican dentro de estos grupos según su comportamiento frente a ciertos inhibidores específicos (94).

I.4.1 Serín proteasas

Este grupo comprende a aquellas enzimas que tienen un residuo serina en el sitio activo (95) y un mecanismo catalítico que involucra la pegada covalente del sustrato a ese residuo serina.

Las serín proteasas pueden ser inhibidas con diisopropil fluorofosfato (DFP) o diisopropil fosfofluoridato (DipF). La mayoría de estas proteasas también se inhiben por clorometil cetonas (TLCK o TPCK) o por fenilmetano-sulfonil fluoruro (PMSF), pero estos reactivos no son tan específicos, ya que también inhiben a algunas cisteín proteasas.

Aunque los sustratos naturales son proteínas y péptidos, la mayoría de los estudios se han realizado usando amidas y ésteres, ya que las serín proteasas además de su

actividad proteolítica muestran una fuerte actividad amidásica y esterásica sobre determinados compuestos.

Todos los miembros del grupo son endoproteasas pues se observó que la hidrólisis de la unión peptídica terminal es inhibida por la carga de los grupos amino o carboxilo terminales.

Usando sustratos con una secuencia de aminoácidos conocidos se puede clasificar a las serín proteasas en grupos con especificidades bien definidas. Por ejemplo, las enzimas "tipo tripsina" son aquellas que rompen la unión peptídica en la cual el grupo carboxilo es aportado por lisina o arginina, mientras que las enzimas "tipo quimo-tripsina" requieren que el aminoácido sea aromático. Esta clasificación también puede aplicarse a proteasas que no sean serínicas. Sin embargo hay que considerar que la especificidad hacia sustratos proteicos puede estar influenciada no sólo por el aminoácido de la unión peptídica que va a ser hidrolizada sino también por la estructura de la molécula.

Las serín proteasas están ampliamente distribuidas en la naturaleza, habiendo sido encontradas tanto en procaríotes como en eucariotes. Se ubican desde un punto de vista de la evolución en dos superfamilias no homólogas: la familia subtilisina y la familia quimotripsina (96), las cuales no tienen una estructura tridimensional común pero hidrolizan a sus sustratos y son inhibidas de acuerdo a un mismo mecanismo.

La familia quimotripsina, que solo ha sido encontrada en eucariotes, incluye proteasas intracelulares y extracelulares.

Se ha visto que a lo largo de la evolución se preservaron aminoácidos distantes en la secuencia primaria de la molécula pero que son esenciales para la configuración y la actividad catalítica (97).

Los estudios más importantes sobre evolución fueron realizados con proteasas del sistema fibrinolítico y de la coagulación de la sangre (98-100). Se trata de proteasas de gran tamaño probablemente debido a un proceso de fusión de genes. Los sitios catalíticos son ampliamente homólogos entre si y con otras proteasas tipo quimotripsina, pero la especificidad de sustrato es muy distinta y podría deberse a la presencia de regiones no catalíticas que le confieren diferentes propiedades regulatorias.

Cuando en cambio se comparan los zimógenos de las proteasas de plasma con serín proteasas pancreáticas ellos son muy diferentes en tamaño y composición de aminoácidos para predecir una relación ancestral común (101), por lo cual se puede concluir que primero existieron las enzimas homólogas y que las secuencias pro fueron agregadas posteriormente.

Sólo se ha descrito una serín proteasa citosólica: la prolil-endopeptidasa que degrada péptidos pequeños pero no grandes proteínas (92).

Hay otras serín proteasas intracelulares pero están ubicadas en mitocondria, retículo endoplásmico o membrana plasmática.

Además se encontraron proteasas serínicas en gránulos secretorios o especiales que ejecen su acción al ser secretadas. Entre las que se hallan en gránulos secretorios se incluyen las proteasas de mastocitos (quimasa y triptasa), la proteasa quimiotáctica de piel y el activador de plasminógeno. En gránulos especiales se pueden mencionar a la catepsina G y a la elastasa (103) presentes en los gránulos azurófilos de neutrófilos y que participan en los procesos inflamatorios, y a la acrosina, que se halla en el acrosoma de los espermatozoides e interviene en las primeras etapas de la fertilización (104).

I.4.2 Cisteín proteasas

Las cisteín proteasas o tiol proteasas contienen un aminoácido cisteína en el sitio activo que participa en la formación de un complejo covalente con el sustrato (105). Estas proteasas son inhibidas por bajas concentraciones de p-hidroximercuribenzoato (p-OHMB), p-cloromercuribenzoato (pCMB) y agentes alquilantes (iodoacetato, iodoacetamida y N-etil-maleimida).

Los reactivos de grupo tiol no son específicos para cisteína en el sitio activo, por lo cual pueden reaccionar con otros grupos sulfidrilos presentes en la estructura

proteica. Actualmente se considera al L-trans-epoxisuccinil-leucilamido (4-guanidino) butano más conocido como E-64 como a uno de los inhibidores más específico de sulfidriilo de sitio activo, con el cual reacciona formando un tioéster (106). Las cisteín proteasas también se pueden inhibir por algunos péptidos aldehidos de origen microbiano (leupeptín, antipain, quimostatín, elastinal), pero estos compuestos, si bien son específicos de grupo tiol de sitio activo, además reaccionan con serín proteasas (107).

La mayoría de estas proteasas, que participan en los estadios iniciales y finales de la degradación exhaustiva de proteínas se encuentran en el citosol y los lisosomas.

Dentro de este grupo se incluyen varias catepsinas, la calpaina, algunas proteasas dependientes de ATP y las enzimas multicatalíticas.

Las catepsinas son proteasas de bajo peso molecular (25-40 kDa), con pH óptimo ácido (3.5-5.0). La mayoría son glicoproteínas.

La catepsina B es probablemente la tiol proteasa de mamífero más estudiada. Tiene características similares a la papaína (108). Además se comporta dependiendo del sustrato como endoproteasa o exoproteasa, liberando dipéptidos a partir del extremo carboxilo terminal.

La catepsina L es una endoproteasa; tiene mucho mayor actividad específica que las catepsinas B y H cuando se ensaya con sustratos proteicos, pero su actividad es muy baja sobre péptidos pequeños.

Otra tiol proteasa pero con propiedades muy distintas a las catepsinas es la calpaina. Con este nombre (109) se designa a una familia de cistein proteasas dependientes de calcio, encontrada en casi todas las células de mamíferos y aves.

Todos las calpainas descritas (110) tienen varias propiedades comunes: 1) actividad de endoproteasa que cataliza una proteólisis limitada, 2) ubicación principalmente en el citosol, 3) pH óptimo 7.0-8.5, 4) peso molecular de aproximadamente 100 kDa, compuestas por dos subunidades: una de 72-82 kDa y otra de 25-30 kDa, 5) inhibición específica por calpastatín, un inhibidor proteico endógeno.

Se han descrito dos tipos de calpainas según sus requerimientos de calcio: el I y el II, que necesitan concentraciones de calcio del orden micro y milimolar respectivamente para su activación, la cual se caracteriza por un cambio conformacional en la molécula. Hasta el presente se desconoce el significado fisiológico de la coexistencia de ambas proteasas en una misma célula.

En este grupo también se incluyen las proteasas dependientes de ATP que se ubican en el citosol. Son proteínas oligoméricas de alto peso molecular y pH óptimo alcalino. Estas enzimas requieren ATP o análogos no metabolizables, los cuales actúan como efectores alostéricos que estimulan su actividad (111-112) o estabilizan a la enzima contra la desnaturalización térmica (113).

Tentativamente se han clasificado dentro de este grupo a las enzimas multicatalíticas. Estas proteasas se han encontrado en varios tejidos de mamíferos (91,114-117), son de alto peso molecular (600-700 kDa) y están compuestas por varias subunidades cuyo tamaño oscila entre 20-35 kDa. Son enzimas citosólicas con pH óptimo alcalino.

Estas enzimas poseen dos características especiales:

1-Tienen especificidad por más de un tipo de unión peptídica. Pueden expresar actividad tipo tripsina, tipo quimotripsina o actividad hidrolizante de una unión peptídica en la cual el grupo carboxilo es aportado por el ácido glutámico.

2-Ciertos compuestos tienen efectos diferentes sobre cada una de esas actividades.

Este comportamiento indica que las enzimas tienen más de un sitio activo, con diferente especificidad de sustrato y sensibilidad a los inhibidores, por lo cual se les ha dado el nombre de "proteasas multicatalíticas" (118). Hasta el momento no se ha podido asignar cada actividad a una determinada parte de esa compleja estructura.

Se han propuesto algunas funciones para estas proteasas (114-119) pero aún se desconoce cual es el rol que tienen en la vía de degradación extralisosomal, aunque sus propiedades sugieren que podrían estar sujetas a mecanismos de control in vivo muy complejos.

1.4.3 Metaloproteasas

Las metaloproteasas se encuentran en procariotes y eucariotes pero muy poco se conoce de la evolución que han sufrido, porque solo la secuencia de aminoácidos de un número muy limitado de estas enzimas ha sido determinada.

Las metaloproteasas tienen un metal en el sitio activo como parte integral de su estructura. La mayoría posee zinc, como catión esencial. No se conoce muy bien la función de los iones, pero se ha propuesto que exaltan la nucleofilidad del agua y polarizan la unión peptídica que se va a hidrolizar, previo al ataque nucleofílico (120-121).

Las metaloproteasas se pueden distinguir de las proteasas activadas por metales por el valor de la constante de asociación para el complejo metal-enzima y por su respuesta a una serie de inhibidores (121).

Las metaloproteasas de mamíferos tienen un peso molecular que varía entre 17 y 800 kDa, están asociadas a membrana plasmática (endopeptidasa, meprina, peptidasa procolágeno C), retículo endoplásmico y mitocondria (peptidasas señal) y citosol. Se sugirió que debido a su ubicación subcelular podrían participar en el procesamiento de péptidos, remoción del péptido señal e hidrólisis de proteínas asociadas a membranas.

1.4.4 Aspartil proteasas

También han sido llamadas proteasas ácidas. Tienen dos residuos aspártico en el sitio activo y se cree que el mecanismo de catálisis es de tipo ácido-base (122). El pepstatín es el inhibidor específico de sitio activo.

Las aspartil proteasas pertenecen a una única familia. Son de bajo peso molecular (30-40 kDa) y tienen preferencia por las uniones peptídicas en las que participan aminoácidos hidrofóbicos.

Dentro de este grupo se ubican varias proteasas extracelulares: la pepsina de jugo gástrico, la quimosina de estómago y la renina de plasma y riñón.

También se encuentra en esta clasificación la catepsina D, una endoproteasa que tiene actividad limitada contra proteínas nativas pero resulta muy activa cuando los sustratos están desnaturalizados. Esta enzima ha sido usada como modelo para estudiar la función de los residuos manosa fosfato en el transporte de la enzima desde su lugar de síntesis a los lisosomas (123-126).

I.5 FUNCIONES DE LAS PROTEASAS

Las proteasas participan en una gran variedad de procesos. Esencialmente se pueden considerar dos grandes funciones: 1) crear moléculas biológicamente activas y 2) destruir moléculas y péptidos biológicamente activos.

En el primer grupo se encuentran las proteasas que producen una ruptura proteolítica selectiva (proteólisis

limitada). A continuación se van a mencionar algunos ejemplos.

Las proteínas de membrana y secretorias son sintetizadas con una secuencia de aminoácidos llamada péptido señal (pre-péptido) que sirve para determinar su destino final. Ese péptido es removido por una peptidasa señal localizada en el retículo endoplásmico rugoso.

También hay numerosas proteínas que se sintetizan como proproteínas, como es el caso de la acrosina que se convierte en acrosina, una proteasa cuyo producto de hidrólisis es el agente lítico del esperma de mamífero y que se convierte en enzima activa a través de un proceso iniciado por la acrolisina (127).

Se ha documentado que la mayoría de las hormonas proteicas (por ejemplo insulina) y otras proteínas como toxinas, factores de crecimiento o proteínas virales son sintetizadas como precursores.

Además se puede mencionar el proceso de coagulación sanguínea que involucra casi doce glicoproteínas, la mayoría de las cuales son serín proteasas sumamente específicas, que se encuentran en el plasma en formas inactivas. Cuando se inicia el proceso de coagulación se desencadena una conversión de precursores inactivos a enzimas activas a través de un proceso de proteólisis limitada que conduce a la formación de fibrina por acción de la trombina (128).

Entre las proteasas del segundo grupo encargadas de destruir compuestos biológicamente activos se encuentran

aquellas responsables de una degradación exhaustiva de sus sustratos tales como las catepsinas y las proteasas del sistema dependiente de ATP.

De los ejemplos mencionados anteriormente surge que las proteasas tienen una función clave no sólo en la regulación del recambio proteico sino que también participan en una variedad de procesos como: digestión, translocación de proteínas, maduración de hormonas, armado de virus, respuesta inmune, inflamación, coagulación sanguínea, fertilización, esporulación, germinación y transformaciones oncogénicas entre otros procesos (129).

1.6 PROTEINAS MUSCULARES

El tejido muscular contiene varios tipos de células (miocitos, fibroblastos, macrófagos, células nerviosas, mastocitos). La principal función del músculo es el movimiento, que es llevado a cabo casi exclusivamente por la fibra muscular, pero la interacción de la fibra muscular con otros tipos de células es muy importante. Por ejemplo los fibroblastos no sólo son responsables para la formación de tejido conectivo sino que también influyen la velocidad de degradación de las proteínas de vida media larga en la célula muscular (130).

La fibra muscular tiene 55-78 % de agua, 15-22 % de proteínas, 1-15 % de lípidos y menos de 4 % de hidratos de carbono, minerales y otros compuestos. De esta composición

surge que el músculo tiene 50-95 % de sólidos orgánicos, dependiendo del contenido de lípidos (131).

Las proteínas han sido clasificadas según su solubilidad en solventes acuosos (132-133) en :1) proteínas sarcoplasmáticas, 2) proteínas del estroma y 3) proteínas miofibrilares. Esta clasificación data de varios años atrás y es incompleta; más recientemente se ha incorporado el término proteínas del citoesqueleto. Estas proteínas desde el punto de vista de la solubilidad podrían incluirse en el grupo de proteínas del estroma, pero por su importancia y propiedades es preferible tratarlas separadamente.

Se llama proteínas sarcoplasmáticas a aquellas proteínas solubles a fuerza iónica de 0.1 M o menos. La composición de esta fracción está influenciada por las condiciones de extracción (velocidad y tiempo de homogenización, pH y composición de la solución extractante), pero en general contiene todas las enzimas de la glicólisis y la mayoría de las enzimas de la síntesis de hidratos de carbono y proteínas. Son alrededor de 100-200 proteínas distintas.

Las proteínas del estroma son insolubles en solventes acuosos neutros. Comprende a lipoproteínas y mucoproteínas de membrana así como a las proteínas del tejido conectivo.

Las proteínas miofibrilares representan el 52-56 % de la proteína total de músculo esquelético. Su importancia radica en que son componentes mayoritarios de la fibra muscular y directamente responsables de las propiedades contráctiles, por ello que han recibido gran atención por parte

de fisiólogos y bioquímicos. Estas proteínas también han sido intensamente estudiadas por los tecnólogos de alimentos, por ser responsables de las cualidades gastronómicas y nutricionales de la carne.

Se ha determinado que el 97 % de la capacidad de retener agua de la carne es debido a las proteínas miofibrilares. Además, contribuyen al poder emulsificante de la carne y son responsables del 50-100 % de la variación de la ternura, dependiendo de la cantidad de tejido conectivo que tenga el músculo.

Las proteínas miofibrilares comprenden a los dos componentes mayoritarios del aparato contráctil: miosina y actina, y a otros componentes menores: tropomiosina, tropomiosina, proteína C, proteína M y α y β actinina.

La miosina es el componente principal de los filamentos gruesos. Es una molécula asimétrica de peso molecular 460 kDa, formada por dos cadenas pesadas idénticas de 200 kDa y cuatro cadenas livianas. Las cadenas pesadas están enrolladas entre sí formando una larga cola con dos cabezas globulares en un extremo. Estas cabezas contienen cadenas polipeptídicas de bajo peso molecular llamadas cadenas livianas. Dos son idénticas con un peso molecular de 18 kDa y las otras dos son de 16 y 21 kDa respectivamente.

La actina se encuentra en dos formas: actina G (globular) y F (fibrosa). La actina G es una proteína globular de 46 kDa. Estas moléculas se asocian formando hebras de actina F, las cuales se enrollan entre sí para formar los

filamentos delgados, que a su vez contienen dos proteínas con función reguladora: la troponina y la tropomiosina.

Es ampliamente aceptado que el sarcómero, que es la unidad básica contráctil de la célula muscular estriada, está constituido por dos conjuntos de filamentos (delgados y gruesos) paralelos e interdigitados (134-136). Estos filamentos son discontinuos e inextensibles, y constituyen la base estructural del modelo de deslizamiento de filamentos, que explica la contracción muscular (137).

Más recientemente, a través de estudios estructurales, bioquímicos e inmunohistoquímicos, se ha comprobado que existen complejos ordenamientos de filamentos que constituyen el citoesqueleto de la fibra muscular. Al citoesqueleto se le han atribuido funciones relacionadas a la movilidad celular, movimiento de organelas, citoquinesis, fagocitosis, secreción y modulación de la superficie celular. Es importante considerarlo como un sistema dinámico involucrado en el movimiento celular y en los cambios en la forma y no simplemente como una red pasiva como podría sugerir su nombre. Existen dos conjuntos de filamentos continuos y extensibles. Uno de ellos forma una red endosarcomérica de filamentos ultrafinos y el otro conjunto forma una red exosarcomérica de filamentos intermedios.

La identidad de los filamentos que constituyen la red endosarcomérica ha sido claramente determinada, aunque no hay respuestas claras a como están organizados y qué funciones cumplen. Sus componentes mayoritarios son titina y

nebulina (138-139). Ambas proteínas son extremadamente susceptibles a la degradación. La titina aparece en geles de SDS-poliacrilamida como dos bandas (T_1 y T_2) inmunológica y químicamente relacionadas, probablemente como precursor-producto. Estas proteínas tienen un peso molecular aproximado de 1000 kDa.

La nebulina también es una proteína de alto peso molecular (500 kDa). Los estudios de localización sugieren que está predominantemente en la región de la banda I y que es una proteína estructural de la línea N_2 .

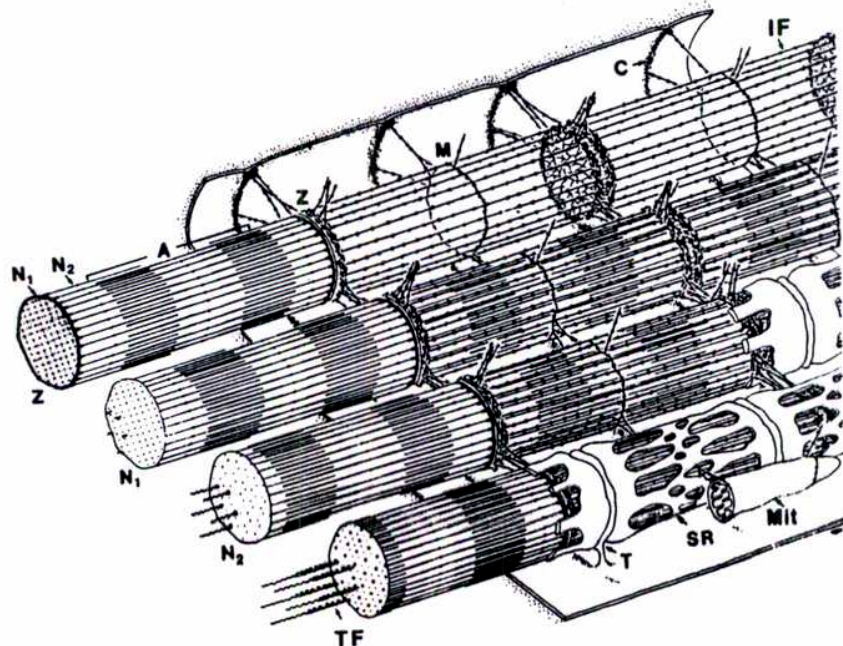
Los filamentos intermedios (140) tienen un diámetro aproximado de 10 nm. Si bien han sido encontrados en la mayoría de las células de los vertebrados y comparten algunos hechos estructurales y propiedades químicas, hay considerable evidencia de que existen cinco subclases compuestas por distintas subunidades proteicas (141-142). Estos filamentos en células de músculo esquelético y cardíaco tienen a la desmina (143-144), una proteína de 55 kDa (145) como el componente principal pero se desconoce el resto de sus componentes.

Wang y colaboradores (146), han propuesto una hipótesis de trabajo tratando de dar una interpretación coherente y satisfactoria de la organización de los filamentos del citoesqueleto en la fibra muscular en función de los datos experimentales existentes. Suponen que los filamentos endosarcoméricos son un conjunto de filamentos paralelos y externos a los filamentos delgados y gruesos, y que conectan

sucesivas líneas Z del sarcómero. También suponen que esos filamentos son elásticos y/o extensibles excepto en los lugares donde interactúan con otras estructuras sarcoméricas no extensibles (componentes externos de los filamentos gruesos). Varios ordenamientos de estos filamentos son posibles para evitar que interfieran con las actividades de entrecruzamiento de los filamentos delgados y gruesos. Se supone además, que existen filamentos transversales o estructuras ramificantes.

De sus observaciones surge que los filamentos intermedios que constituyen la red exosarcomérica son parte integrante de una red tridimensional que interconecta todas las líneas Z y M, tanto longitudinal como transversalmente. Esto sugiere que la tensión puede ser transmitida en forma paralela y perpendicular al eje de la fibra muscular.

A continuación se muestra el modelo hipotético de organización de los filamentos del citoesqueleto en células musculares esqueléticas realizado por Wang (146).



IF, Filamento intermedio exosarcomérico; TF, Filamento endosarcomérico conteniendo titina y nebulina; Z, N₁, N₂ corresponden a las líneas Z, N₁ y N₂ respectivamente; T, Túbulo; SR, retículo sarcoplásmico; Mit, Mitocondria; C, Costámero.

Hasta el momento sólo se puede especular sobre cuáles son las funciones de estas dos redes in vivo, habiéndose propuesto distintos roles: estructurales, mecánicos, regulatorios, metabólicos y en el desarrollo (146).

En el caso de la red endosarcomérica se ha especulado que actuaría como soporte de los filamentos gruesos y delgados y que podría participar en el armado y recambio de ambos filamentos, determinando su longitud o su ordenamiento geométrico. También resulta una posibilidad interesante que la red esté involucrada en la contracción y relajación del músculo, debiendo considerarse la posibilidad que la red en sí misma sea contráctil. Estos filamentos pueden regular el movimiento del calcio y por consiguiente podrían participar en la relajación de tensión y en longitud (realargamiento del sarcómero).

Con respecto a la red exosarcomérica actuaría como soporte del sarcómero y en la yuxtaposición de miofibrillas adyacentes. También serviría de soporte a glicosomas, mitocondrias y núcleos. Otras funciones propuestas son que participaría de la tensión en reposo y en la transmisión de tensión.

De todo lo expuesto anteriormente parece bastante probable que la integridad de ambas redes podría ser de gran influencia en las propiedades del músculo vivo y post-mortem.

1.7 PROTEASAS MUSCULARES

Las enzimas encontradas en músculo se pueden agrupar de la siguiente manera para su estudio: 1) enzimas lisosomales 2) enzimas no lisosomales y dentro de éstas, enzimas activas a pH neutro o alcalino y enzimas dependientes de calcio.

1) Enzimas lisosomales

Hasta el momento se han caracterizado trece proteasas lisosomales, pero en músculo esquelético sólo se han encontrado seis (catepsinas A, B, C, D, H, L) y la carboxipeptidasa B.

Debido a que las catepsinas son una mezcla de endo y exoproteasas, y a la alta concentración en que se encuentran en el interior de los lisosomas, una vez que las proteínas son internalizadas en dichas organelas son degradadas rápidamente a péptidos y aminoácidos (147). Además, el pH intralisosomal es aproximadamente 4.5, que está próximo al pH óptimo de estas enzimas.

La catepsina B degrada a la miosina a pH 5.2 dando un fragmento de 150 kDa, resistente a una posterior degradación, y a varios péptidos de bajo peso molecular (148).

La catepsina D degrada a la miosina, a pH 4.0, más rápido y exhaustivamente que la catepsina B. Ambas enzimas también degradan a la actina (148).

Bird y colaboradores (149), demostraron que las catepsinas B y D, no sólo actúan sobre miosina y actina aisladas sino que también son capaces de degradarlas cuando forman parte de miofilamentos y miofibrillas aisladas.

En 1976, se descubrieron las catepsinas H y L (150), que tienen una capacidad de degradar miosina mayor que la de las catepsinas B y D combinadas. La catepsina L degrada las cadenas livianas y pesadas de miosina y también actina.

2) Enzimas no lisosomales

Se ha mencionado anteriormente que en la mayoría de las células existe una vía de degradación no lisosomal. La importancia cuantitativa de esta ruta en tejidos como el músculo, con un contenido relativamente bajo en lisosomas, aún no ha sido determinada. Sin embargo hay evidencias de que la degradación de miosina, al menos en los estadios iniciales, ocurre fuera de los lisosomas (151-152). Por ello, se ha prestado gran atención a las enzimas no lisosomales.

Se han descrito varias actividades proteolíticas en el rango de pH 7.5-11.5, atribuidas al músculo esquelético. Sólo seis o siete han sido purificadas lo suficiente como para permitir su comparación. Estas enzimas recibieron distintos nombres: serín proteasa alcalina (153), proteasa hidroli-

zante de miosina (154), proteasa alcalina (155), proteasa miofibrilar de rata (156), proteasa miofibrilar alcalina (157), proteasa hidrolizante de miosina de Murakami y Uchida (158). Estudios inmunohistoquímicos posteriores, demostraron que provenían de mastocitos, y que sus propiedades correspondían a las de quimasa, una proteasa tipo quimotripsina presente en esas células.

Existen otras dos proteasas alcalinas no lisosomales aisladas de músculo de rata. Una de ellas, que fue descrita por Kay y col., es una serín proteasa de músculo liso (159) con una gran capacidad para degradar proteínas miofibrilares (160). Sin embargo, posteriormente también se comprobó que no pertenecía a la célula muscular.

La otra enzima es una proteasa multicatalítica (115), activada por SDS y compuestos químicamente relacionados (ácidos grasos saturados e insaturados) (90). Hasta el momento no se conoce la concentración de ácidos grasos libres dentro de la fibra muscular y por lo tanto el significado fisiológico de esta activación es difícil de determinar.

Finalmente hay que mencionar que en el citosol se encuentra la calpaina, descrita por primera vez por Dayton y col., en músculo esquelético de cerdo (161), pero posteriormente detectada en gran variedad de tejidos (110).

La calpaina tiene muy poco efecto sobre las proteínas sarcoplasmáticas de la fibra muscular pero degrada a algunas proteínas miofibrilares en una forma específica y limitada.

La calpaina no degrada actina, α -actinina ni troponina C(162). En la mayoría de los estudios tampoco degrada a la miosina, que es una proteína muy susceptible a la proteólisis, excepto cuando la cadena liviana LC₂ no está fosforilada, en cuyo caso la cadena pesada pasa de un polipéptido de 200 kDa a otro de 190 kDa (163). Esta enzima produce una proteólisis específica de troponina T e I (162), proteína C (162), filamina (164), desmina (165), titina y nebulina, pero este punto está en discusión pues la titina no es degradada por la calpaina de músculo esquelético de pollo. Desde un punto de vista estructural la calpaina remueve a la línea Z de las miofibrillas (162) y también degrada la línea M, pero en una menor extensión (166).

I.7.1 Proteasas de músculo de pescado

En músculo de pescado sólo se han encontrado cuatro catepsinas: A (167), B(167), C(167) y D (168). Dos de ellas, las catepsinas B y D, fueron estudiadas en profundidad y resultaron similares a las correspondientes catepsinas de músculo de mamífero.

Además de las catepsinas, se han descrito cuatro proteasas extralisosomales: una tiene las características de la calpaina (169), otra es una proteasa neutra encontrada en músculo de carpa cuya actividad es independiente de calcio (170) y las dos restantes son alcalinas. De estas últimas, una fue descrita en 1969 (171) y ha sido hallada

en un gran número de especies de agua dulce y salada, la otra fue encontrada en nuestro laboratorio, es una serín proteasa que degrada miosina y actomiosina in vitro (83) y también destruye la integridad estructural de las miofibrillas degradando a las principales proteínas contráctiles y a los componentes de la red endosarcomérica del citoesqueleto. Estos resultados sugieren que la enzima podría estar involucrada en los estadios iniciales del recambio de miofibrillas in vivo (84).

La proteasa alcalina descrita por Makinodan (171), tiene máxima actividad a 65°C e indetectable por debajo de 55°C, a menos que la conformación fuera modificada por tratamientos como calor, agregado de urea o irradiación gama (172). Su estructura ha sido estudiada con gran detalle: es una enzima de alto peso molecular (500-920 kDa) y con una compleja composición de subunidades (173).

Esta proteasa alcalina fue encontrada cuando se estaba realizando una investigación en el área de la química de los alimentos ya que en Japón, se consume una pasta de pescado que se obtiene moliendo el músculo previamente lavado con sal y cocinándolo a diferentes temperaturas. Cuando la pasta se calienta a temperaturas cercanas a 60°C, se obtiene un gel con menos fuerza. Esa pérdida de elasticidad se conoce con el nombre de himodori. A la proteasa alcalina se le atribuye la responsabilidad de producir el himodori, pero aún queda por elucidar, a pesar de los años transcurridos

desde su descubrimiento, cuáles son sus funciones en el tejido vivo.

I.8 CAMBIOS EN EL MUSCULO POST-MORTEM

En la célula viva todos los procesos metabólicos están rigurosamente controlados, pero cuando sobreviene la muerte se pierden esos mecanismos de control y ocurren una serie de procesos irreversibles, que en el caso del tejido muscular producen la transformación del músculo en carne. Cuando ocurre la muerte del animal se detiene la circulación sanguínea y se desencadenan una serie de cambios complejos en el tejido muscular (174-175). La velocidad y extensión con que ocurren esos cambios difieren según la especie.

En los primeros momentos cesa la regulación hormonal y nerviosa, el aporte de vitaminas y antioxidantes, se destruye el equilibrio osmótico y cesa el aporte de oxígeno. Al desaparecer el aporte de oxígeno, cae el potencial de oxidoreducción, entonces cesa la respiración y comienza la glucólisis anaeróbica por la cual el glucógeno en lugar de metabolizarse a dióxido de carbono y agua se convierte en ácido láctico, provocando un descenso de pH que inhibe a ciertas enzimas y favorece la desnaturalización de las proteínas, las cuales se tornan más susceptibles al ataque por proteasas y pierden su capacidad de retener agua, provocando un exudado que afecta desfavorablemente a la textura. La hidrólisis de ATP continúa en el músculo post-

mortem pero la cantidad que se regenera en la glucólisis anaeróbica no es suficiente para mantener el nivel de ATP endógeno. Además, cuando la glucólisis se detiene el contenido de ATP cae a cero, por lo cual la actina y miosina se unen irreversiblemente y se produce la entrada del músculo en rigor mortis.

Luego de varios días de almacenamiento post-mortem y como consecuencia de la degradación de proteínas y la formación de péptidos y aminoácidos y de la acumulación de diversos metabolitos, el tejido se convierte en un medio rico para el crecimiento de bacterias. Además, al cesar la circulación no hay nuevo aporte de antioxidantes y ocurre la oxidación de las grasas con su concomitante rancidez.

Cuando el músculo vacuno es dejado a 0°C, la desaparición del rigor mortis sobreviene en 15 días después de la muerte del animal. El músculo de pescado se comporta de manera similar a los animales de sangre caliente, a pesar de que existen ciertas diferencias (176). El contenido de tejido conectivo es menor (3-10% frente a 10-20% en mamíferos) y el colágeno gelatiniza entre 30°C y 45°C según la especie, mientras que la temperatura de gelatinización en mamíferos es de 63°C-65°C. Estas diferencias explican la relativa blandura de la carne de pescado. El rigor mortis y su desaparición ocurren rápidamente, en general entre 5 y 30 horas respectivamente a 0°C. El descenso de pH es mínimo y depende fundamentalmente de la forma de captura: el pH pasa de 7.0 a 6.2-6.5, para luego subir a 6.6-6.7. Estos pHs no

inhiben la proliferación bacteriana y contribuyen a la fácil alteración del pescado.

A medida que transcurre el tiempo de almacenamiento, la carne sufre un proceso de maduración en el cual ocurren distintas reacciones químicas que contribuyen a su aroma y sabor, y la dureza desarrollada durante el rigor mortis va disminuyendo lentamente. La textura de la carne tal vez sea el factor más importante, al considerar su aceptación como alimento.

Los elementos estructurales: tejido conectivo, aparato contráctil y proteínas del citoesqueleto, podrían en distinta medida afectar la terneza de la carne. Durante bastante tiempo la teoría más ampliamente aceptada sostenía que la contracción muscular y el tejido conectivo intramuscular eran los dos factores más importantes en determinar las propiedades del tejido muscular. Posteriormente se introdujo el concepto de agua intrafibra (177) como factor a ser considerado en la textura. El agua intrafibra es inversamente proporcional al espacio extracelular, y se cree que los altos niveles facilitan el deslizamiento de las miofibrillas, bajo fuerzas de tensión y adhesión.

Más recientemente, se ha postulado tanto por razones teóricas como experimentales al citoesqueleto como un contribuyente importante a las propiedades físicas de la carne (178).

K.B. Lehman, casi 90 años atrás, postuló que la dureza de la carne se relacionaba con el contenido de tejido conectivo. Hubo varios investigadores que sostuvieron esa postura pero muchos trabajos posteriores concluyeron que existe muy poca o ninguna correlación. Por ejemplo el ternero tiene mayor contenido de tejido conectivo que la vaca a pesar de la mayor terneza de su carne (179-180). Esto sugiere que fundamentalmente es la calidad y no la cantidad de colágeno lo que puede estar relacionado a la terneza de la carne. Esto estaría apoyado por el hecho de que las formas de colágeno solubles en soluciones salinas neutras o ácidas diluidas disminuye a niveles muy bajos desde el nacimiento hasta los dos años (181) y además, las uniones covalentes entre moléculas de tropocolágeno se hacen mucho más termoestables con la edad (182).

Como se mencionó anteriormente, se cree que las proteínas miofibrilares y del citoesqueleto son importantes cuando se considera la textura de la carne. Es por ello que los científicos de la carne han prestado gran atención a la degradación de estas proteínas por enzimas proteolíticas del músculo. Ya en el año 1917 (183) se postuló que la proteólisis podía ser un factor importante en los cambios post-mortem.

Si bien la terneza de la carne vacuna incrementa entre 1 y 14 días de almacenamiento post-mortem (184-185), se encontró muy poco aumento en las mediciones químicas de la proteólisis durante ese período (186-188). Además, se obser-

vó que la proteólisis sólo afectaba a las proteínas sarcoplasmáticas, las cuales no están directamente involucradas en la terneza (188).

Recién en la década del 70, cuando comenzaron a realizarse estudios con el microscopio electrónico y a emplearse técnicas como la de geles de SDS-poliacrilamida, pudo observarse que en los primeros 14 días de almacenamiento ocurre una proteólisis muy específica y limitada. Durante ese período, en el cual hay modificaciones apreciables de la terneza, la mayoría de las proteínas miofibrilares permanecen intactas. Sin embargo, se observa el ensanchamiento de la estructura fibrilar en la zona del disco Z y una disminución en la estructura de la línea M, la cual ocurre más lenta y menos intensamente que la desintegración del disco Z (189-190). En ese período las bandas A e I permanecen ultraestructuralmente casi normales (189).

Durante el almacenamiento post-mortem también ocurren cambios en la interacción actina-miosina. La naturaleza de esos cambios se desconoce, pero ellos se pueden detectar a través de distintas mediciones. Por ejemplo, la actomiosina de músculo almacenado superprecipita más rápidamente por el agregado de ATP (191) y puede disociarse en actina y miosina a concentraciones de ATP menores que las requeridas por la actomiosina preparada de un músculo de animal recién muerto (192). Además, los sarcómeros, que se acortan al entrar en rigor mortis durante el almacenamiento, vuelven a alargarse a pesar de que el nivel de ATP ha caído a cero (193), indi-

cando que las uniones del complejo actomiosínico se han debilitado.

Con respecto a las proteínas durante el almacenamiento post-mortem, se ha observado la aparición en geles de SDS-poliacrilamida de una banda de 30 kDa cuando se almacena el músculo o miofibrillas intactas (194-195). Se desconoce a partir de que proteína proviene este producto de degradación, pero estudios con tripsina (196) y calpaina (197), han demostrado que cuando la troponina T se degrada origina un producto de ese tamaño. La troponina T también disminuye durante el almacenamiento, por lo cual es probable que la banda de 30 kDa derive de ella. Esta degradación de la troponina T se consideró durante bastante tiempo responsable de la tiernización, pero probablemente no sea la causa directa de la misma, ya que a esa proteína no se le conocen funciones estructurales. Además, cuando se analizaron miofibrillas de músculo bovino conservado a varias temperaturas y por un periodo de tiempo de hasta 7 días, se encontró que la titina, una proteína de muy alto peso molecular, se degradaba durante el post-mortem. La intensidad de la degradación incrementaba con el tiempo y la temperatura de almacenamiento (198). También se encontró que en músculo bovino, sufren proteólisis post-mortem la nebulina (198) y la desmina (145). Se cree que la degradación de estas proteínas sí podría estar relacionada a los cambios de textura de la carne, por ser componentes del citoesqueleto.

Conocidos estos hechos experimentales, numerosos investigadores han tratado de determinar qué enzimas proteolíticas pueden ser responsables del proceso de tiernización de la carne. Si bien desde varios años atrás se prestó mucha atención a las catepsinas, actualmente se cree que salvo en el caso de tejido congelado o madurado a temperaturas superiores a 16°C su contribución a la tiernización no es muy importante, y si participan tal vez lo hagan en forma concertada con otras enzimas.

La catepsina D, una de las enzimas de músculo más estudiadas, es poco probable que actúe debido a que su pH óptimo es muy ácido. Tienen mayor probabilidad de cumplir alguna función las catepsinas L, H y en menor medida la B.

Una enzima a la que se ha prestado mucha atención por su posible participación en la tiernización es la calpaína. Similarmente a lo que ocurre en el almacenamiento post-mortem degrada al disco Z (162,166,189), a la línea M (166,189), a la troponina T (162,197), a la desmina (165,199) y no tiene efecto sobre la actina y miosina (162,197). Con respecto a su acción sobre titina existen algunas controversias, pues se ha informado que esa proteína es degradada por la calpaína obtenida de músculo esquelético bovino pero no por la proveniente de músculo esquelético de pollo (200-201).

A pesar de estos resultados, no pueden atribuirse a la calpaína todos los cambios que ocurren durante el almace-

namiento del músculo. Algunas de sus propiedades crean algunos problemas teóricos sobre su modo de acción.

Además de lo expuesto precedentemente se conocen algunas proteasas extracelulares que podrían contribuir a la degradación del colágeno y de mucoproteínas responsables de la adhesión de células adyacentes.

Con respecto al colágeno ocurre muy poca degradación post-mortem (174) pero una probable enzima capaz de degradarlo es la catepsina N, que se encuentra en algunas células no musculares del tejido. También podrían estar involucradas las catepsinas L o H secretadas por la célula muscular o presentes en otras células no musculares. Respecto de la degradación de otras proteínas extracelulares se conoce muy poco.

Con respecto al pescado, se han realizado muy pocos estudios sobre los cambios que sufren las proteínas miofibrilares durante el almacenamiento a bajas temperaturas a pesar de la importancia de esta forma de conservación. Los resultados han sido bastante contradictorios, por ejemplo, cuando se almacenó sardina durante una semana se encontró que se degradaba la miosina (202), mientras que en el músculo de granadero no se detectó proteólisis alguna luego de dos semanas de almacenamiento (203). En cuanto a los cambios experimentados por las proteínas del citoesqueleto los resultados también son contradictorios a pesar que ambos han sido realizados en carpa: en un caso se encontró que la titina y nebulina se degradaron al cabo de un día de

almacenamiento (204), mientras que en el otro la titina no se modificó luego de 10 días a 0°C (205).

En lo referente a las enzimas proteolíticas que puedan estar involucradas en los cambios post-mortem del músculo de pescado se ha estudiado a la calpaina de carpa (206), que actúa de manera similar a la de mamíferos y aves. Estos resultados indicarían la necesidad de profundizar en el estudio de las enzimas extralisosomales del músculo de pescado en referencia a su posible influencia en los cambios mencionados.

I.9 OBJETIVOS DEL TRABAJO

Previamente en el laboratorio habíamos descripto en músculo de corvina, la existencia de dos proteasas alcalinas y de un inhibidor endógeno capaz de actuar sobre una de ellas. Ambas enzimas mostraron una gran capacidad de degradar proteínas miofibrilares (82-84).

El objetivo de este trabajo ha sido profundizar en el estudio de las dos proteasas alcalinas de músculo de corvina, llamadas I y II, por su posible participación tanto en los mecanismos generales de degradación extralisosomal como en los cambios que ocurren durante el almacenamiento post-mortem y que conducen a modificaciones en la textura de la carne. Es por ello que se realizó:

1-La purificación de la proteasa I y el estudio de algunas de sus propiedades, en especial, su acción sobre proteínas

del citoesqueleto. Para ello fue necesario previamente investigar en el músculo de corvina la existencia de una red exosarcomérica del citoesqueleto.

2-La purificación de la proteasa II y su caracterización. Se buscó la presencia de compuestos que pudieran regular su actividad in vivo, ya que se desconocían mecanismos de regulación de esta enzima.

3-Además debido a la importancia del almacenamiento a bajas temperaturas como forma primaria de conservación del pescado, desde su captura hasta su consumo como tal o su procesamiento, se estudiaron los cambios que sufren las proteínas del citoesqueleto durante ese período, debido a su posible relación con los cambios de textura.

MATERIALES Y METODOS

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.

En los casos en que se llevaron a cabo experiencias de almacenamiento a 0°C, una vez que el pescado llegó al laboratorio se fileteó y los filetes se bañaron en una solución con azida sódica 0.1 M y se conservaron por un periodo de hasta 7 días.

M.2 REACTIVOS

El DEAE-Sephacel, Octil-Sepharose CL-4B, Fenil-Sepharose CL-4B, Sephacryl S-300 y Arginina-Sepharose 4B fueron adquiridos a Pharmacia Fine Chemicals, el EDTA, el 2-MCE, todos los inhibidores de proteasas, los ácidos grasos y sustratos fluorogénicos a Sigma Chemical Co y la tripsina a DIFCO Laboratories. La azocaseína se preparó en el laboratorio (207). Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

M.3 PURIFICACION DE LA PROTEASA I

Todos los procedimientos se llevaron a cabo a 0-4°C.

Preparación del extracto crudo: 250 g de músculo blanco se homogeneizaron con 500 ml de KCl 2 %, durante 1 min en un homogenizador Omni Mixer a velocidad media. El homogenato se centrifugó a 10000 x g durante 15 min y al sobrenadante obtenido se le agregaron 1.7 volúmenes de buffer borato 8 mM pH 7.5. Luego se agregó NaOH 0.5 N para llevar el pH a 7.5.

Cromatografía de intercambio iónico: El extracto crudo se aplicó a una columna de DEAE-Sephacel (4 x 12 cm) equilibrada con NaCl 0.1 M/ buffer borato 5 mM pH 7.5 (solución A). La columna se lavó con el mismo buffer y las proteínas unidas se eluyeron con un gradiente de NaCl 0.1-0.5 M en la solución A, cuyo volumen total fue de 900 ml. Se recogieron fracciones de 9 ml. Se obtuvieron dos picos de actividad correspondientes a las proteasas I y II. El perfil fue similar al obtenido cuando la preparación del extracto crudo se efectuó como se describió previamente (82).

Cromatografía de interacción hidrofóbica: Las fracciones con actividad de proteasa I se mezclaron con 0.65 volúmenes de NaCl 5M/ buffer fosfato 75 mM pH 8 (solución B). La solución salina se agregó gota a gota y con suave agitación. La mezcla se centrifugó a 15000 x g 15 min y el sobrenadante se sembró en una columna de Octil-Sepharose CL-4B (1 x 17 cm) equilibrada con NaCl 2 M/buffer fosfato 30 mM pH 8.0 (solución C). La columna se lavó con el mismo buffer con el cual había sido equilibrada y luego con buffer

fosfato 30 mM pH 8.0. Se recogieron fracciones de 10 ml. Finalmente la actividad de la proteasa I se eluyó con agua, recogándose fracciones de 1 ml.

Cromatografía de afinidad: A las fracciones activas provenientes del paso anterior de purificación, se les agregó buffer fosfato 0.5 M pH 7.3 hasta obtener una concentración final de 20 mM, y se las sembró en una columna de Arginina-Sepharose 4B (1 x 7 cm) equilibrada con buffer fosfato 20 mM pH 7.5 (solución D). La columna se lavó con el mismo buffer, y las proteínas unidas se eluyeron con un gradiente de NaCl 0-500 mM en buffer fosfato 20 mM pH 7.5, cuyo volumen total fue de 100 ml. Se recogieron fracciones de 2 ml.

M.4 PURIFICACION DE LA PROTEASA II

Todos los procedimientos se llevaron a cabo a 0-4°C.

Preparación del extracto crudo: 300 g de músculo blanco se homogeneizaron con 600 ml de KCL 2 %/ 2-MCE 5mM/ EDTA 1 mM pH 7.0 durante 1 min en un homogeneizador Omni Mixer a velocidad media. El homogenato se dejó reposar en hielo durante 30 min y luego se centrifugó a 10000 x g 20 min. El sobrenadante se dializó durante toda la noche contra NaCl 0.1 M/ 2-MCE 5 mM/ EDTA 1 mM/ buffer borato 5 mM pH 7.5 (solución E).

Cromatografía de intercambio iónico: El extracto crudo se aplicó a una columna de DEAE-Sepharcel (1.7 x 25 cm)

equilibrada con la solución E. La columna se lavó con el mismo buffer y las proteínas unidas se eluyeron con un gradiente lineal de NaCl 0.1-0.5 M NaCl en 2-MCE 5 mM/ EDTA 1 mM/ buffer borato 5 mM pH 7.5 (volumen total= 400 ml). Se recogieron fracciones de 3 ml. Se obtuvieron dos picos de actividad proteolítica correspondientes a las proteasas I y II (82).

Cromatografía de interacción hidrofóbica: Las fracciones con actividad de proteasa II que fueron obtenidas de la columna de DEAE-Sephacel se mezclaron con 0.65 volúmenes de NaCl 5 M/ 2-MCE 5 mM/ EDTA 1 mM/ buffer fosfato 75 mM pH 8.0 (solución F). La solución salina se agregó a la solución enzimática gota a gota, con suave agitación. La mezcla fue centrifugada a 15000 x g 15 min y el sobrenadante sembrado en una columna de Fenil-Sepharose CL-4B (1 x 12 cm) equilibrada con NaCl 2 M/ 2-MCE 5 mM/ EDTA 1 mM/ buffer fosfato 30 mM pH 8.0 (solución G). La columna se lavó con la solución G y luego se eluyó con 100 ml de un gradiente lineal de NaCl 2-0 M en 2-MCE 5 mM/EDTA 1 mM/ buffer fosfato 30 mM pH 8.0, recogándose fracciones de 2 ml. Se juntaron las fracciones activas y se concentraron 15-20 veces de la siguiente manera: se mezclaron con 0.3 volúmenes de la solución F, se aplicaron a una columna de Fenil-Sepharose CL-4B (1 x 2.2 cm) equilibrada con la solución G, y luego se eluyeron con 2-MCE 5 mM/ EDTA 1 mM/ buffer fosfato 30 mM pH 7.5.

Cromatografía de gel filtración: La solución enzimática concentrada en el paso anterior (3 ml) se sembró en una columna de Sephacryl S-300 (1.2 x 76 cm) equilibrada con la solución E. Se recogieron fracciones de 1 ml.

M.5 MEDICIONES DE ACTIVIDAD

M.5.1 Actividad azocaseinolítica: La actividad proteolítica se midió incubando la enzima a la temperatura oportunamente indicada con azocaseína 1 % en buffer Tris-HCl 0.1 M (pH 8.5 en el caso de la proteasa I y pH 9.0 en el caso de la proteasa II), en un volumen final de 250 μ l. La reacción se detuvo por el agregado de 250 μ l de TCA 10 %, y se midió la densidad óptica del sobrenadante a 335 nm. El tiempo de incubación fue 15-20 min cuando se midió la actividad de las fracciones agrupadas en cada paso de purificación, y de 2 hs cuando se determinó la posición de la enzima en las columnas cromatográficas. Se define una unidad enzimática (U.E) como la cantidad de enzima que produce un $\Delta A_{335} = 1$ cuando se incuba con azocaseína a 60°C durante 1 h en la mezcla de reacción estándar.

Cuando la incubación se realizó en presencia de ácidos grasos, éstos fueron disueltos en dimetilsulfóxido o etanol, de manera que la concentración final de los solventes no excediera el 5 % en el medio de reacción.

Cuando en el medio de reacción estuvo presente el SDS, previo a la detención de la reacción con TCA se agregó

albúmina de suero bovino a una concentración final de 1 mg/ml como carrier para favorecer la precipitación.

M.5.2 Actividad hidrolizante de los derivados 4-metil-7-cumarilamida de péptidos con el amino terminal bloqueado: La actividad se midió en un medio de reacción de 125 μ l que contenía sustrato 0.1 mM en buffer Tris-HCl 0.1 M (pH 8.5 en el caso de la proteasa I y pH 9.0 en el caso de la proteasa II). Después de la incubación a 37°C por diferentes periodos de tiempo hasta 30 min, se tomaron alícuotas de 30 μ l y se mezclaron con 50 μ l de SDS 10 % y 650 μ l de buffer Tris-HCl 0.1 M pH 9.0. La fluorescencia liberada por la 7-amino-4-metil cumarina fue medida usando un filtro primario de 366 nm (excitación) y un filtro secundario de 450 nm (emisión).

M.6 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

M.6.1 Geles en condiciones desnaturalizantes: Se realizaron de acuerdo al método de Forzio y Pearson (208), usando geles al 5 o 10 % según el caso. Las muestras se prepararon como fue informado previamente (83). Los geles fueron fijados con isopropanol 25 %, ácido acético 10 %, y teñidos con Coomassie Blue 0.01 % en metanol 40 %, ácido acético 10 % o con nitrato de plata y destañados con metanol 5 %, ácido acético 10 % .

Se usaron como proteínas estándar: albúmina de suero bovino (PM 67000), ovoalbúmina (PM 45000), pepsina (PM 34700),

tripsinógeno (PM 24000), β -lactoglobulina (PM 18400) y lisozima (PM 14400).

M.6.2 Geles en condiciones no desnaturalizantes: Se realizaron según el método de Davis (209), usando geles al 5%. La fijación, tefido y destefido se realizaron como se describió en el párrafo anterior.

M.6.2.1 Determinación de la actividad proteolítica en geles: La corrida electroforética se realizó a 0-4°C. El gel se cortó en secciones de 2 mm y cada porción fue incubada en un medio de reacción adecuado durante 15 h a 37°C.

M.6.3 Densitometría: Los geles fueron destefidos exhaustivamente y analizados a 620 nm en un densitómetro Shimadzu CS-910.

M.7 INCUBACION DE MIOFIBRILLAS CON LA PROTEASA I

Las miofibrillas se prepararon según la técnica de Gill y col. (210). Se incubaron a una concentración de 2 mg/ml con la proteasa I en buffer Tris-HCl 0.1 M pH 7.5 y en presencia de EDTA 0.5 mM, siendo el volumen final de 125 μ l. Esa concentración de EDTA no afectó a la proteólisis de las miofibrillas por la proteasa I, pero se agregó rutinariamente a la mezcla de incubación para evitar la acción de metaloproteasas que pudieran estar como contaminantes de la

preparación enzimática o de las miofibrillas. Se usó proteasa I (0.45 U.E./ml) purificada de la siguiente manera: 1-Extracto crudo, 2-Cromatografía en DEAE-Sephacel, 3-Cromatografía en Octil-Sepharose CL-4B. Los pasos 1 y 2 se realizaron como se describió anteriormente (82) y el paso 3 como se detalló en M.3. Los tiempos y temperatura de incubación se detallan en cada caso.

Cuando las incubaciones se realizaron para su posterior examen en el microscopio electrónico, la reacción se detuvo por el agregado de 10 μ l de inhibidor de tripsina de soja 20 mg/ml. Las miofibrillas se extrajeron con K1 0.6 M y el residuo se preparó para microscopía electrónica de barrido de acuerdo a la técnica de Wang y Ramírez-Mitchell (211). En los experimentos control, el inhibidor de tripsina de soja se agregó al comienzo de la reacción.

Cuando las incubaciones se realizaron para luego efectuar el análisis electroforético, la reacción se detuvo con 250 μ l de urea 8 M, SDS 2.5 %, EDTA 5 mM, 2-MCE 1 %, buffer Tris-glicina 0.1 M pH 8.8. Las muestras se calentaron a 100 °C durante 2 min y alícuotas conteniendo 100 μ g de proteína miofibrilar se analizaron en geles de SDS-poliacrilamida al 10 % (M.6.1). Cuando la tinción se realizó con nitrato de plata se empleó la técnica de Merril y col (212).

M.8 DETERMINACION DE PROTEINAS

La concentración de proteínas se determinó según el método de Lowry y colaboradores (213), usando como estándar albúmina de suero bovino.

RESULTADOS

PROTEASA I

R.I.1 PURIFICACION DE LA PROTEASA I

Previamente en nuestro laboratorio, habíamos descripto la existencia de dos proteasas alcalinas, llamadas I y II, (82) con capacidad de degradar proteínas miofibrilares (83-84).

En esta parte del trabajo, se purificó la proteasa I, con el objeto de realizar su posterior caracterización. La preparación del extracto crudo se realizó como se informó anteriormente (82), pero en lugar de la diálisis previa a la siembra en la columna de DEAE-Sephacel, se diluyó el extracto para llevarlo a las condiciones de NaCl y buffer deseadas. Esta modificación se efectuó con el fin de evitar la autólisis de la proteasa I que lleva a la aparición de varias especies enzimáticas a lo largo de la purificación. El perfil obtenido en la columna de DEAE-Sephacel fue el mismo que se describió previamente (82).

La purificación de la proteasa I se realizó en tres pasos cromatográficos: DEAE-Sephacel (82), Octil-Sepharose CL-4B (fig. 1) y Arginina-Sepharose 4B (fig. 2). En distintas preparaciones se obtuvieron perfiles altamente reproducibles. Los resultados que se muestran en la tabla 1 indican que se obtuvo una purificación de 3590 veces y un rendimiento del 8% .

El perfil electroforético de la proteasa I bajo condiciones no desnaturalizantes mostró una única banda de

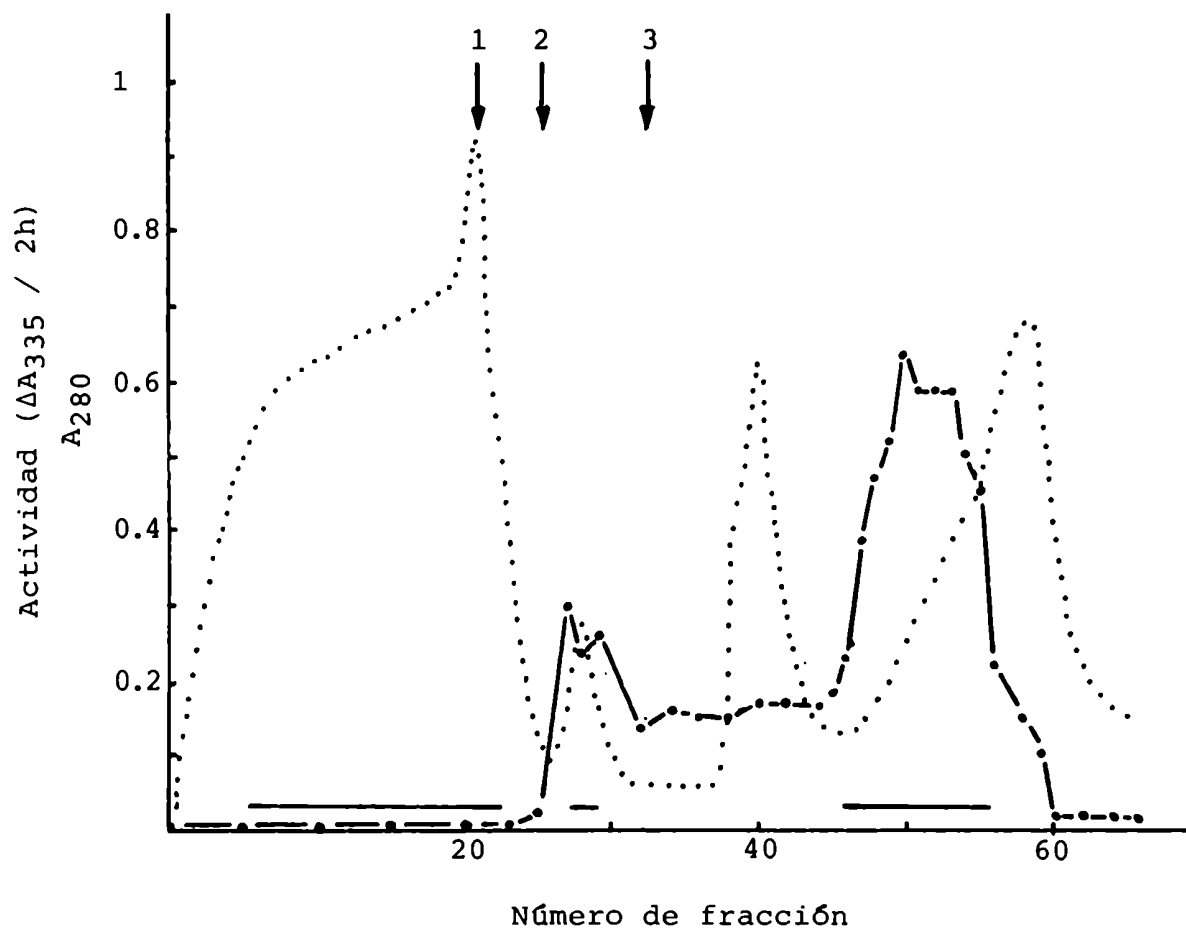


Fig. 1 Cromatografía en Octil-Sepharose CL-4B de la proteasa I obtenida de una columna DEAE-Sephacel. Las condiciones de preparación de la muestra y de la corrida cromatográfica se detallaron en M.3. Se midió la actividad azocaseinolítica (●) a 37°C como se describió en M.5.1. Se usaron 30 μ l de las fracciones de la columna como fuente de enzima. Las barras debajo de los picos indican las fracciones que se juntaron. A_{280} (···). Pasos de elución: 1-buffer de equilibrio; 2-buffer fosfato 30 mM pH 8.0; 3-agua.

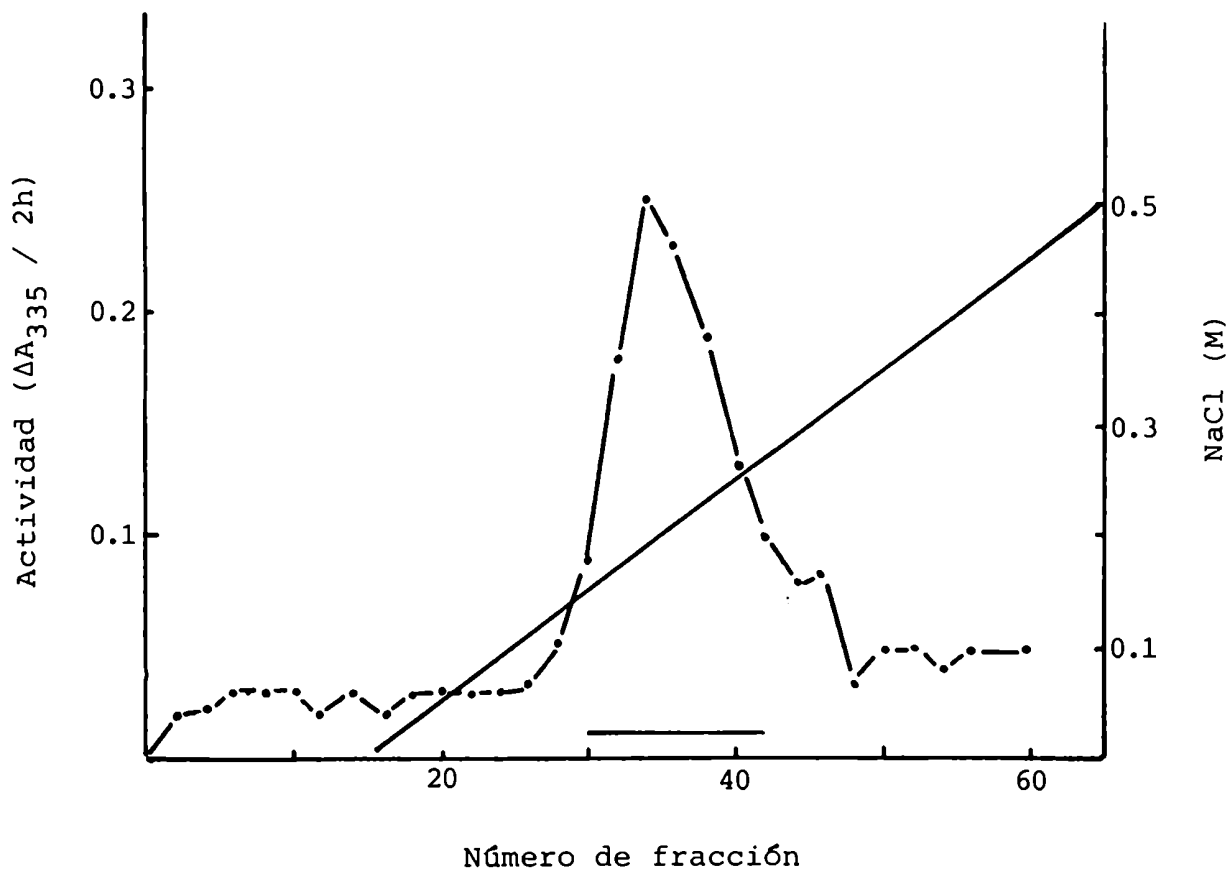


Fig. 2 Cromatografía en Arginina-Sepharose 4B de la proteasa I obtenida de la columna de Octil-Sepharose CL-4B. Las condiciones de preparación de la muestra y de la corrida cromatográfica se detallaron en M.3. Se midió la actividad azocaseinolítica a 37°C (●) como se describió en M.5.1. Se usaron 80 μ l de las fracciones de la columna como fuente de enzima. La barra debajo del pico indica las fracciones que se juntaron. A₂₆₀ (---).

Tabla 1 Purificación de la proteasa I

Procedimiento	Vol. (ml)	Prot. (mg/ml)	Act. (U/ml)	Act.Total (U)	Act.Esp. (U/mg)	Rend. (%)	Purif. (veces)
1-Extracto crudo	420	27.0	0.8	336	0.03	100	1
2-DEAE-Sephacel	120	1.6	2.1	252	1.3	75	43
3-Octil-Sephacel	11	0.4	3.3	36	8.3	11	277
4-Arginina-Sephacel	20	0.013	1.4	28	107.7	8	3590

El cuadro de purificación se realizó midiendo la actividad azocaseinoltica a 60°C.

proteína con la cual coincidía la actividad hidrolizante de Bz-Phe-Val-Arg-NMec (Fig. 3).

R.1.2 DEPENDENCIA DE LA ACTIVIDAD HIDROLIZANTE DE Boc-Val-Pro-Arg-NMec DE LA PROTEASA I CON EL pH

Se estudió la dependencia de la actividad de la proteasa I con el pH usando como sustrato Boc-Val-Pro-Arg-NMec. Se encontró que el pH óptimo era 8.5 (fig. 4), coincidiendo con el obtenido cuando se usó una preparación enzimática parcialmente purificada y azocaseína como sustrato (82).

R.1.3 DEPENDENCIA DE LA ACTIVIDAD HIDROLIZANTE DE Boc-Val-Pro-Arg-NMec DE LA PROTEASA I CON LA TEMPERATURA

La temperatura óptima de la proteasa I a pH 8.5 fue 37° C (fig. 5), a diferencia de lo obtenido con la enzima parcialmente purificada (82), que fue de 60°C.

R.1.4 SEPARACIÓN DEL INHIBIDOR ENDOGENO DE LA PROTEASA I

En las fracciones con actividad enzimática provenientes del DEAE-Sephacel también hay un inhibidor de tripsina endógeno, ya que en esas condiciones la columna no produce una separación completa de la proteasa I y el inhibidor. Con el objeto de comprobar si el inhibidor se había separado de

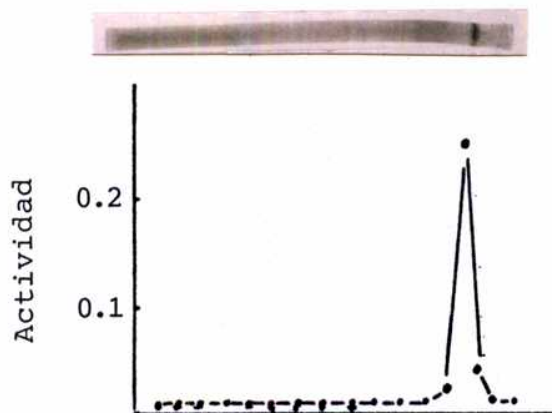


Fig. 3 Electroforésis en geles bajo condiciones no desnaturizantes de la proteasa I: Se sembraron 2 μg de la proteasa purificada en dos geles. Uno de ellos se tiñó con Coomassie Blue y el otro se trató como se detalló en M.6.2.1 y se incubó en 0.2 ml del medio de reacción que contenía buffer Tris-HCl 0.1 M pH 8.5 y 100 μM de Bz-Phe-Val-Arg-NMec (●). Se midió la fluorescencia liberada por la 7-amino-4-metilcumarina (M.5.2) y la actividad se expresó en unidades arbitrarias de fluorescencia.

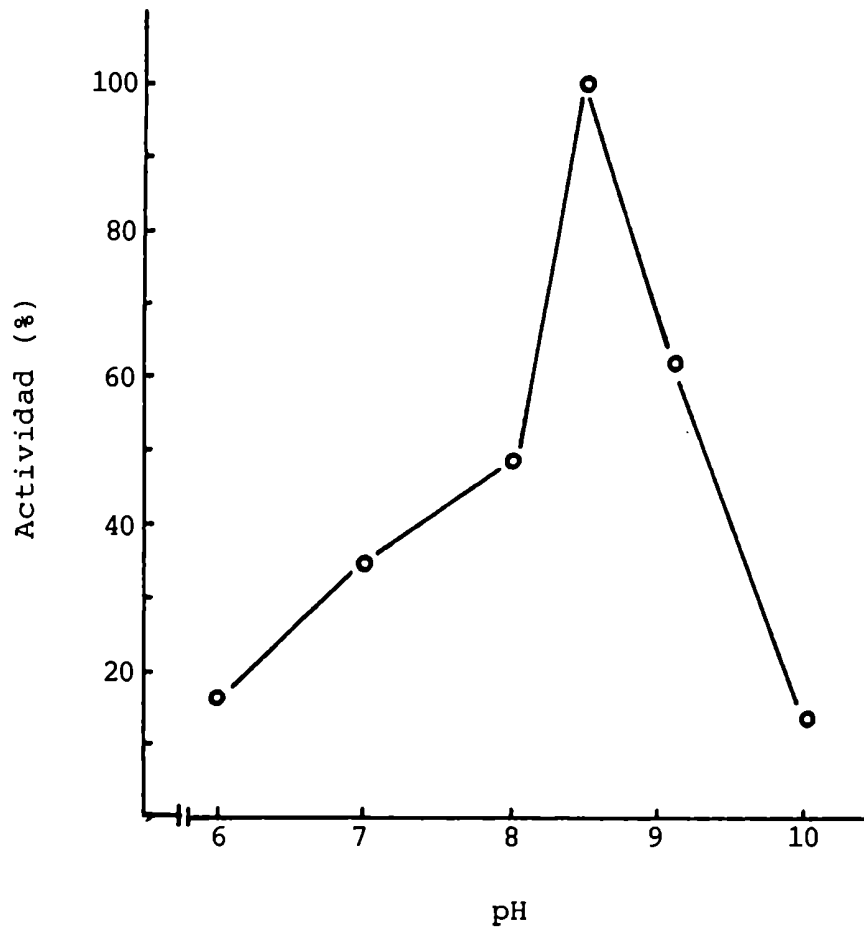


Fig. 4 Dependencia de la actividad hidrolizante de Boc-Val-Pro-Arg-NMec de la proteasa I con el pH. Se midió la actividad a 37°C (M.5.2) empleando en el medio de reacción 0.1 U.E/ml.

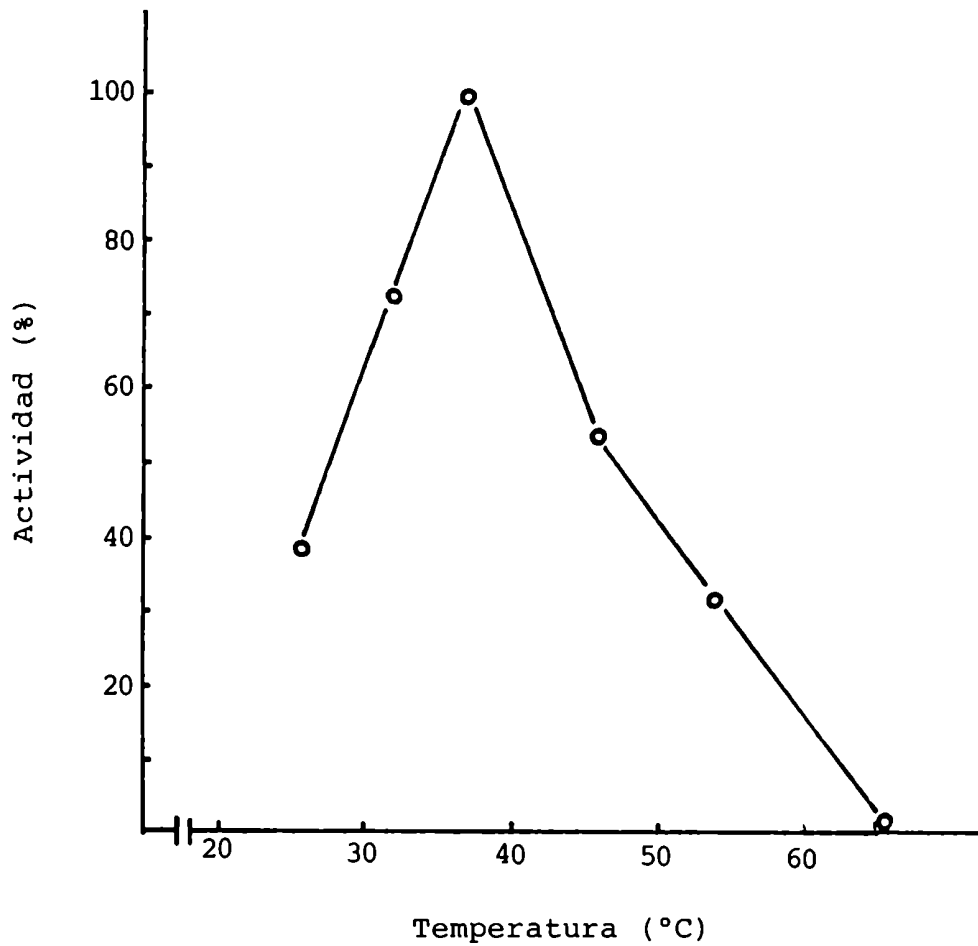


Fig. 5 Dependencia de la actividad hidrolizante de Boc-Val-Pro-Arg-NMec de la proteasa I con la temperatura. Se midió la actividad hidrolizante a pH 8.5 (M.5.2) empleando en el medio de reacción 2.5 U.E/ml.

la enzima al pasar por la columna de Octil-Sepharose CL-4B, se realizó el experimento que se detalla en la tabla 2. Los resultados muestran claramente que el inhibidor se encuentra en la fracción de proteínas que eluyen con el lavado con buffer fosfato 30 mM pH 8.0, mientras que las fracciones que contienen a la enzima carecen de actividad inhibitoria de tripsina.

Cuando se estudió la dependencia de la actividad de la proteasa I obtenida de la columna de DEAE-Sephacel con la temperatura, se encontró que la máxima actividad correspondía a 60°C, pero en esa preparación enzimática también estaba presente el inhibidor endógeno termosensible (82). En la tabla 3, en donde se muestran los valores de actividad específica de la proteasa I medida a 37°C y 60°C a lo largo de las distintas etapas de purificación, se observa que la relación entre la actividad específica a 60°C y 37°C disminuye considerablemente como consecuencia del pasaje de la muestra por la columna de Octil-Sepharose CL-4B y no se modifica por la cromatografía en Arginina-Sepharose 4B. Estas variaciones entre las actividades específicas a las dos temperaturas indicarían que el distinto comportamiento de la proteasa I frente a la temperatura se debe a que la fracción enzimática quedó libre del inhibidor a partir de su paso por la columna hidrofóbica.

R.1.5 ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO

Tabla 2 Determinación del inhibidor endógeno de la proteasa I en las distintas fracciones de la columna de Octil-Sepharose CL-4B

Fracciones de la columna de Octil-Sepharose CL-4B	Actividad de tripsina (%)
----	100
5-23	
27-29	82
38-42	85

Se juntaron las fracciones que se indican en la figura 1 y alícuotas de cada una de ellas se dializaron durante toda la noche contra agua. Se emplearon 165 μ l de cada una de estas fracciones como fuente de inhibidor. La actividad inhibitoria de tripsina se midió como se describió anteriormente (82) pero en un volumen final de 250 μ l.

Tabla 3 Comparación de la actividad específica de la proteasa I medida a 37°C y a 60°C a través de las distintas etapas de purificación

Procedimiento	Actividad específica		Act.esp. 60°C
	$\Delta A_{330}/h \times mg$		-----
	37°C	60°C	Act.esp. 37°C
1-Extracto crudo	0.005	0.03	6.0
2-DEAE-Sephacel	0.3	1.3	4.3
3-Octil-Sepharose	27.8	8.6	0.31
4-Arginina-Sepharose	276.9	105.2	0.38

Se midió la actividad azocaseinolítica como se detalló en la sección M.5.1.

En la tabla 4 puede verse que la proteasa I fue capaz de hidrolizar los derivados 4-metil-7 cumarilamida de péptidos que tienen arginina o lisina adyacente al grupo fluorogénico. En cambio, cuando en esa posición había tirosina no se detectó actividad. Estos resultados indican claramente que la proteasa I tiene capacidad de hidrolizar a sustratos de tripsina pero no a los de quimotripsina. Los sustratos que tenían prolina en la posición F₂ (adyacente a arginina) fueron más rápidamente degradados.

R.I.6 EFECTO DE VARIOS COMPUESTOS QUIMICOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA PROTEASA I

La tabla 5 muestra el efecto de varios inhibidores sobre la actividad de la proteasa I. La enzima fue fuertemente inhibida por leupeptín, aprotinín y TLCK. El PMSF, los inhibidores de tripsina de semillas de soja y de lima y el α_1 -antitripsina inhibieron entre el 30-40% . El elastatinal produjo una leve inhibición mientras que el pepstatín y el p-OHMB no afectaron en absoluto a la actividad. El NEM, CaCl₂ y el EDTA prácticamente no modificaron la actividad de la proteasa I. El comportamiento de esta enzima frente a los distintos compuestos ensayados permite decir que se trata de una serín proteasa.

R.I.7 EXISTENCIA DE LA RED EXOSARCOMERICA DEL CITOESQUELETO EN MUSCULO DE CORVINA.SU DEGRADACION POR PROTEASA I

Tabla 4 Especificidad de sustrato de la proteasa I

Sustrato	Actividad (unidades arbitrarias)
Boc-Val-Pro-Arg-NMec	42.0
Tosyl-Leu-Pro-Arg-NMec	35.4
Boc-Val-Leu-Lys-NMec	20.8
Boc-Phe-Ser-Arg-NMec	13.8
Bz-Phe-Val-Arg-NMec	10.8
Pro-Phe-Arg-NMec	3.8
Glt-Gly-Arg-NMec	3.5
Suc-Ala-Phe-Lys-NMec	1.9
Boc-Ile-Glt-Gly-Arg-NMec	1.4
Bz-Arg-NMec	0.3
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-NMec	0

La hidrólisis de los sustratos fluorogénicos por la proteasa I se midió como se detalló en la sección M.5.2 usando 0.2 U.E/ml.

Tabla 5 Efecto de varios compuestos químicos sobre la actividad de la proteasa I

Reactivo	Concentración	Actividad (%)
Control		100
PMSF	1.0 mM	40
TLCK	1.0 mM	4
Leupeptin	0.5 mg/ml	2
Aprotinin	65 µg/ml	6
SBTI	215 µg/ml	28
LBTI	90 µg/ml	24
α_1 -antitripsina	10 µM	37
elastatinal	10 µM	79
pepstatin A	10 µM	100
p-OHMB	0.5 mM	100
NEM	1.0 mM	87
CaCl ₂	1.0 mM	80
EDTA	1.0 mM	100

La enzima fue preincubada con el reactivo correspondiente durante 15 min a temperatura ambiente previo al agregado del sustrato (6 µl). La actividad de la proteasa I se midió como se detalló en la sección M.5.2 usando Boc-Val-Pro-Arg-Nmec. Se usaron 0.2 U.E/ml.

Uno de los objetivos del trabajo fue el estudio de la acción de las proteasas alcalinas sobre las proteínas musculares.

Previamente en el laboratorio encontramos que la proteasa I degradaba a la miosina aislada y formando parte del complejo actomiosínico (83) y también producía una ruptura completa de la integridad estructural de las miofibrillas, pues degradaba a sus elementos contráctiles y a los constituyentes de la red endosarcomérica del citoesqueleto (84). Por ello se consideró de interés estudiar la acción de la proteasa I sobre la red exosarcomérica del citoesqueleto.

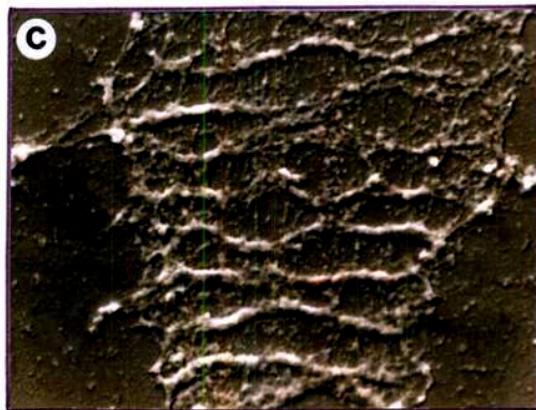
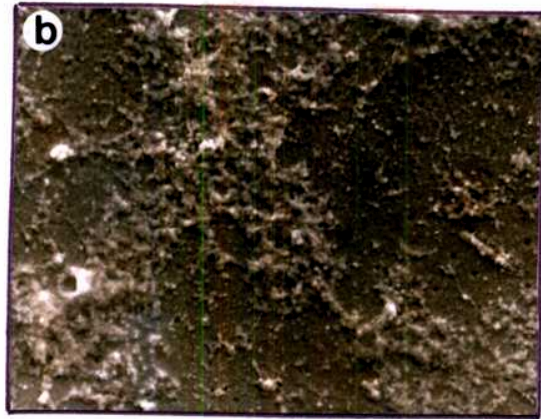
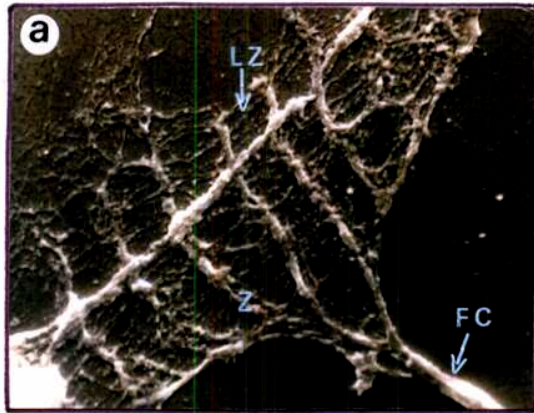
En músculo esquelético de mamíferos se ha descrito la existencia de esta red exosarcomérica, que no puede visualizarse directamente por los métodos convencionales de microscopia electrónica, pero sí después de la extracción de las proteínas contráctiles con soluciones de alta fuerza iónica. La principal función que se ha propuesto para la red es que serviría para integrar mecánicamente todos los eventos contráctiles de una fibra muscular durante el ciclo de contracción-relajación.

En esta parte del trabajo se quiso investigar: 1) la presencia de esa red en músculo esquelético de corvina, ya que si bien parecía razonable que estuviera presente en la mayoría de los músculos estriados de vertebrados, aún no había observaciones microscópicas que mostraran su existencia en el músculo esquelético de pescado y 2) el

efecto de la proteasa I sobre esta red por las implicancias que su degradación podía tener tanto en el músculo vivo como post-mortem.

Las miofibrillas de músculo esquelético de corvina fueron extraídas con una solución de KI 0.6 M, según el método de Wang y Ramírez-Mitchell (211), obteniéndose un residuo en el cual una red de filamentos transversales y longitudinales pudo ser observada en el microscopio electrónico. Las micrografías electrónicas de barrido resultantes se muestran en las figuras 6a y 7a. Se puede ver que las estructuras Z sucesivas están regularmente espaciadas y conectadas por filamentos longitudinales, continuos y paralelos. En esos ordenamientos, que corresponden a varias miofibrillas adyacentes y alineadas lateralmente, y que representan las estructuras más comúnmente observadas en residuos de KI, no fue posible visualizar los puentes interfibrilares que unen miofibrillas contiguas. Sin embargo, esos puentes se observaron en ordenamientos menos frecuentes, como los que aparecen en la figura 7b, en los cuales se ven dos miofibrillas separadas una de otra y unidas por conexiones entre sus estructuras Z .

Otra característica importante de la red, que puede observarse en las figuras 6a y 7b, son las prolongaciones de estructuras Z individuales que se unen en un único filamento (FC), el cual a su vez une las miofibrillas a un cuerpo opaco (CO) al microscopio electrónico. Esas uniones podrían servir como conexión entre sarcómeros y organelas, pudiendo



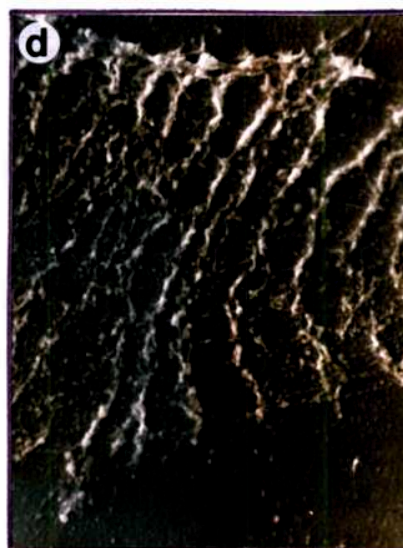
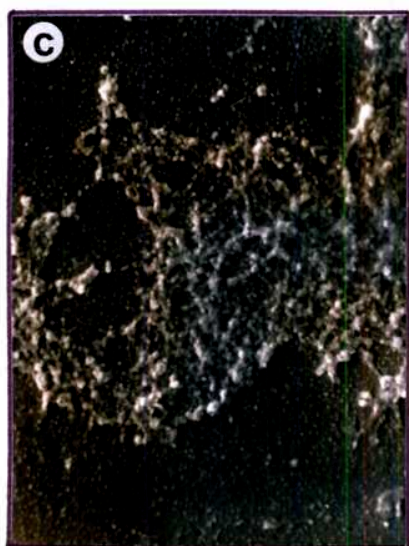


Fig. 6 Micrografías electrónicas de barrido de los residuos de KI, obtenidos de miofibrillas incubadas con la proteasa I a 37°C. Las condiciones de incubación se detallaron en M.7 (a) miofibrillas no incubadas; (b) miofibrillas incubadas 5 min; (c) control de 5 min de incubación. Z: estructuras Z; LZ: filamentos longitudinales uniendo Z a Z; FC: filamentos que conectan las miofibrillas con cuerpos opacos (CO) al microscopio electrónico.
1 cm = 1.6 μ m

Fig. 7 Micrografías electrónicas de barrido de los residuos de KI, obtenidos de miofibrillas incubadas con la proteasa I a 0°C. Las condiciones de incubación se detallaron en M.7 (a) miofibrillas no incubadas; (b) miofibrillas incubadas 3 h; (c) miofibrillas incubadas 6 h; (d) control de 6 h de incubación. TZ: filamentos transversales uniendo Z a Z. Las otras abreviaturas están detalladas en la leyenda de la figura 6.
1 cm = 1.6 μ m

ser la fuente de coordinación de eventos contráctiles individuales en la célula muscular viva (146,214).

En la figura 6b se muestra la micrografía electrónica de barrido del residuo de KI obtenido a partir de las miofibrillas incubadas con la proteasa I a 37°C. Se puede ver que la enzima destruyó completamente la red del citoesqueleto en tan solo 5 min de incubación, sin dejar ninguna estructura visible.

Como en las condiciones descritas anteriormente la destrucción de la red fue tan rápida que no resultó posible encontrar campos con alteraciones parciales, las miofibrillas se incubaron con la misma cantidad de proteasa I pero a 0°C para disminuir la velocidad de proteólisis. En la figura 7b, que corresponde a 3 h de incubación a 0°C, se observa una situación que puede considerarse un estadio temprano de degradación: la miofibrilla superior tiene un alto grado de orden, con sus estructuras Z paralelas e igualmente espaciadas, mientras que la miofibrilla inferior presenta evidentes signos de irregularidad y desorganización. Es importante destacar que la integridad de los filamentos longitudinales es mayor en la miofibrilla superior, lo cual concordaría con las funciones asignadas a esos filamentos en contribuir a mantener la organización espacial de la miofibrilla (211). Cuando las miofibrillas se incubaron con la proteasa I a 0°C durante 6 h, ocurrió una ruptura completa de la red del citoesqueleto (fig. 7c).

Incubar las miofibrillas con la proteasa I durante 5 min a 37 °C, fue suficiente para causar una completa ruptura de la red exosarcomérica. Sin embargo, la comparación de los perfiles electroforéticos de las proteínas miofibrilares totales antes y después de dicha incubación indica que los cambios en las proteínas endosarcoméricas no fueron tan drásticos y mientras que actina y α -actinina no se modificaron, se observó una degradación parcial de algunas proteínas (cadenas pesadas y livianas de miosina, titina y nebulina), y una degradación más intensa de troponina T, tropomiosina y la cadena liviana LC₃ (fig. 8a, tabla 6). Las miofibrillas que tienen ese perfil electroforético preservan sus principales características ultraestructurales endosarcoméricas (fig 1c en ref. 84), lo que sugiere que el desarmado de la red exosarcomérica del citoesqueleto es un evento temprano en la acción de la proteasa I sobre las miofibrillas. Un resultado similar se obtuvo cuando las proteínas miofibrilares totales se analizaron en geles bajo condiciones desnaturalizantes luego de 6 h de incubación a 0°C (no mostrado).

La composición exacta de los filamentos del citoesqueleto no se conoce, pero se sabe que son químicamente heterogéneos y que tienen como componente principal a la desmina (142,211). La figura 8b muestra los geles de las proteínas miofibrilares totales incubadas con proteasa I durante 5 min a 37°C, teñidos con nitrato de plata. Se puede observar que la banda correspondiente a desmina no se modi-

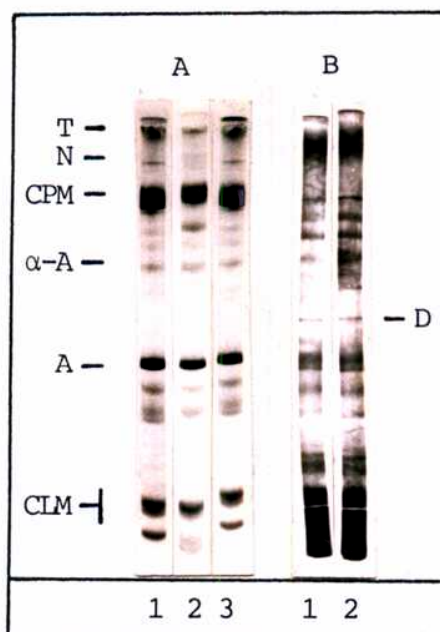


Fig. 8 Electroforésis en geles bajo condiciones desnaturalizantes de miofibrillas incubadas con la proteasa I a 37 ° C. Las condiciones de incubación se detallaron en M.7. Los geles se tifieron con (A) Coomassie blue y (B) nitrato de plata.

(1) miofibrillas no incubadas; (2) miofibrillas incubadas con la proteasa I durante 5 min; (3) miofibrillas incubadas sin proteasa I durante 5 min.

T: titina; N: nebulina; CPM: cadenas pesadas de miosina; α-A: α-actinina; D: desmina; A: actina; Tn T: troponina T; Tm: tropomiosina; CLM: cadenas livianas de miosina.

Tabla 6 Análisis densitométricos de miofibrillas incubadas con proteasa I a 37°C

Banda	Area (unidades arbitrarias)		Degradación (%)
	no incubadas	incubadas	
Titina	72	57	21
Nebulina	36	20	44
CPM	449	356	21
α -Actinina	38	39	0
Actina	459	402	12
Troponina T	99	55	45
Tropomiosina	167	84	50
LC ₁₊₂	225	168	25
LC ₃	129	50	61
Total	1674	1231	26

Los geles teñidos con Coomasie Blue de las miofibrillas no incubadas (Fig. 8a, línea 1) e incubadas con la proteasa I durante 5 minutos (Fig. 8a, línea 2) fueron destañidos exhaustivamente y analizados densitometricamente.

ficó con la incubación. Ese resultado, que fue confirmado por análisis densitométrico de los geles, sugiere que alguna otra proteína minoritaria aún no identificada sería el blanco de acción primario de la proteasa I sobre los filamentos del citoesqueleto.

Los análisis electroforéticos de los residuos de KI de las miofibrillas de músculo de conejo dan una información limitada de la composición del citoesqueleto, debido a la translocación de otros componentes miofibrilares a las estructuras Z (211). A pesar de ello se intentó solubilizar los residuos de KI de las miofibrillas de pescado para su posterior análisis electroforético. Sin embargo, dichos residuos mostraron una fuerte tendencia a agregarse y resultó imposible su solubilización a pesar de los varios tratamientos intentados (84,145,211,215-216). Por esa razón, no se han realizado sus análisis electroforéticos.

PROTEASA II

R.II.1 EFFECTO DEL SDS Y ACIDOS GRASOS SOBRE LA CURVA DE TEMPERATURA DE LA PROTEASA II

Con anterioridad habíamos informado de la presencia en músculo de corvina de una tiol proteasa llamada II. La actividad azocaseinolítica de esa enzima era máxima a 60°C e indetectable a temperaturas por debajo de 50°C (82). En peces de agua dulce y salada se habían descrito proteasas con propiedades similares que sufrían un corrimiento de su temperatura óptima en presencia de urea y radiaciones gama (172). Cuando se realizó la curva de temperatura de la proteasa II en presencia de SDS y ácidos grasos hubo un corrimiento de la actividad hacia el lado de menores temperaturas, desapareciendo totalmente la actividad a 60°C (fig.9). En todos los casos ensayados la máxima actividad se logró entre 37°C-45°C. Con los ácidos palmitoleico y linolénico se obtuvo una temperatura óptima de 37°C y considerable actividad a 30°C, mientras que en presencia de ácido mirístico y SDS la temperatura óptima fue de 45°C y la actividad a 30°C indetectable.

R.II.2 ACTIVACION DE LA PROTEASA II POR SDS

La estimulación de la proteasa II con SDS a 37°C ocurrió en un rango estrecho de concentraciones de dicho compuesto, hallándose la máxima activación a 3.4 mM (fig.10). Cuando las mediciones se realizaron en presencia

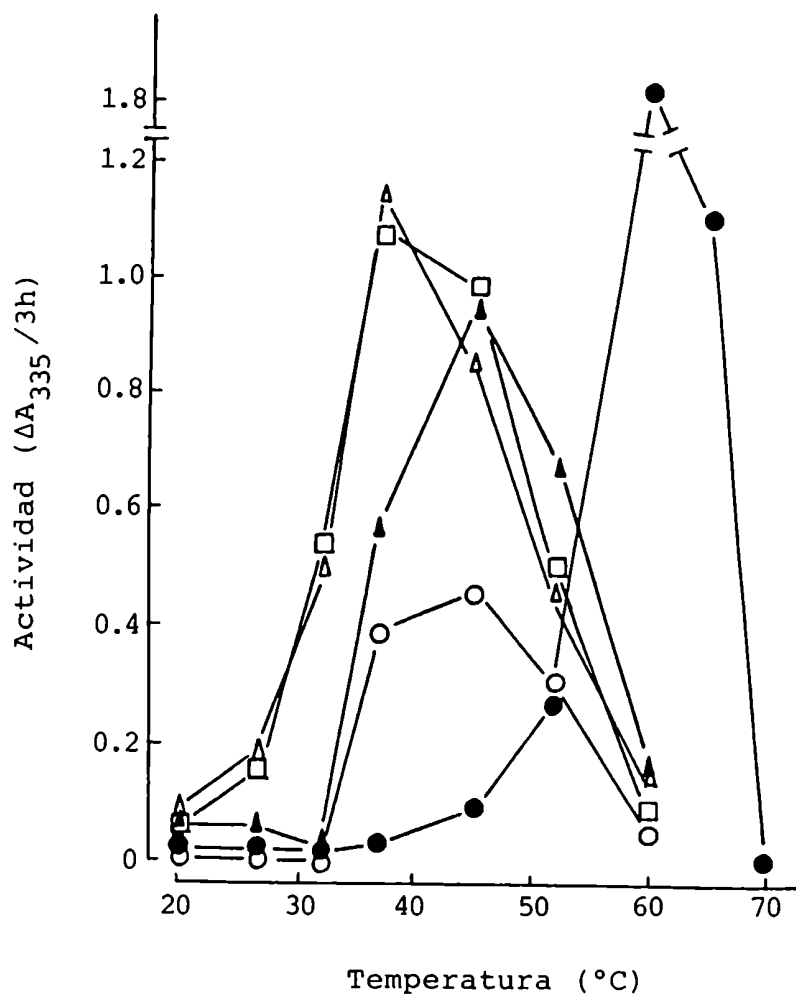


Fig. 9 Efecto del SDS y ácidos grasos sobre la curva de temperatura de la proteasa II. Se midió la actividad azocaseinolítica (M.5.1) a las temperaturas indicadas, con una preparación enzimática parcialmente purificada (82). El medio de reacción contenía 0.6 U.E./ml. La actividad se expresó como $\Delta A_{335}/3\text{ h}$ en sobrenadantes de TCA 5 %.(●) Control; (▲) con ácido mirístico 5 mM; (◻) con ácido palmítico 4 mM; (△) con ácido linolénico 3 mM; (○) con SDS 3mM.

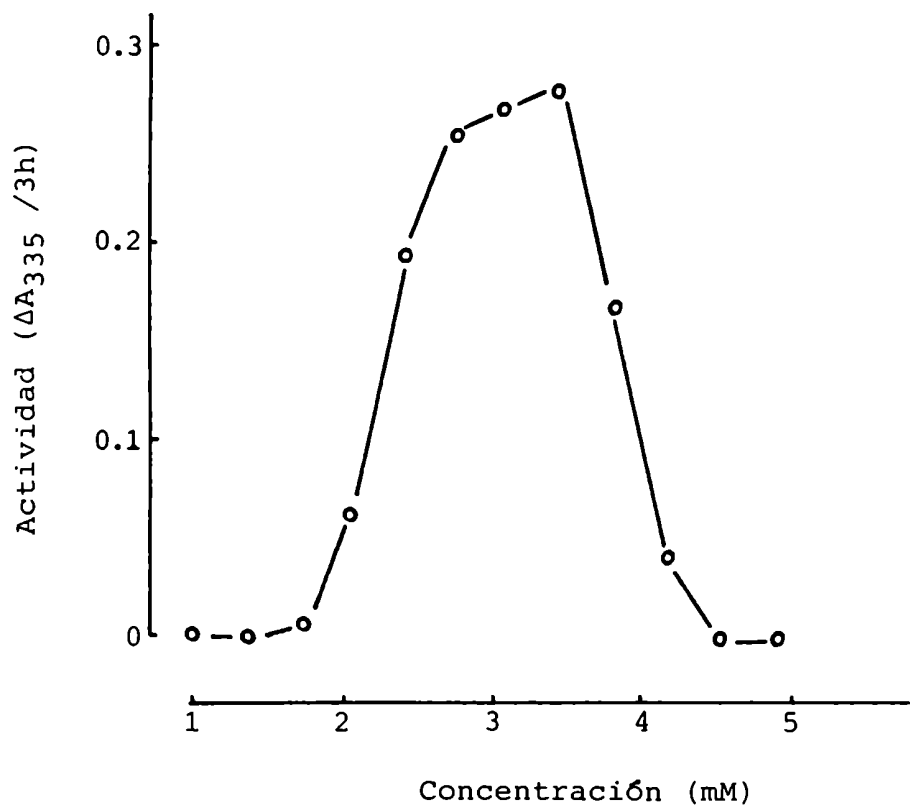


Fig. 10 Activación de la proteasa II por SDS. Se midió la actividad azocaseinolítica (M.5.1) a 37°C, en presencia de distintas concentraciones de SDS, con una preparación enzimática parcialmente purificada (82). El medio de reacción contenía 0.3 U.E./ml. La actividad se expresó como $\Delta A_{335} / 3h$.

de 2-MCE 5 mM para ver si se modificaba el $A_{0.5}$ (concentración a la cual se produce el 50 % de activación) la curva obtenida fue igual a la anterior.

Previamente habíamos informado que el pH óptimo para la degradación de azocaseína por proteasa II era 9.0 (82). Sin embargo cuando se realizó la curva de pH en presencia de SDS a una concentración activante, se observó que el pH óptimo de la proteasa II era 8.0 (fig. 11).

R.II.3 ACTIVACION DE LA PROTEASA II POR ACIDOS GRASOS

Se estudió el efecto de distintas concentraciones de ácidos grasos (moléculas estructuralmente semejantes al SDS) sobre la actividad de la proteasa II. La dependencia de la activación con la concentración fue esencialmente la misma con todos los ácidos grasos ensayados (fig. 12 y 13). En todos los casos, la activación se observó a concentraciones superiores a 2 mM; la mayoría de los ácidos grasos produjo la máxima activación a 4-5 mM. Cuando la curva de activación por ácido mirístico se realizó en presencia de 2-MCE 1 ó 10 mM, no hubo modificaciones en el $A_{0.5}$, al igual que en el caso del SDS.

En la figura 12 se muestra que cuando se ensayó la influencia del ácido oleico y su isómero trans, el ácido elaidico, sobre la actividad de la proteasa II, únicamente hubo activación con el ácido graso en la forma cis. Dado que en la naturaleza sólo se encuentran ácidos grasos cis

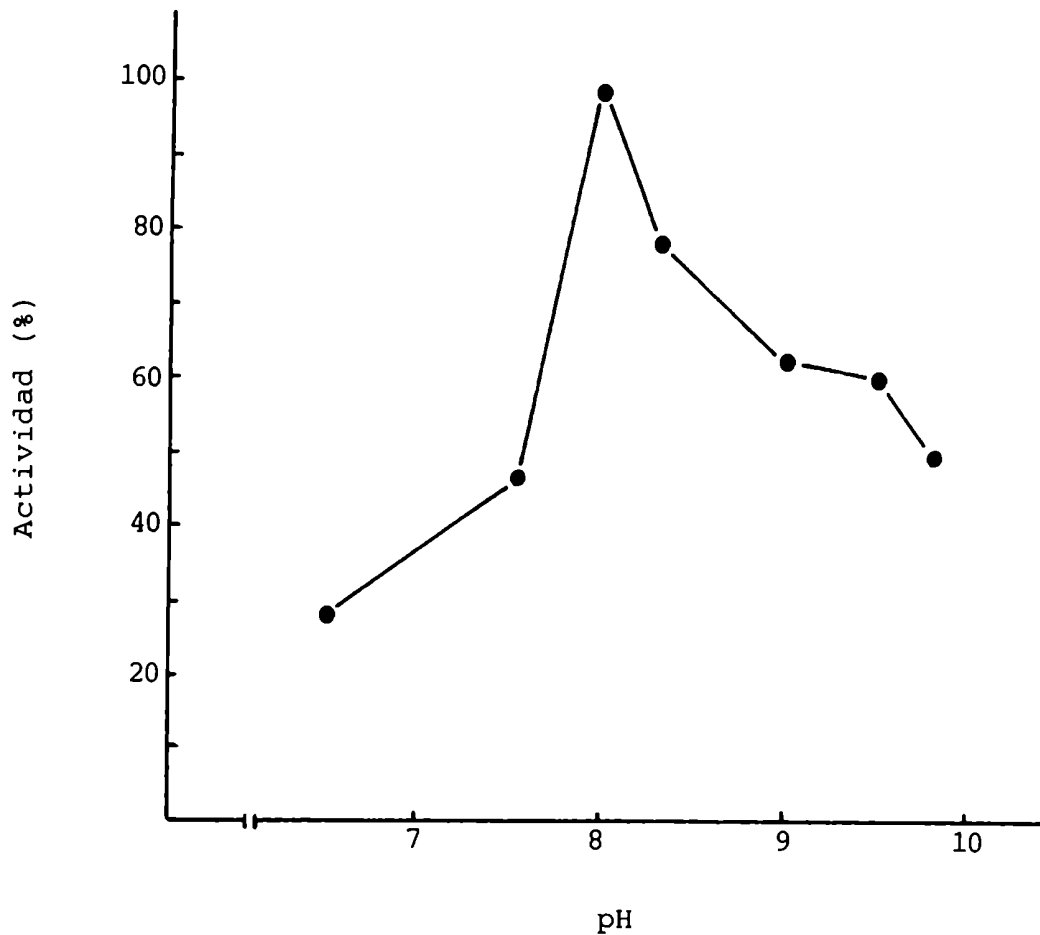


Fig. 11 Dependencia de la actividad proteolítica de la proteasa II con el pH en presencia de SDS. Se midió la actividad azocaseinolítica (M.5.1) a 37°C, en presencia de SDS 3.4 mM, con una preparación enzimática parcialmente purificada (82). El medio de reacción contenía 0.3 U.E./ml. Se usaron los siguientes buffers según el rango de pH utilizado: fosfato pH 6.0 a 7.0; Tris-HCl pH 7.5 a 9.0; borato pH 9.5 a 10.

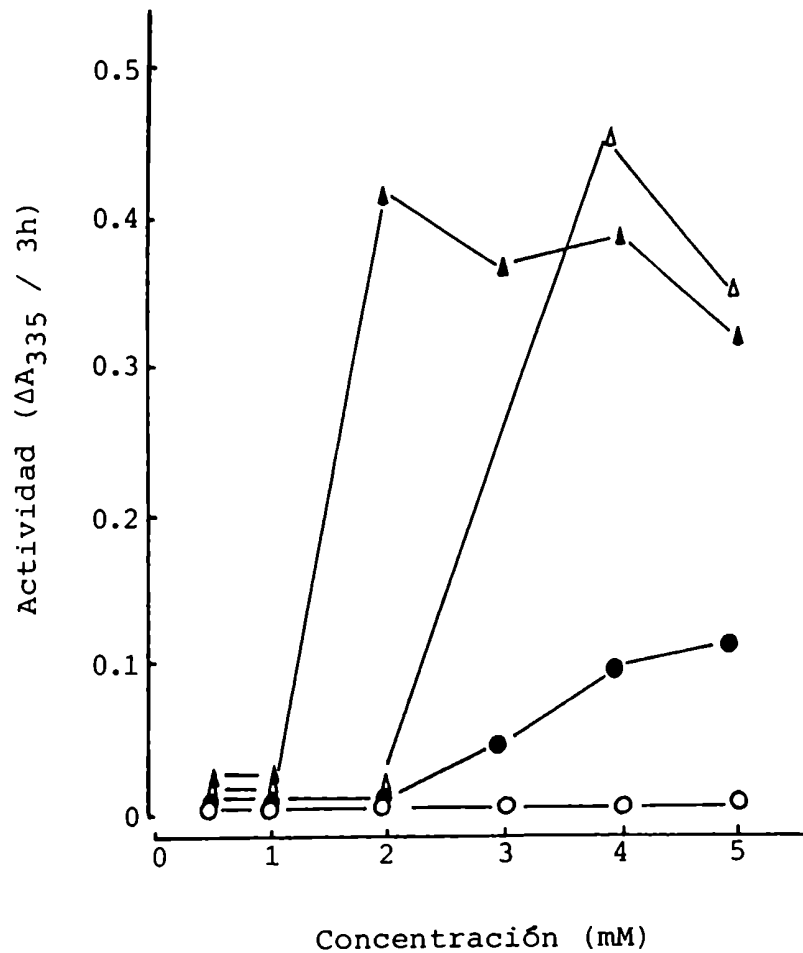


Fig. 12 Activación de la proteasa II por ácidos grasos saturados y monoinsaturados. Se midió la actividad azocaseinolítica (M.5.1) a las concentraciones indicadas de ácidos grasos, con una preparación enzimática parcialmente purificada (82). El medio de reacción contenía 0.3 U.E./ml. La actividad se expresó como $\Delta A_{335}/3$ h en sobrenadantes de TCA 5%. (▲) ácido mirístico; (△) ácido palmítoleico; (●) ácido oleico; (○) ácido eláidico.

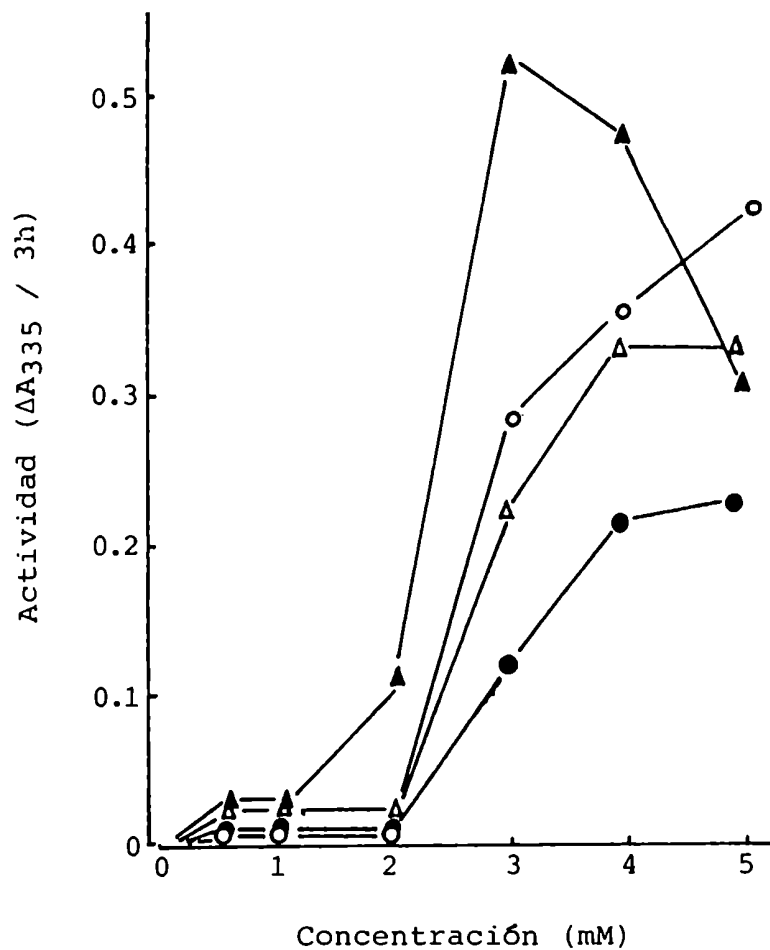


Fig. 13 Activación de la proteasa II por ácidos grasos poliinsaturados. Se midió la actividad azocaseinólítica (M.5.1) a las concentraciones indicadas de ácidos grasos, con una preparación enzimática parcialmente purificada (82). El medio de reacción contenía 0.3 U.E./ml. La actividad se expresó como $\Delta A_{335}/3\text{ h}$ en sobrenadantes de TCA 5%. (○) ácido linoleico; (▲) ácido linolénico; (●) ácido araquidónico; (△) ácido 5,8,11,14,17 eicosapentaenoico.

parece que dicha estimulación podría tener importancia fisiológica.

El efecto activante de los ácidos grasos se observó usando como sustratos los derivados 4-metil-7 cumarilamida de péptidos con el amino terminal bloqueado como se mostrará más adelante, lo que permite descartar que la activación se deba a un efecto de los ácidos grasos sobre la azocaseína.

Si bien el ácido mirístico activó a la proteasa II, cuando se usó el metil derivado de dicho ácido no se observó estimulación alguna, lo que sugiere que tanto el anión hidrofílico (grupo carboxilo) como la cadena hidrocarbonada no polar serían necesarios para el efecto estimulante de los ácidos grasos.

R.II.4 EFECTO COMPARATIVO DE LOS ACIDOS GRASOS Y DEL SDS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA PROTEASA II

En la tabla 7 se muestra el efecto de distintos ácidos grasos y del SDS sobre la actividad de la proteasa II a las concentraciones que producen máxima activación. Se observa que el único ácido graso saturado que produjo una activación considerable fue el ácido mirístico, mientras que todos los ácidos grasos insaturados ensayados estimularon fuertemente su actividad.

R.II.5 PURIFICACION DE LA PROTEASA II

Tabla 7 Efecto comparativo de diferentes ácidos grasos y SDS sobre la actividad de la proteasa II

Compuesto	Concentración (mM)	Actividad ($\Delta A_{335}/3h$)
Ninguno		0
12:0	5	0.05
14:0	2	0.04
16:0	5	0.07
18:0	5	0.02
20:0	5	
16:1 (n-7)	4	0.46
18:1 (n-9)	5	0.14
18:2 (n-6)	5	0.43
18:3 (n-3)		0.54
20:4 (n-6)	5	0.26
20:5 (n-3)	5	0.30
22:6 (n-3)	5	0.32
SDS	3.4	0.30

La actividad proteolítica (M.5.1) fue determinada a 37°C en presencia de ácidos grasos y SDS a la concentración que producen mayor estimulación. Se usaron 0.3 U.E/ml de enzima.

En varios tejidos de mamíferos se ha descrito la presencia de proteasas de alto peso molecular, llamadas enzimas multicatalíticas en función de dos criterios: 1) poseen al menos especificidad por dos tipos de unión peptídica y 2) varios compuestos tienen efecto diferencial sobre cada uno de ambos tipos de actividad (118).

La proteasa II comparte ciertas propiedades con algunas de las enzimas multicatalíticas descritas, tales como el peso molecular elevado y la activación por ácidos grasos. Con el propósito de determinar si esta enzima correspondía a las llamadas multicatalíticas, se hizo necesario llevar a cabo su purificación a homogeneidad como etapa previa que garantizara que si había dos actividades distintas correspondían a una misma molécula y no a la presencia de dos enzimas con especificidad diferente.

La proteasa II fue purificada en tres pasos cromatográficos: DEAE-Sephacel (82), Fenil-Sepharose CL-4B (fig. 14) y Sephacryl S-300 (fig. 15). Los perfiles de elución fueron altamente reproducibles en diferentes preparaciones. Los resultados de una purificación típica se muestran en la tabla 8. Se logró una purificación de 361 veces con un rendimiento del 22% .

En la figura 16a se observa el perfil electroforético de la proteasa II bajo condiciones no desnaturalizantes. La enzima fue purificada a homogeneidad aparente ya que migró como una única banda bien estrecha. El resultado anterior se

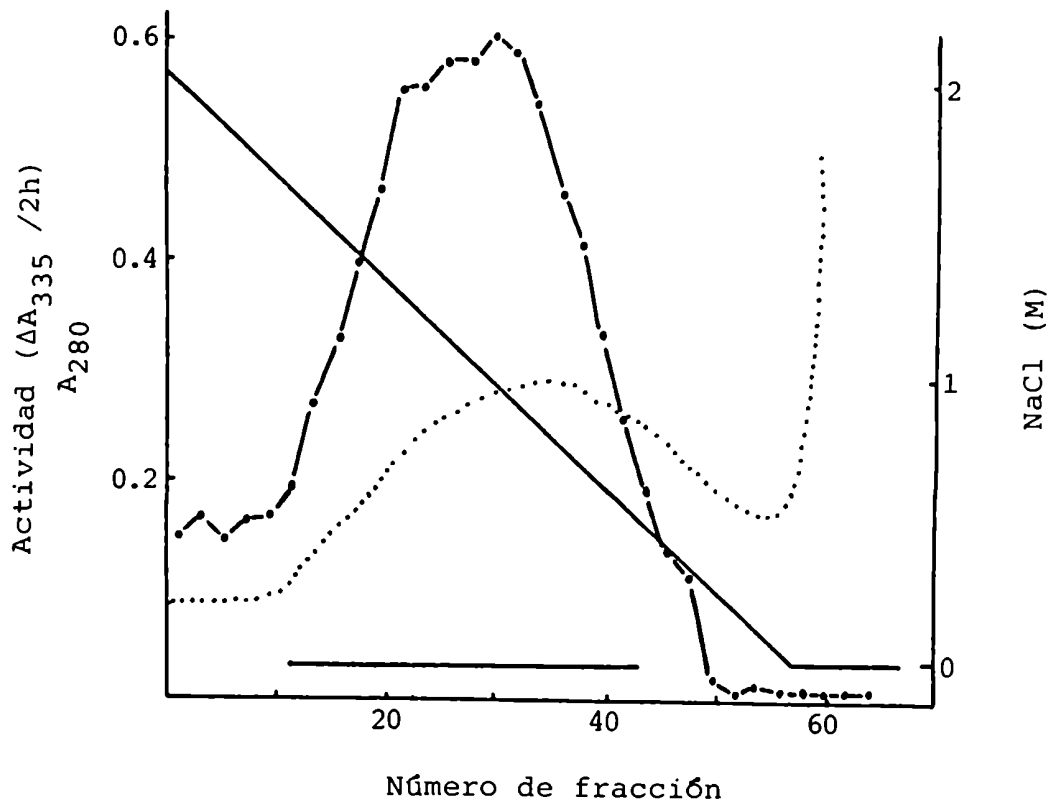


Fig. 14 Cromatografía en Fenil-Sepharose CL-4B de la proteasa II obtenida de una columna de DEAE-Sephacel. Las condiciones de preparación de la muestra y corrida cromatográfica se detallaron en la sección M.4. Se midió la actividad azocaseinolítica (●) como se describió en M.5.1, usando 10 μ l de fracción como fuente de enzima. A₂₈₀ (···). La barra debajo del pico indica las fracciones que se juntaron.

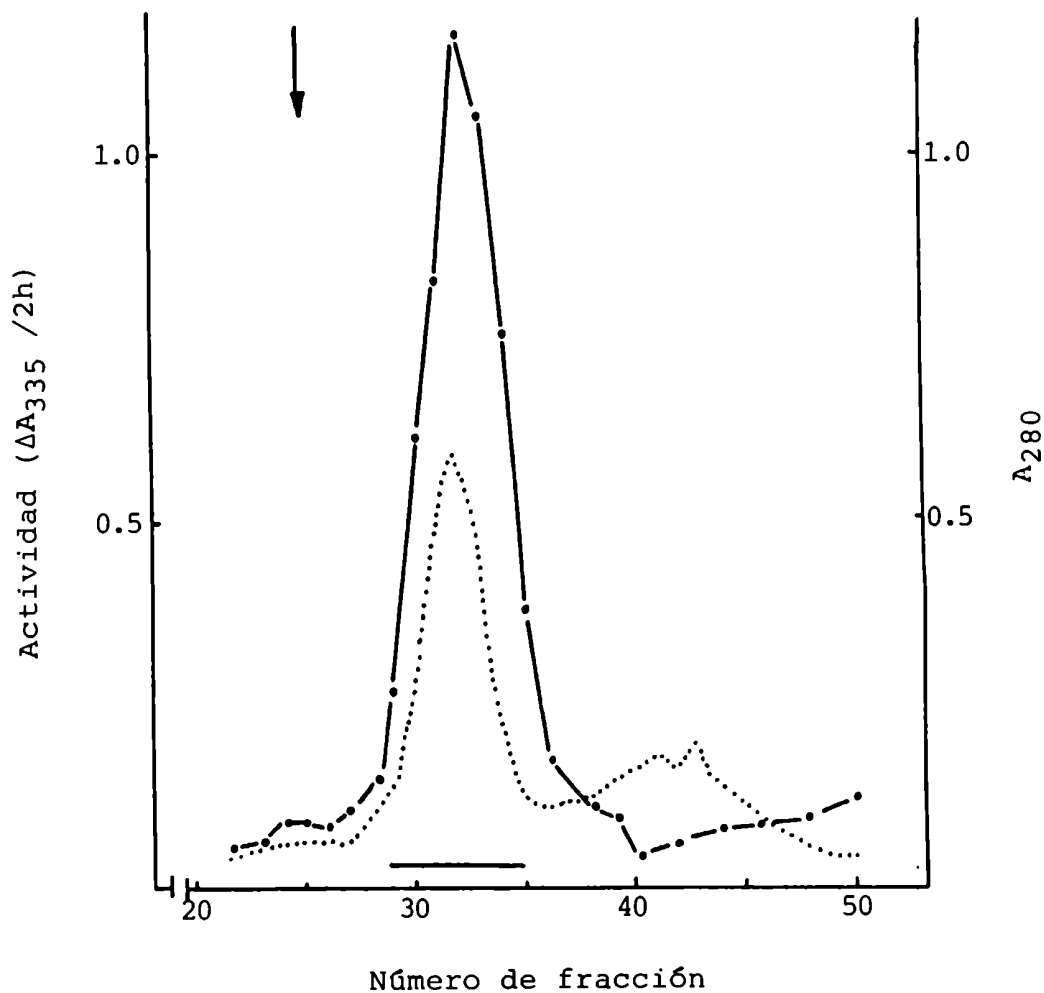


Fig. 15 Gel filtración en Sephacryl S-300 de la proteasa II obtenida de una columna de Fenil-Sepharose CL-4B. Las condiciones de preparación de la muestra y corrida cromatográfica se detallaron en la sección M.4. Se midió la actividad azocaseinolítica (●) como se describió en M.5.1, usando 10 μ l de fracción como fuente de enzima. A₂₈₀ (···). La barra debajo del pico indica las fracciones que se juntaron.

Tabla 8 Purificación de la proteasa II

Procedimiento	Vol. (ml)	Prot. (mg/ml)	Act. (U/ml)	Act.Total (U)	Act.Esp. (U/mg)	Rend. (%)	Purif. (veces)
1-Extracto crudo	550	22.0	5.1	2805	0.23	100	1
2-DEAE-Sephacel	64	2.1	25.5	1632	12.1	58	52
3-Fenil-Sepharose CL 4B	53	0.36	18.5	981	51.4	35	223
4-Sephacryl S-300	13	0.57	47.3	615	83.0	22	361

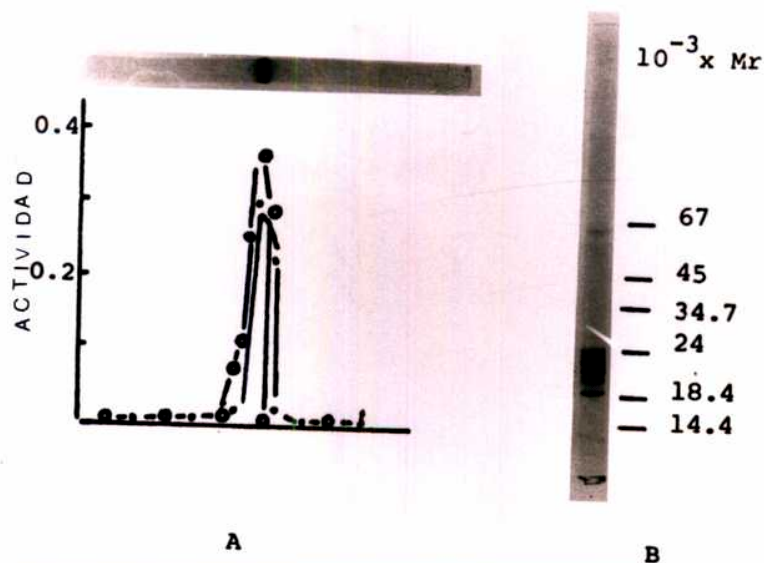


Fig. 16 Análisis electroforético de la proteasa II.

(a) En geles bajo condiciones no desnaturizantes. Se sembraron 10 μg de proteasa II purificada en tres geles. Uno fue teñido para proteínas. Los otros dos se trataron como figura en la sección M.6.2.1 y se incubaron en medios de reacción conteniendo buffer Tris-HCl 0.1 M pH 9.0 y 25 μM de Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-NMec (○) o 50 μM de Z-Gly-Gly-Arg-NMec (●). Se midió la fluorescencia liberada por la 7-amino-4-metilcumarina (M.5.2) y la actividad se expresó en unidades arbitrarias de fluorescencia.

(b) En geles bajo condiciones desnaturizantes. Se sembraron 10 μg de proteasa II purificada.

refuerza por el hecho de que al realizar el test de Ouchterlony (217) usando anticuerpos contra la proteasa II purificada se obtuvo una única banda de precipitación bien definida (fig. 17).

Cuando la enzima se sometió a electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes, se disoció en un grupo de subunidades con pesos moleculares en el rango 18000-26000 y una subunidad mayor de peso molecular 60000.

R.II.6 ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO

En la tabla 9 se puede ver que la proteasa II fue capaz de hidrolizar los derivados 4-metil-7 cumarilamida de péptidos con el extremo amino terminal bloqueado que tienen un aminoácido aromático o un residuo arginina adyacente al grupo fluorogénico indicando que la enzima presenta actividades de tipo tripsina y quimotripsina. Esta misma conclusión también se puede obtener de la figura 16a.

R.II.7 EFFECTO DE LOS ACIDOS GRASOS Y DE DETERGENTES SOBRE LA PROTEASA II PURIFICADA

En los ensayos preliminares, se había observado que la actividad azocaseinolítica de la proteasa II parcialmente purificada, era activada por ácidos grasos y SDS (R.II.2 al R.II.4). En esta parte del trabajo se decidió estudiar el efecto de estos compuestos sobre las actividades

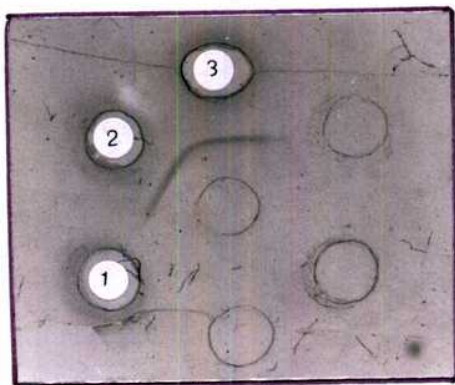


Fig. 17 Método de Duchterlony. Se sembraron 3 μg de la proteasa II purificada en el orificio central, 5 μl de suero preinmune en el orificio 1 y 5 μl de suero obtenido 20 días después de la primera inmunización en los orificios 2 y 3. El portaobjeto se mantuvo en cámara húmeda durante 24 horas. La placa se lavó sucesivamente por inmersión en solución salina y agua destilada. Previa desecación de la misma se coloreó con Coomasie Blue.

Tabla 9 Especificidad de sustrato de la proteasa II

Sustrato	Actividad (unidades arbitrarias)
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-NMec	17.5
Suc-Ala-Ala-Phe-NMec	3.9
Bz-Phe-Val-Arg-NMec	1.9
CBz-Gly-Gly-Arg-NMec	0.6

La hidrólisis de los sustratos fluorogénicos por la proteasa II se midió como se detalló en la sección M.5.2

hidrolizantes de Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-NMec y Bz-Phe-Val-Arg-NMec usando la enzima purificada a homogeneidad aparente.

En la figura 18 se observa que los ácidos palmitoleico y linoleico estimularon la actividad hidrolizante de Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-NMec de la enzima en el rango milimolar de concentraciones de dichos efectores. La forma de las dos curvas fue similar, pero la estimulación producida por el ácido palmitoleico (9 veces a 1 mM) fue mayor que la provocada por el ácido linoleico (4 veces a 1 mM). Cuando la proteasa II se analizó por electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes y no desnaturalizantes después de incubarla en el medio de reacción con y sin sustrato y en presencia o ausencia de ácido linoleico, los perfiles obtenidos fueron idénticos a los de la enzima no incubada indicando que la enzima no sufre un proceso de autólisis durante la activación.

Contrariamente a la estimulación de la actividad hidrolizante de Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-NMec que ocurrió en presencia de ácidos grasos, cuando se estudió el efecto de los ácidos palmitoleico y linoleico sobre la actividad hidrolizante de Bz-Phe-Val-Arg-NMec de la enzima se encontró que ambos ácidos grasos tenían un efecto fuertemente inhibitorio y que el grado de inhibición dependía de la concentración de los mismos (fig. 19).

La actividad hidrolizante de Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-NMec de la proteasa II también fue estimulada, aunque en menor extensión, por SDS (fig. 20). En la misma figura se observa

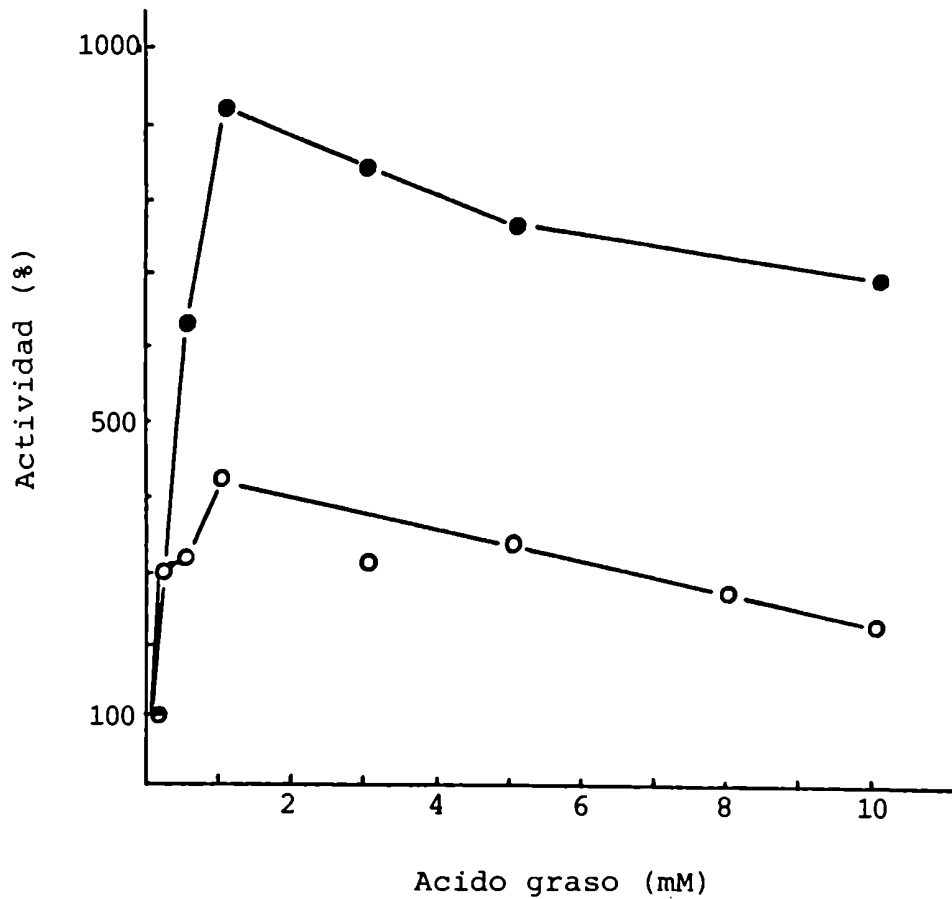


Fig. 18 Efecto de los ácidos grasos sobre la actividad hidrolizante de Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-NMec de la proteasa II. Se midió la actividad (M.5.2) empleando en el medio de reacción 1.8 U.E./ml de la enzima purificada, en presencia de las concentraciones indicadas de los ácidos palmitoleico (●) y linoleico (○).

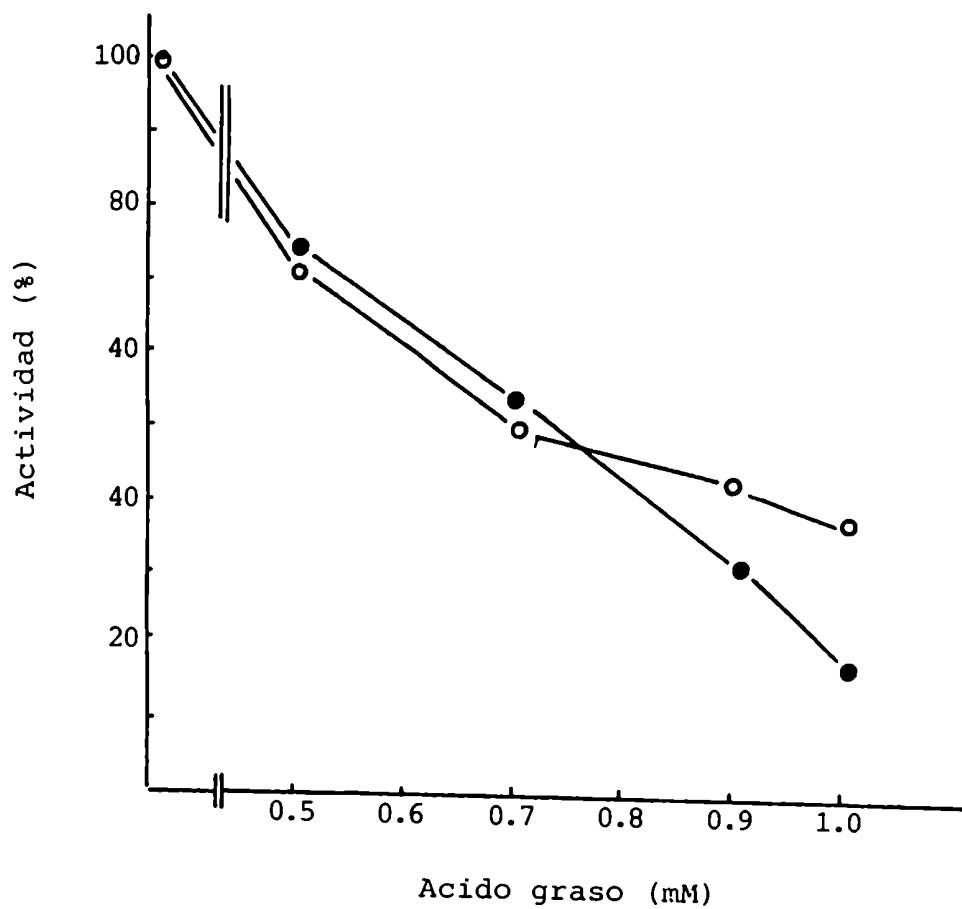


Fig. 19 Efecto de los ácidos grasos sobre la actividad hidrolizante de Bz-Phe-Val-Arg-NMec de la proteasa II. Se midió la actividad (M.5.2) empleando en el medio de reacción 11.3 U.E./ml de la enzima purificada, en presencia de las concentraciones indicadas de los ácidos palmitoleico (●) y linoleico (○).

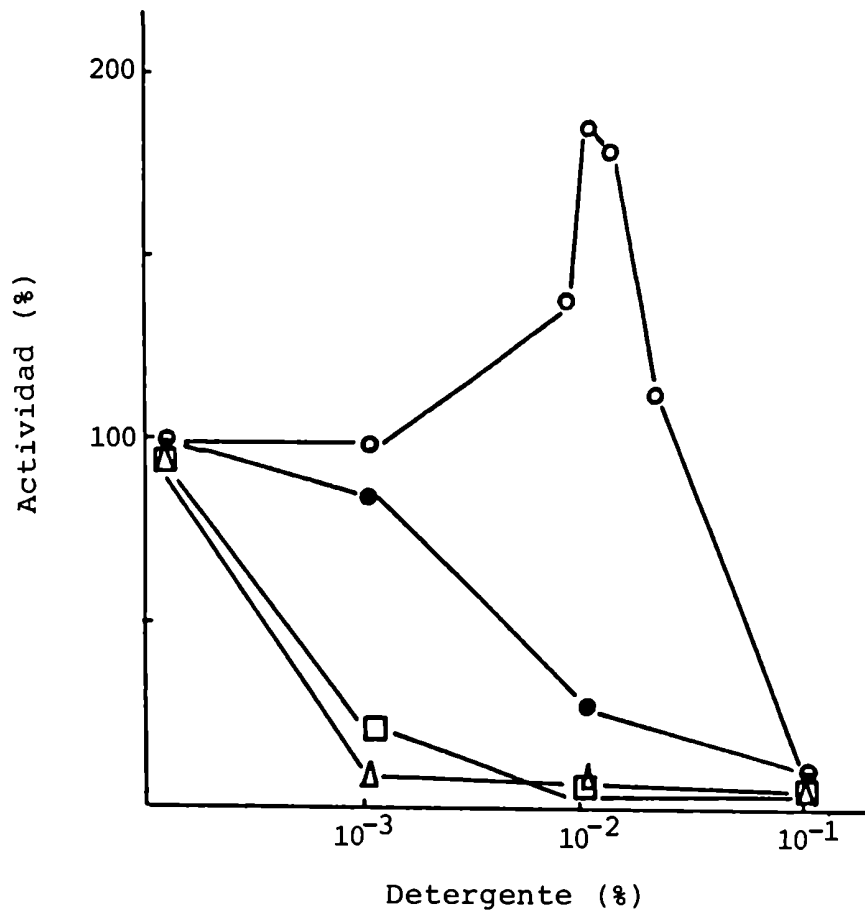


Fig. 20 Efecto de los detergentes sobre las actividades de la proteasa II. Se midió la actividad hidrolizante de Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-NMec (M.5.2) en presencia de SDS (●); CTAB (△) y Tritón X-100 (□), y la actividad hidrolizante de Bz-Phe-Val-Arg-NMec (M.5.2) en presencia de SDS (●), a las concentraciones indicadas. Los medios de reacción contenían 1.8 y 11.3 U.E./ml respectivamente.

que, al igual que los ácidos grasos, el SDS inhibió la actividad hidrolizante de Bz-Phe-Val-Arg-NMec de la proteasa II. Por otra parte, bajas concentraciones de un detergente no iónico (Tritón X-100) y otro catiónico (CTAB) fueron fuertes inhibidores de esa actividad. Esto confirma el hecho que la presencia tanto de una larga cadena hidrofóbica como de un anión hidrofílico son necesarios para la activación.

R.II.8 CURVA DE pH

Cuando se estudió la dependencia de la actividad con el pH usando como sustratos Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-NMec y Bz-Phe-Val-Arg-NMec, en ambos casos se vió que el pH óptimo era 8.9. La forma de las curvas fue esencialmente la misma hasta pH 8.9, pero por encima de ese pH la actividad hidrolizante de Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-NMec cayó bruscamente (fig. 21).

R.II.9 CURVA DE TEMPERATURA

Se realizaron las curvas de actividad en función de la temperatura usando como sustratos Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-NMec (fig. 22) y Bz-Phe-Val-Arg-NMec (fig. 23). En ambos casos la temperatura óptima fue 60°C, pero se encontró que a esa temperatura la actividad dejó de ser lineal a los pocos minutos de incubación, mientras que a las otras temperaturas la linealidad se mantuvo por un periodo superior a 20 min

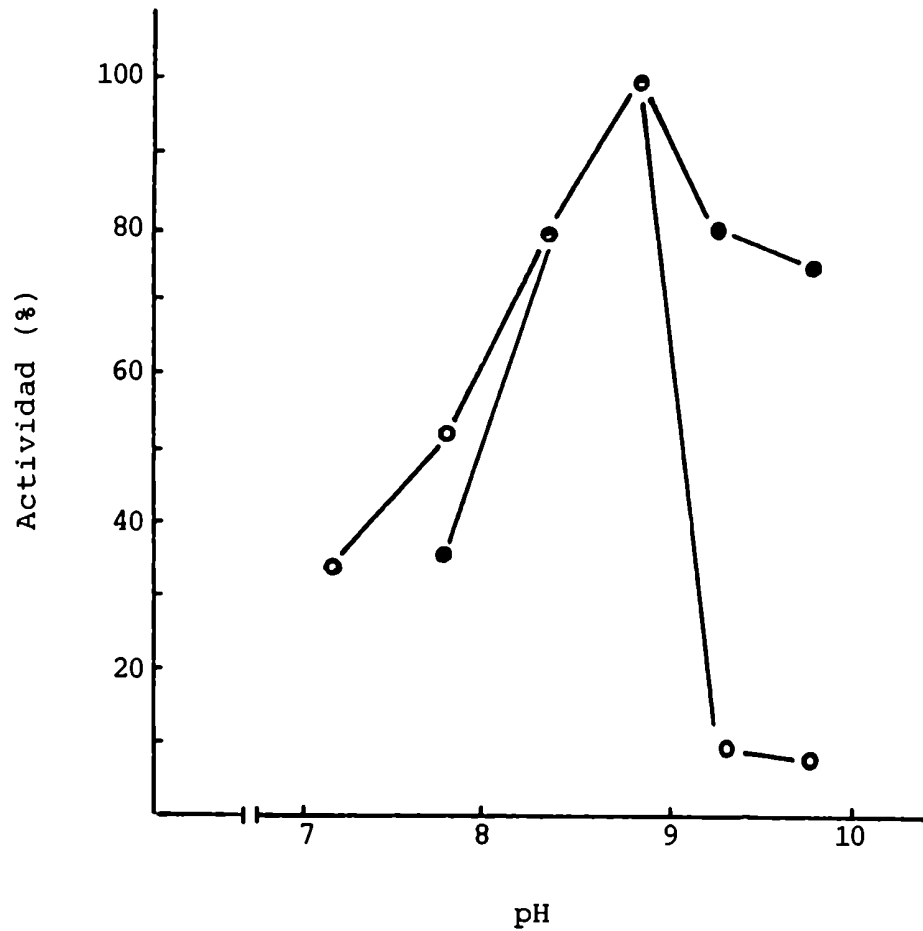


Fig. 21 Dependencia de las actividades de la proteasa II con el pH. Se midieron las actividades hidrolizantes de Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-NMec (○) y de Bz-Phe-Val-Arg-NMec (●) según se detalló en la sección M.5.2 empleando en el medio de reacción 1.8 y 11.3 U.E./ml respectivamente de la enzima purificada. Ver fig. 11 para los buffers utilizados.

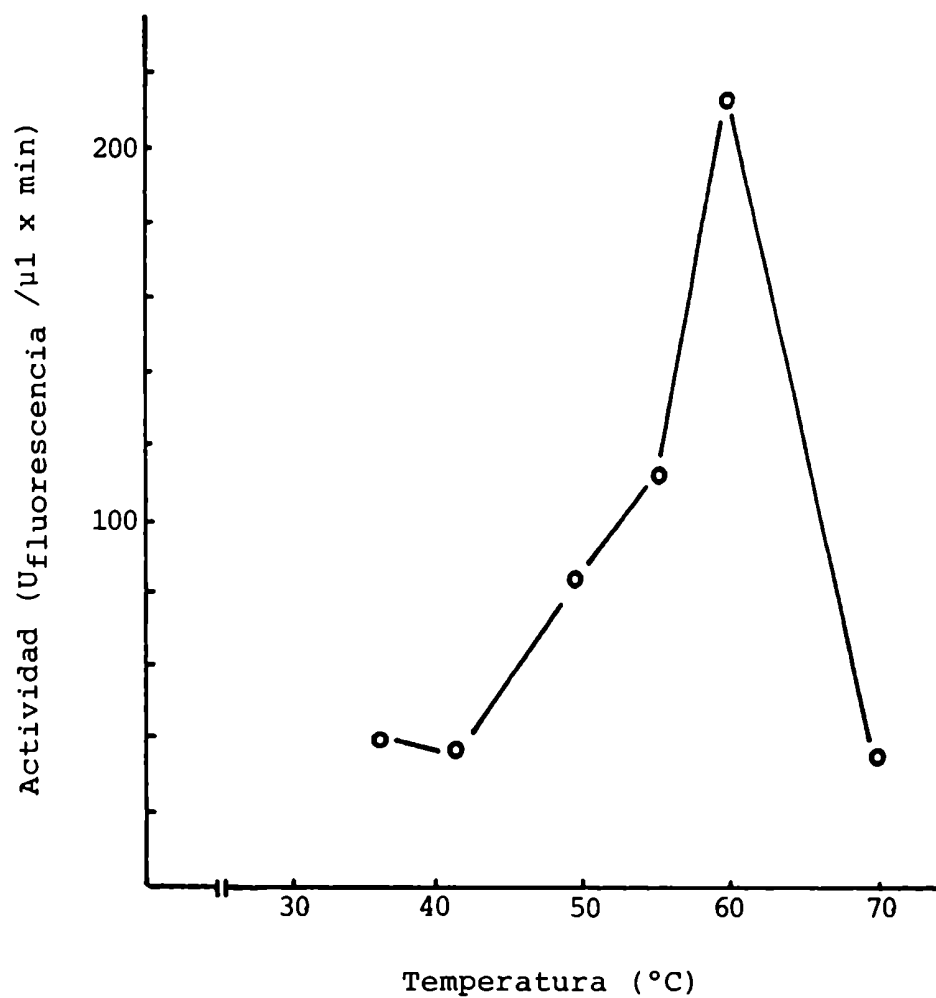


Fig. 22 Dependencia de la actividad hidrolizante de Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-NMec de la proteasa II con la temperatura. Se midió la actividad (M.5.2) empleando en el medio de reacción 1.8 U.E./ml de la enzima purificada. La actividad se expresa en unidades arbitrarias de fluorescencia.

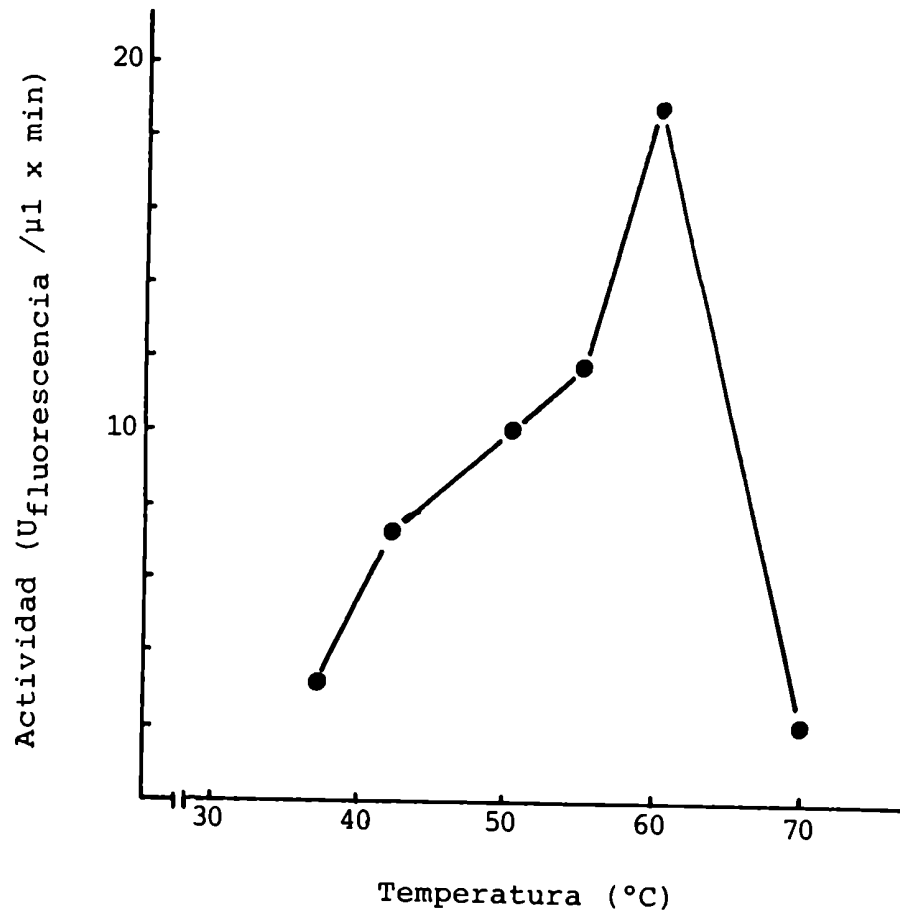


Fig. 23 Dependencia de la actividad hidrolizante de Bz-Phe-Val-Arg-NMec de la proteasa II con la temperatura. Se midió la actividad (M.5.2) empleando en el medio de reacción 11.3 U.E./ml de la enzima purificada. La actividad se expresa en unidades arbitrarias de fluorescencia.

la linealidad se mantuvo por un período superior a 20 min (datos no mostrados). Cuando las mediciones se realizaron usando como sustrato Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-NMec y en presencia de concentraciones activantes de ácido linoleico hubo un corrimiento en la curva de temperatura, similar al obtenido cuando se usó azocaseína como sustrato (sección R.II.1).

R.II.10 ESTABILIDAD TERMICA

Los resultados de la sección R.II.6 indican que la proteasa II tiene especificidad por sustratos de tripsina y de quimotripsina, sugiriendo que se trata de una enzima con al menos dos sitios activos.

Cuando se estudió la estabilidad térmica de la proteasa II, se encontró que luego de su preincubación a distintas temperaturas la actividad hidrolizante de Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-NMec fue menor que el control a partir de 45°C, mientras que la actividad hidrolizante de Bz-Phe-Val-Arg-NMec se mantuvo inalterable hasta 50°C. Estos datos servirían para reforzar la idea de que existen dos sitios catalíticos que se afectan de manera diferente, en este caso en particular por la temperatura. Al realizar las preincubaciones en presencia de ácido linoleico 2 mM la estabilidad térmica disminuyó con respecto al control en ausencia del ácido graso, lo cual podría explicar el corrimiento de la temperatura óptima hacia el lado de las temperaturas menores en presencia de ácidos grasos.

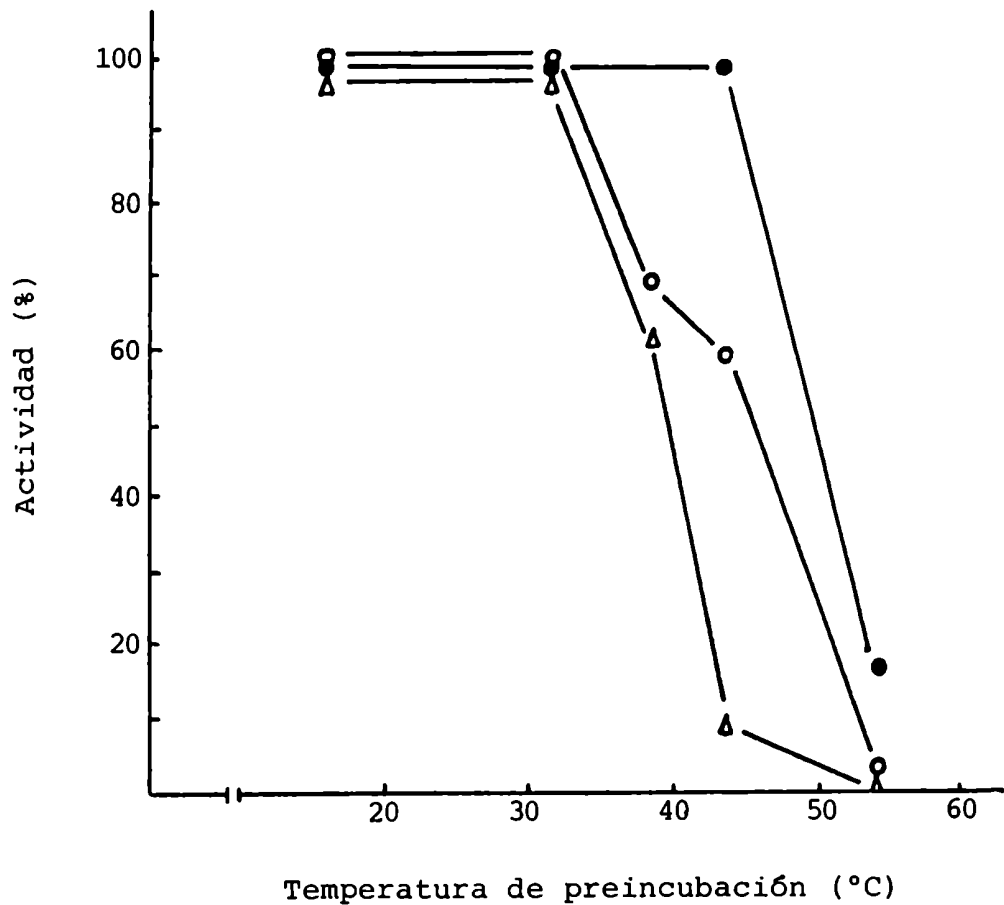


Fig. 24 Estabilidad térmica de la proteasa II. Se preincubó la enzima purificada durante 5 min a las temperaturas indicadas. Al cabo de ese tiempo se agregó el sustrato y se midieron las actividades hidrolizantes de Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-NMec (○) y la actividad hidrolizante de Bz-Phe-Val-Arg-NMec (●). Cuando la preincubación se realizó en presencia de ácido linoleico 1 mM, luego se midió la actividad hidrolizante de Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-NMec (Δ). Las unidades de enzima presentes en el medio de incubación son las mismas que se usaron en la fig. 20.

R.II.11 EFECTO DE REACTIVOS TIOLICOS E IONES METALICOS

La proteasa II se dializó contra buffer Tris-HCl 5 mM pH 7.5 sin 2-MCE y EDTA y se determinaron las actividades hidrolizantes de Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-NMec y de Bz-Phe-Val-Arg-NMec en presencia de varios reactivos tiólicos. En la tabla 10 se observa que el p-OHMB, NEM y quimostatin inhibieron fuertemente ambas actividades. En cambio algunos compuestos produjeron un efecto diferencial como el Cu^{2+} , que sólo afectó en una manera significativa a la actividad hidrolizante de Bz-Phe-Val-Arg-NMec pero el efecto diferencial más sorprendente se observó con el leupeptín (fig.25), que inhibió casi completamente a la actividad hidrolizante de Bz-Phe-Val-Arg-NMec a una concentración de 0.01 mg/ml mientras que la actividad hidrolizante de Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-NMec solo fue ligeramente afectada con una concentración 50 veces mayor. Por otra parte, si bien el DTT (fig. 26) estimuló ambas actividades, lo hizo en distinto grado y en diferentes rangos de concentraciones.

Tabla 10 Efecto de reactivos tiólicicos sobre las actividades de la proteasa II

Reactivo	Concentración	Actividad (%)	
		Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-NMec	Sz-Phe-Val-Arg-NMec
Control		100	100
p-OHMB	0.5 mM	0	0
Quimostatín	0.1 mg/ml	12	10
NEM	1.0 mM	0	22
CuSO ₄	1.0 mM	93	40
Leupeptin	0.5 mg/ml	65	0
DTT	5.0 mM	100	250

La enzima fue preincubada con los reactivos correspondientes durante 15 min a temperatura ambiente. Luego se agregó el sustrato (6µl) y se midió la actividad como se detalló en la sección M.5.2.

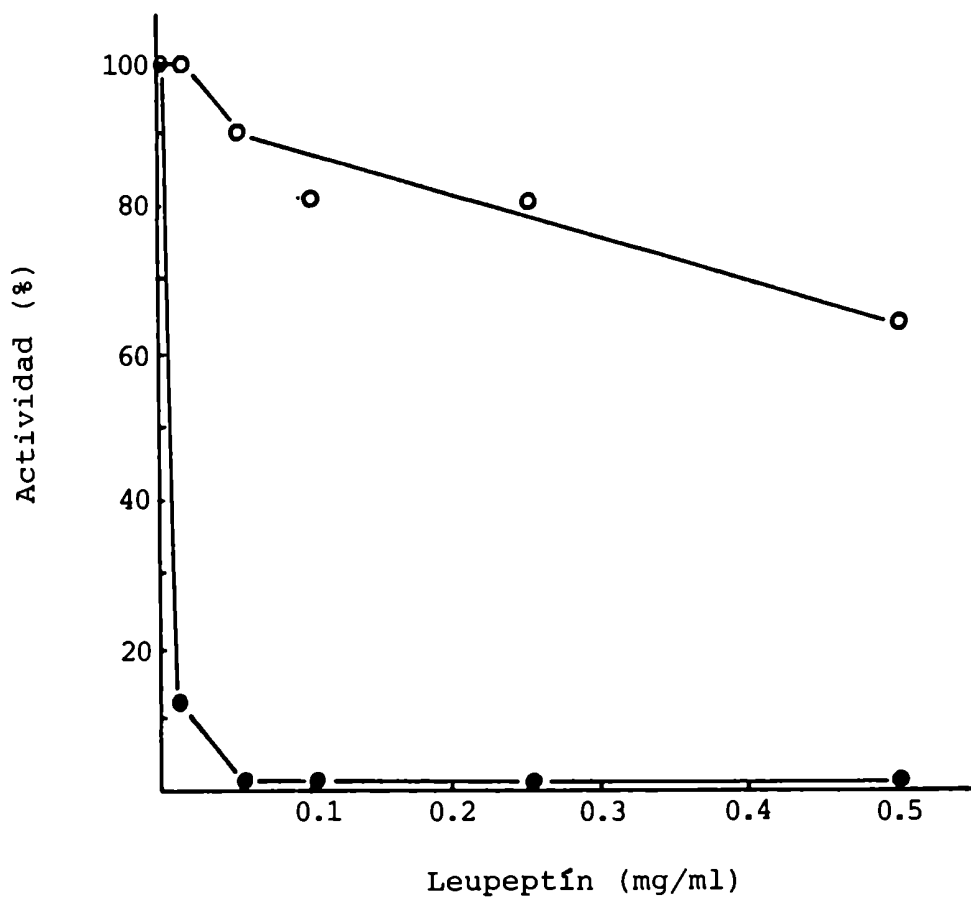


Fig. 25 Efecto del leupeptin sobre las actividades de la proteasa II. La enzima purificada se dializó contra buffer Tris-HCl 5 mM pH 7.5, se preincubó durante 15 min a temperatura ambiente en presencia de las concentraciones indicadas de leupeptin, luego se agregó la solución de sustrato (6µl) y se midieron las actividades hidrolizantes (M.5.2) de Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-NMec (○) y de Bz-Phe-Val-Arg-NMec (●). usando en el medio de reacción 1.8 y 11.3 U.E./ml respectivamente.

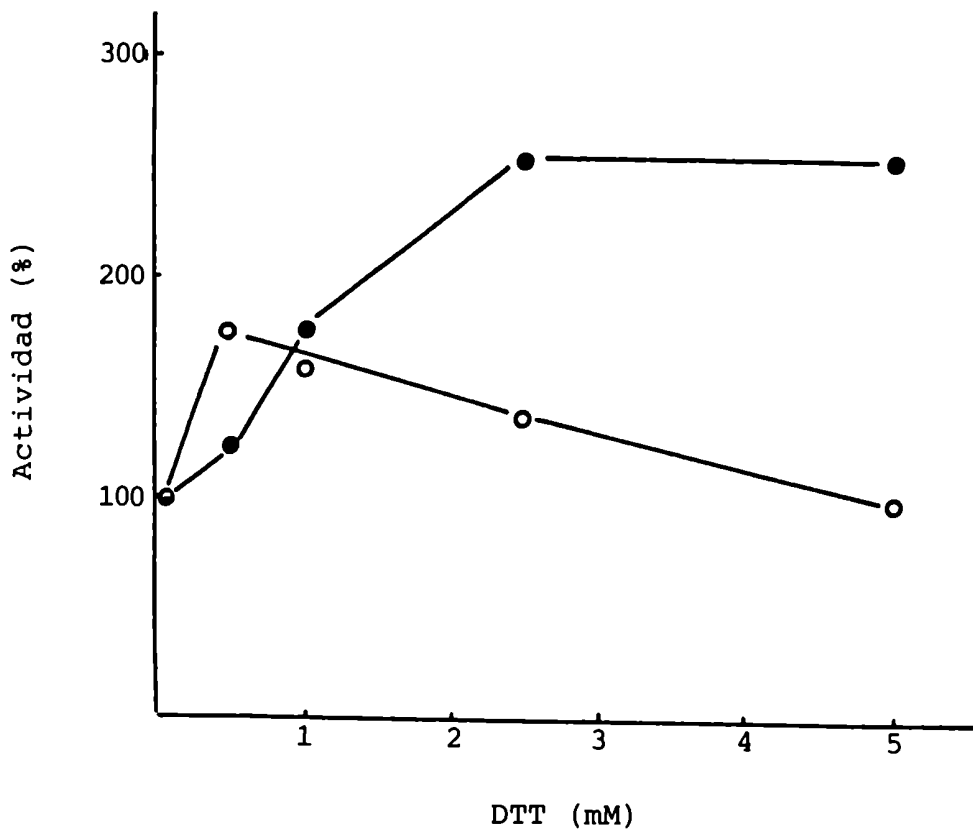


Fig. 26 Efecto del DTT sobre las actividades de la proteasa II. La enzima purificada se dializó contra buffer Tris-HCl 5 mM pH 7.5, se preincubó en presencia de las concentraciones indicadas de DTT durante 15 min a temperatura ambiente, luego se agregó la solución de sustrato (6 μ l) y se midieron las actividades hidrolizantes (M.5.2) de Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-NMec (o) y de Bz-Phe-Val-Arg-NMec (●) usando en el medio de reacción 1.8 y 11.3 U/ml respectivamente.

CAMBIOS POST-MORTEM

R.III.1 CAMBIOS POST-MORTEM EN LOS ELEMENTOS DEL CITOESQUELETO DEL MUSCULO DE PESCADO

En músculo de pescado existe una red endosarcomérica del citoesqueleto formada mayoritariamente por titina y nebulina, y una red exosarcomérica tal como se describió precedentemente (R.I.7). Se ha postulado que estas redes pueden tener importantes funciones en las propiedades estructurales y mecánicas de la fibra muscular (211) y podrían estar relacionadas a las propiedades físicas de la carne (178). Si por acción de proteasas se produjera una desconexión de las unidades previamente integradas, el citoesqueleto podría perder su rol funcional afectando profundamente a la textura.

El propósito de esta parte del trabajo fue observar los cambios post-mortem de los elementos del citoesqueleto del músculo de corvina, ya que esos cambios podrían estar relacionados al deterioro textural del pescado durante su conservación por frío.

En la figura 27 se muestran las micrografías electrónicas de transmisión obtenidas de músculo fresco (27a) y almacenado durante 7 días a 0°C (27b). Se observa que como consecuencia del almacenamiento no hubo cambios aparentes en los elementos contráctiles: el músculo almacenado conservó la integridad de las líneas Z, la ultraestructura de los filamentos gruesos y delgados, la forma regular de los

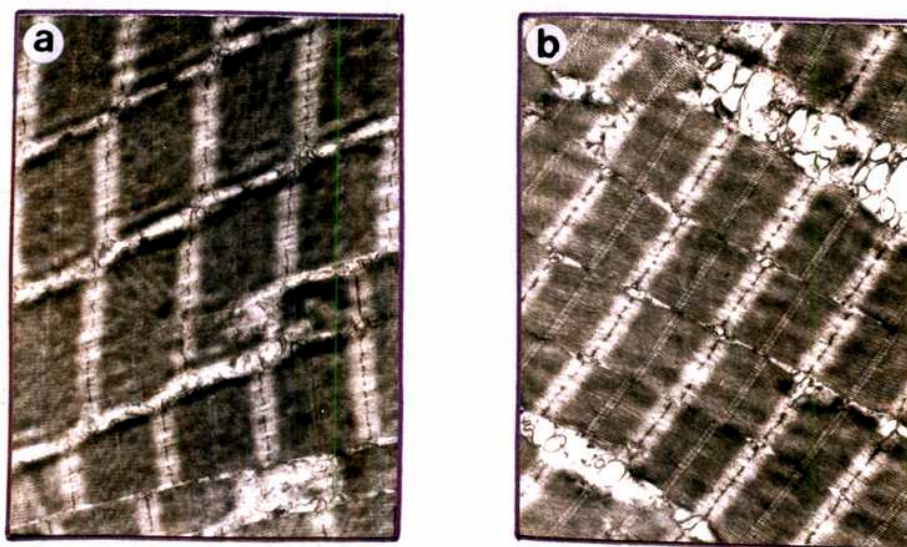


Fig. 27 Micrografías electrónicas de las muestras obtenidas de músculo fresco y almacenado a 0°C. (a) músculo fresco; (b) músculo almacenado 7 días. 1cm = 1.8 μ m
La preparación de las muestras para su observación en el microscopio electrónico de transmisión se realizó como se describió anteriormente (84).

sarcómeros individuales y el alineamiento lateral de las miofibrillas adyacentes.

Sin embargo a pesar de que la apariencia de los elementos miofibrilares no varió durante el almacenamiento, cuando se realizó la densitometría de los geles de miofibrillas aisladas de músculo fresco y almacenado se observaron importantes diferencias: si bien los componentes mayoritarios de las miofibrillas prácticamente no se modificaron, pero hubo una degradación progresiva de nebulina, observándose al cabo de 7 días una desaparición de aproximadamente 70 % (Tabla 11).

Esta metodología no permite visualizar alteraciones en la red exosarcomérica, por ello se preparó el residuo de KI de miofibrillas aisladas de músculo fresco y almacenado, con el fin de determinar si ocurría alguna modificación en esta red.

En la figura 28a, que corresponde al residuo de miofibrillas aisladas de músculo fresco, se observan grupos de miofibrillas adyacentes alineadas lateralmente y con sucesivas estructuras Z conectadas por filamentos longitudinales, continuos y paralelos. Sin embargo cuando se obtuvo el residuo de las miofibrillas de músculo almacenado por 7 días, se observó una desaparición casi completa de los filamentos longitudinales que unen estructuras Z. Las características de los residuos de KI de miofibrillas preparadas de músculo conservado 3 días a 0°C son intermedias entre las de músculo fresco y almacenado 7 días: hay

Tabla 11 Análisis densitométrico de miofibrillas obtenidas de músculo fresco y almacenado

Banda	Degradación (%)	
	3 días a 0°C	7 días a 0°C
Titina ^a	6	8
Nebulina ^a	39	66
Cadenas pesadas de miosina ^b	7	16
α -actinina ^c	2	2
Desmina ^d	N.D.	4
Actina ^b	9	11
Troponina T ^c	6	13
Tropomiosina ^c	7	10
Troponina I+C ^c	0	0
Cadenas livianas de miosina ^c	0	0

Los valores están expresados como porcentaje de degradación respecto del músculo fresco.

a-geles de poliacrilamida 5%, sembrados con 100 μ g de proteína miofibrilar, teñidos con Coomasie Blue.

b-geles de poliacrilamida 10%, sembrados con 20 μ g de proteína miofibrilar, teñidos con Coomasie Blue.

c-geles de poliacrilamida 10%, sembrados con 100 μ g de proteína miofibrilar, teñidos con Coomasie Blue.

d-geles de poliacrilamida 10%, sembrados con 100 μ g de proteína miofibrilar, teñidos con nitrato de plata.

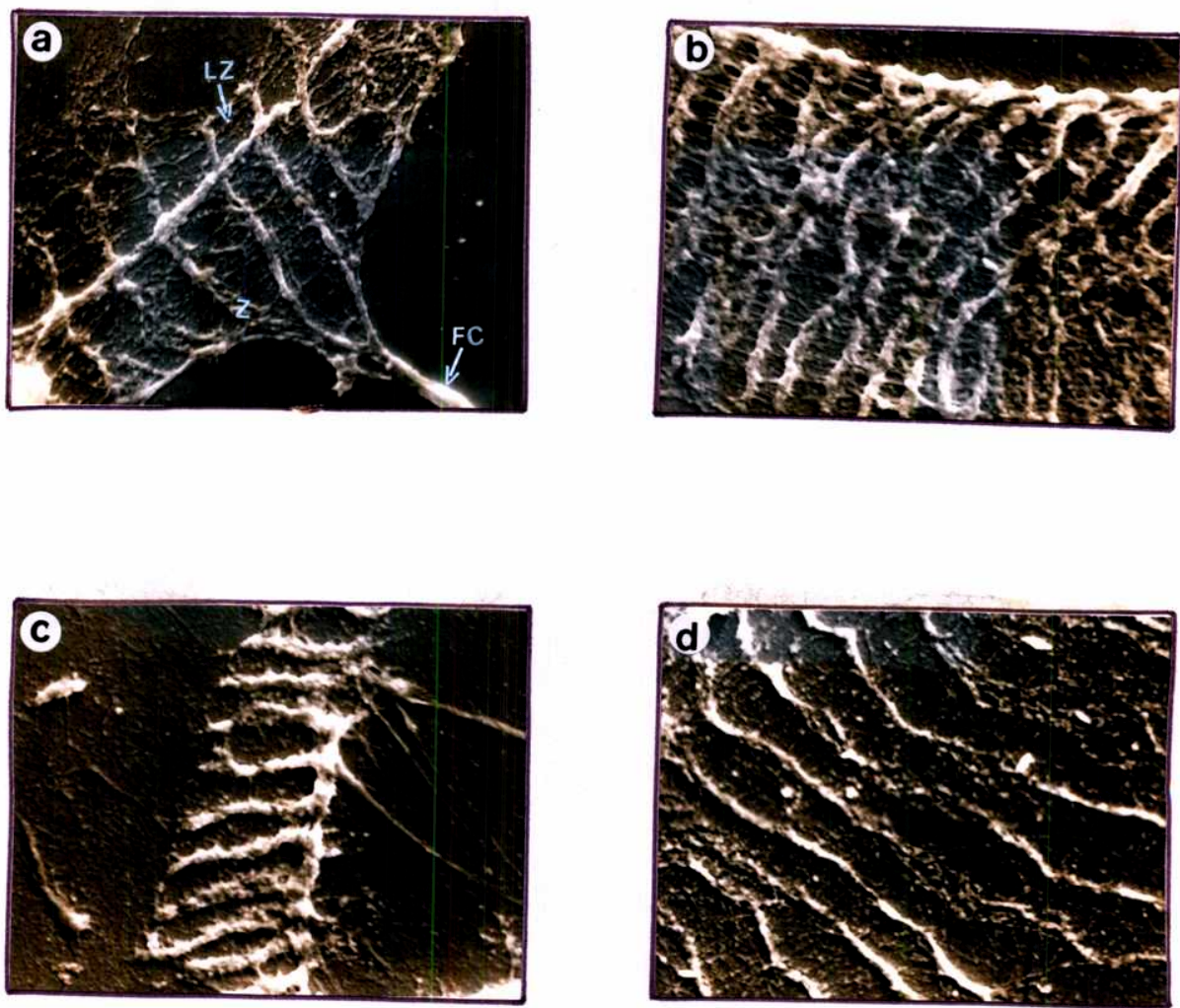


Fig. 28 Micrografías electrónicas de barrido de los residuos de KI obtenidos de miofibrillas preparadas de músculo fresco y almacenado a 0°C. (a) músculo fresco; (b) músculo almacenado 3 días; (c) músculo almacenado 7 días. 1 cm = 1.6 μ m. Las abreviaturas son las mismas de las fig. 6 y 7.

campos que muestran un alto grado de integridad de los filamentos longitudinales (fig. 28b) y campos en los cuales esos filamentos están ausentes (fig. 28c).

Por las razones expuestas en la sección R.I.7, no se realizaron los análisis electroforéticos de los residuos de KI.

DISCUSSION

Cuando el pescado es capturado, la forma de conservación previa a su consumo como tal o a su procesamiento es el almacenamiento a bajas temperaturas. Se cree que las proteasas extralisosomales podrían estar vinculadas a las alteraciones que conducen a cambios en la textura durante ese período. La textura es un factor muy importante en la aceptación del pescado como alimento. Si bien hasta el momento se han mencionado distintos factores que contribuirían a las propiedades físicas de la carne, la relación de estos con la textura aún es desconocida. En los últimos años se postuló que el citoesqueleto de la fibra muscular podría ser responsable de la misma.

La proteólisis de las proteínas musculares fue propuesta desde hace muchos años como el mecanismo primario de tiernización, pero sin embargo hubo muy poca información sobre la proteólisis de las proteínas miofibrilares y de los agentes que la provocan, hasta épocas recientes en que se intensificaron los estudios sobre los distintos sistemas proteolíticos musculares.

También se sabe que los primeros estadios del catabolismo de miofibrillas son eventos extralisosomales, pero existen controversias sobre cuáles son los sistemas proteolíticos involucrados. Por ello, el estudio de proteasas alcalinas podría aportar alguna respuesta a los interrogantes referidos a esos mecanismos de degradación.

Estos hechos determinaron que en nuestro laboratorio se haya prestado especial atención a las proteasas alcalinas de

músculo de corvina. Previamente habíamos descripto dos enzimas proteolíticas llamadas I y II, con gran capacidad de degradar proteínas miofibrilares (82-84).

En la primera parte del trabajo se encaró la purificación de la proteasa I y el estudio de algunas propiedades que pudieran ayudar a comprender su rol en el músculo vivo y durante el almacenamiento post-mortem.

La purificación de la proteasa I se realizó usando tres pasos cromatográficos. Una vez que la proteasa I fue purificada se estudió la dependencia de la actividad con el pH y la temperatura. Se usaron sustratos fluorogénicos, ya que el método es altamente sensible y permite trabajar con pequeñas cantidades de enzima, lo cual resulta beneficioso considerando el bajo rendimiento de la purificación.

La temperatura óptima de la proteasa I fue de 60°C cuando las mediciones se realizaron con una preparación que sólo había sido pasada por una columna de DEAE-Sephacel (82). En cambio, con la enzima purificada como se describió, se halló que el máximo de actividad correspondía a 37°C. Esta diferencia puede atribuirse a que en el primer caso se trataba de una preparación enzimática contaminada con el inhibidor endógeno de tripsina que regula la actividad de la proteasa I. Este inhibidor es inestable a la temperatura, por lo cual no actuaría sobre la enzima a 60°C pero sí enmascararía su actividad a 37°C. Este resultado es confirmado por los datos de actividad específica a 37°C y 60°C que se muestran en la tabla 3.

Se han descrito varias proteasas alcalinas atribuidas al músculo esquelético, pero estudios posteriores demostraron que provenían de mastocitos (153-158). Las células de mastocitos no han sido encontradas en músculo de pescado bajo condiciones fisiológicas normales, pero para confirmar este resultado el músculo de corvina fue teñido con azul de toluidina no detectándose metacromasia (dato no mostrado), que es generalmente indicativa de mastocitos y otras células cebadas. Estos resultados permitirían descartar que ese sea su origen.

El estudio del efecto de varios inhibidores sobre la proteasa I muestra claramente que esta enzima es una serín proteasa. Con el fin de comparar a la proteasa I con otras serín proteasas descritas, se estudió su especificidad sobre distintos sustratos de secuencia conocida. La proteasa I no fue capaz de hidrolizar al sustrato Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-NMec para enzimas tipo quimotripsina, pero sí hidrolizó a varios sustratos de enzimas tipo tripsina, mostrando una especificidad amplia con respecto al aminoácido en la posición adyacente a arginina (P_2) e hidrolizando preferentemente a aquellos que tienen prolina en esa posición.

La proteasa I, al igual que la triptasa, hidrolizó a los sustratos de tripsina, α -trombina y en mucha menor extensión a los sustratos de uroquinasa y calicreína. Ambas enzimas fueron incapaces de hidrolizar al sustrato de tripsina Bz-Arg-NMec, pero la mayor diferencia en su especificidad se manifestó con los sustratos del factor X_2 y

de plasmina: la proteasa I prácticamente no actuó sobre el primero de ellos pero hidrolizó eficientemente al segundo, mientras que la triptasa se comportó de manera inversa(218).

En el esperma de los ascidios, que ocupan una posición filogenética intermedia entre los vertebrados y los equinodermos, se han descrito dos serin proteasas. Una de ellas, llamada espermosina, tiene especificidad estrecha de sustratos, y la otra, llamada acrosina tiene una especificidad más amplia y similar a la proteasa I. La principal diferencia aparece con el sustrato del factor X_a que fue hidrolizado con una velocidad relativa bastante elevada por la acrosina y no así por la proteasa I (219).

Si bien los resultados expuestos precedentemente permiten conocer ciertas características de la proteasa I, uno de los objetivos de su estudio es conocer qué función tiene en la degradación de proteínas musculares y en las alteraciones en el músculo post-mortem, siendo necesario para ello estudiar cuáles son sus sustratos naturales.

Con ese fin, en un primer estudio habíamos descrito la acción de la proteasa I sobre proteínas miofibrilares aisladas, encontrando que degradaba miosina sólo y cuando formaba parte del complejo actomiosínico, lo que sugería que si la proteasa I tuviera acceso a la miosina dentro del músculo, podría tener profundos efectos en el recambio de proteínas miofibrilares (83).

Luego se decidió estudiar la acción de la proteasa I sobre una estructura más compleja como son las miofibrillas

enteras. Se encontró que la enzima producía una ruptura completa de su integridad estructural y degradaba a la mayoría de las proteínas contráctiles; también degradaba a la titina y nebulina, dos proteínas de la red endosarcomérica del citoesqueleto (84), al cual se le ha asignado importantes funciones en las propiedades mecánicas del músculo. Esta gran capacidad de la proteasa I para degradar a las miofibrillas enteras sugiere que podría estar involucrada en los estadios iniciales del recambio de esas proteínas in vivo. Algunos autores han postulado que esta función podría ser cumplida por la proteasa activada por Ca^{2+} , la cual ejerce una proteólisis limitada sobre miofibrillas. Sin embargo existen controversias al respecto pues las condiciones de pH y concentración de Ca^{2+} en el músculo post-mortem no son compatibles con una actividad significativa de esta enzima. No puede, de todos modos, descartarse que actúe durante el almacenamiento y que tal vez lo haga en forma concertada con otras enzimas. Continuando con la idea de profundizar en el conocimiento de los sustratos naturales de la proteasa I, se decidió estudiar su acción sobre la red exosarcomérica del citoesqueleto. Se ha propuesto que estos filamentos forman una red tridimensional que mantiene a las miofibrillas en su lugar y provee un ordenamiento del mecanismo contráctil. También se ha postulado que su degradación durante el almacenamiento post-mortem puede ser parcialmente responsable de los cambios de textura de la carne.

La red exosacomérica ha sido descrita en músculo esquelético de conejo, pero hasta el presente no se había demostrado su existencia en el músculo esquelético de peces, a pesar de que se suponía que su presencia podía ser una característica general de los músculos estriados de vertebrados(211,214). En este trabajo se confirmó su existencia y se observó que estaba constituida por un conjunto de filamentos transversales y longitudinales que tienen una organización similar a la encontrada en miofibrilla de músculo esquelético de conejo (211).

Además, cuando se estudió la acción de la proteasa I sobre esta red, se observó una destrucción completa de la misma en condiciones en que las principales características ultraestructurales endosarcoméricas de la miofibrilla fueron preservadas.

Los resultados obtenidos permiten establecer dos hipótesis:

1- que la proteasa I participa en el desarmado de la red exosarcomérica in vivo, lo cual se cree que está regulado por un mecanismo proteolítico más que por un equilibrio de polimerización-depolimerización (214).

2- que el desarmado de la red exosarcomérica sea el paso inicial en la proteólisis de la miofibrilla por la proteasa I, lo cual podría facilitar el acceso de la enzima a las proteínas endosacoméricas para continuar con la degradación.

Cualquiera que sea la función de la proteasa I en el músculo vivo su actividad debe estar precisamente controlada

para evitar daños irreparables en la célula. Relacionado a este punto previamente habíamos descripto la presencia de un inhibidor endógeno que regula su actividad (84).

Actualmente se considera que la integridad del citoesqueleto es un factor determinante en las propiedades físicas de la carne (145,178). Si bien es conocido que ocurren cambios de textura en el pescado durante su conservación a 0-4°C, las causas de esas alteraciones aún se desconocen. Los pocos trabajos que hay en bibliografía se refieren a cambios en los componentes de la red endosarcomérica del músculo de carpa durante el almacenamiento en frío. Estos estudios fueron realizados por dos grupos distintos y a pesar de haberlos efectuado en la misma especie los resultados fueron contradictorios (204-205). Con respecto a las alteraciones post-mortem de la red exosarcomérica, se carece de información y sólo existen datos sobre la degradación que le ocurre a la desmina, el componente mayoritario (211), en músculo bovino almacenado a 15°C (145).

Por ello en la última parte del trabajo (R.III) se encaró el estudio de las alteraciones que sufren ambas redes del citoesqueleto cuando el músculo de corvina es mantenido a bajas temperaturas. Aunque no se registraron cambios en la apariencia del músculo (fig. 27), sí se encontraron alteraciones en las dos redes, que podrían afectar a las funciones del citoesqueleto y modificar la textura del músculo.

Las fotos de la figura 28, muestran una alteración progresiva de la red exosarcomérica a medida que incrementan los días de almacenamiento. La densitometría de los geles de miofibrillas de músculo almacenado indica que a diferencia de lo informado por Robson (145), la cantidad de desmina en músculo permanece inalterable, sugiriendo que algún/os componente/s menor/es aún no identificado debería ser el responsable de los cambios observados en esta red, que se sabe es químicamente heterogénea. Estos resultados son compatibles con la ubicación de la desmina en los discos Z y su participación en la unión de miofibrillas adyacentes (214); ya que en el músculo de pescado almacenado hasta 7 días no se detectaron alteraciones en las líneas Z (Fig. 27) ni pérdida de la conexión entre miofibrillas adyacentes.

En lo que respecta a los componentes de la red endosarcomérica, los resultados obtenidos coinciden con los de Kimura (205) de músculo de carpa pues la nebulina fue degradada progresivamente mientras que la cantidad de titina se mantuvo constante. Se ha informado que la titina de músculo esquelético de vertebrados cuando es analizada en geles de poliacrilamida se presenta como un doblete (T_1 y T_2) y que ocurre una rápida conversión post-mortem de T_1 en T_2 (146,198,204). En las miofibrillas de corvina fue imposible detectar el doblete de titina ni aún usando geles de poliacrilamida al 3.2% (dato no mostrado). Esto podría indicar diferencia de especies, aunque no puede descartarse

que ocurra una muy rápida conversión de T_1 en T_2 después de la captura.

Un punto importante en el estudio de las alteraciones post-mortem del citoesqueleto es la identificación de la/s proteasa/s involucradas en su degradación. Previamente se describió la acción de la proteasa I sobre distintas proteínas miofibrilares tanto a 37°C como a 0°C. Teniendo en cuenta que el nivel de esta enzima permanece constante durante el almacenamiento en frío (220) y que en esas condiciones es factible que pierda los mecanismos de control, podría ser considerada un posible candidato para participar en los cambios post-mortem de los elementos estructurales del músculo. De todas formas este es un tema que requerirá posterior investigación.

La primera parte de la discusión se refirió a la proteasa I, sus propiedades y los cambios post-mortem del citoesqueleto. La otra enzima estudiada ha sido la proteasa II, que a diferencia de la proteasa I expresa su actividad en un rango muy estrecho de temperaturas (50°C-60°C) cuando se usa azocaseína como sustrato. Hasta el presente no se habían encontrado compuestos que regularan su actividad y que pudieran tener alguna significación biológica. Esta enzima es similar a la proteasa alcalina descrita por Makinodan en varias especies de peces, y cuya actividad sólo pudo detectarse a temperaturas menores a 50°C cuando era sometida a altas concentraciones de urea o acetamida o a un pretratamiento con irradiación gama (172). Estos hechos

sugerirían que la proteasa II existe in vivo en forma latente o como precursor.

En la sección R.II.1 se muestra que tanto el SDS como varios ácidos grasos, compuestos estructuralmente relacionados al detergente, provocaron un corrimiento en la curva de temperatura de la proteasa II, obles enlaces como el 20:5 y 22:6 que son componentes mayoritarios de los lípidos de pescado. Cuando se ensayó el efecto de los isómeros cis y trans del 18:1 sólo la forma cis, que existe en la naturaleza, fue capaz de estimular la actividad a 37°C. Por ello, estos compuestos podrían tener importancia en la regulación de la actividad proteolítica. De los ácidos grasos saturados sólo el ácido mirístico, que es un componente menor de los lípidos de corvina (221), fue capaz de activar a la enzima.

Si comparaobles enlaces como el 20:5 y 22:6 que son componentes mayoritarios de los lípidos de pescado. Cuando se ensayó el efecto de los isómeros cis y trans del 18:1 sólo la forma cis, que existe en la naturaleza, fue capaz de estimular la actividad a 37°C. Por ello, estos compuestos podrían tener importancia en la regulación de la actividad proteolítica. De los ácidos grasos saturados sólo el ácido mirístico, que es un componente menor de los lípidos de corvina (221), fue capaz de activar a la enzima.

Si comparamos a la proteasa II con otras enzimas descriptas en bibliografía, se observa que esta enzima al igual que la proteasa multicatalítica de músculo esquelético

de rata (90) y la ingensina (91-92) es activada por concentraciones de SDS en el rango milimolar. Sin embargo existen diferencias en la estimulación de la actividad por ácidos grasos: por un lado la proteasa II y la ingensina requieren concentraciones milimolares de estos compuestos, mientras que la enzima multicatalítica descrita por Dahlmann (90) fue estimulada por concentraciones mucho menores (micromolares). Por otra parte la actividad de la proteasa II fue estimulada por todos los ácidos grasos insaturados ensayados y a diferencia de la enzima multicatalítica de rata no se encontró que cuanto mayor fuera el grado de insaturación se redujera la capacidad de estimular la actividad. En cuanto a los ácidos grasos saturados la proteasa II como se mencionó anteriormente, sólo fue activada por el ácido mirístico mientras que la enzima de rata fue estimulada por todos los que tenían un número par de átomos de carbono entre 16 y 22.

Hasta el presente los niveles intracelulares de ácidos grasos libres se desconocen, existiendo opiniones contradictorias como ha sido discutido por Van der Vusse (223). De todos modos las concentraciones necesarias para activar a la proteasa II son relativamente altas y no se puede descartar que in vivo el efecto sobre la enzima pueda ser incrementado por algún otro factor adicional aún desconocido o bien que la acción de los ácidos grasos sea más efectiva bajo interacción de la enzima con estructuras tales como membranas. Por ejemplo, cuando se estudió la distribución

subcelular de la ingensina de placenta se encontró que el 90% de la actividad se recuperaba en el sobrenadante de 105000 x g pero la actividad específica fue mayor en la fracción microsomal, indicando que se trata de una enzima principalmente citosólica pero con parte de su actividad fuertemente asociada a las membranas (116). De manera similar, cuando se estudió la distribución subcelular de la proteasa alcalina de carpa, corvina, y caballa las mayores actividades específicas se registraron en la fracción microsomal (224). A partir de estos resultados surgen como tareas futuras a realizar la determinación de la ubicación subcelular de la proteasa II y el estudio de su actividad al interactuar con membranas naturales o artificiales.

La activación de la proteasa II por ácidos grasos podría tener importancia en condiciones fisiológicas en las cuales incrementan los niveles intramusculares de ácidos grasos, como por ejemplo el ayuno. También esta activación podría tener implicancias en los siguientes casos:

1-Se sabe que los ácidos grasos insaturados están principalmente unidos a la posición dos de los fosfolípidos (225) y que pueden ser liberados por la fosfolipasa A₂, enzima que es activada por Ca²⁺ (226). Por lo tanto, se puede especular que la proteasa II podría ser activada indirectamente por un aumento del Ca²⁺ intracelular. También se sabe que el Ca²⁺ promueve una degradación proteica intracelular en músculo de rata a través de proteasas distintas a la calpaína (227).

2-En bibliografía existen datos sobre el aumento de ácidos grasos libres intramusculares durante el almacenamiento post-mortem del pescado (228-229), resultado que también fue confirmado en músculo de corvina conservado a 0°C (dato no mostrado). Este incremento en los ácidos grasos podría activar a la enzima, la cual participaría en la degradación post-mortem que conduce al deterioro del pescado.

En varios tejidos de mamíferos se han descrito enzimas proteolíticas (90,117-118,230) que comparten ciertas propiedades con la proteasa II (pH óptimo alcalino, alto peso molecular, activación por SDS y ácidos grasos) y las cuales han sido llamadas multicatalíticas. por cumplir con las características descritas en la sección 1.4.2. La función de estas enzimas en la vía de degradación extralisosomal es desconocida, pero sus propiedades sugieren que podrían estar sujetas a mecanismos complejos de regulación in vivo. Por ello se decidió conocer si la proteasa II era una de estas enzimas. Previamente, fue necesario purificarla a homogeneidad. La purificación se logró a través de un procedimiento simple, rápido y reproducible.

La proteasa II presentó las siguientes características a) especificidad por al menos dos tipos de unión peptídica (tipo tripsina y tipo quimotripsina) y b) efecto diferencial de varios compuestos sobre cada una de las dos actividades, lo cual permite concluir que la enzima es una proteasa multicatalítica. Estos datos ofrecerían una posible

explicación a su compleja estructura de subunidades y además sugieren que una sola proteasa teniendo múltiples especificidades podría degradar extensamente a distintas proteínas. La enzima de pescado mostró estar constituida por varias subunidades en el rango de 18-26 kDa similarmente a las descritas en músculo esquelético de rata (90), eritrocito humano (117), pituitaria bovina (118), hígado de rata (230) y cristalino (231).

Con respecto a su comportamiento frente al SDS y ácidos grasos, estos compuestos estimularon la actividad "tipo tripsina" de la proteasa II e inhibieron su actividad "tipo quimotripsina", mientras que estimularon ambas actividades de la enzima multicatalítica de músculo esquelético de rata (90). En el caso de la enzima multicatalítica de pituitaria bovina sólo la actividad hidrolizante de la unión peptídica en la cual el carboxilo es aportado por el ácido glutámico fue activada por el detergente, mientras que las otras dos actividades fueron inhibidas (118). La actividad hidrolizante de péptidos conteniendo tirosina de la ingensina de reticulocito de conejo (119) similarmente a la proteasa II fue estimulada por SDS y ácidos grasos pero esos compuestos no tuvieron efecto en la hidrólisis de los sustratos conteniendo arginina.

Con respecto al conocimiento de proteasas similares en peces se ha descrito en músculo de carpa (171) y de Sciaene schiegeli, también llamada corvina blanca (232), una proteasa alcalina de alto peso molecular. Aunque varias

propiedades bioquímicas se parecen a las de la proteasa II incluyendo la capacidad de la enzima de carpa de hidrolizar sustratos de tripsina y de quimotripsina (171,173,232-234) la acción de los ácidos grasos y detergentes sobre esas enzimas u otras evidencias sobre su posible naturaleza multicatalítica no han sido informadas.

El efecto diferencial de los ácidos grasos sobre las actividades de la proteasa II es interesante, pues cambios en los niveles de ácidos grasos libres en el músculo vivo podrían servir para adaptar el funcionamiento de la enzima a distintas condiciones metabólicas, aunque hasta el momento es difícil evaluar el significado fisiológico de ese efecto.

Los resultados que se presentaron no son suficientes para proponer un mecanismo de activación de la enzima por ácidos grasos, pero el hecho de que el perfil electroforético no haya cambiado durante la activación sugeriría que la causa de la misma se debe a cambios conformacionales más que a autólisis o disociación. A causa de que la proteasa II está formada por un número elevado de subunidades pequeñas se realizaron intentos preliminares para tratar de asignar cada una de las actividades medidas a una subunidad diferente pero hasta el momento fueron infructuosos los ensayos que permitieran la disociación de subunidades y la retención de las actividades catalíticas (datos no mostrados), de todas formas es un tema que se continuará profundizando.

CONCLUSIONES

-Se purificaron y caracterizaron las proteasas alcalinas I y II de músculo esquelético de corvina.

-La proteasa I tiene una temperatura óptima de 37°C. Se trata de una serín proteasa que hidroliza sustratos de tripsina, mostrando una especificidad amplia con respecto al aminoácido en la posición P₂.

-Se demostró la existencia en músculo de corvina de una red exosarcomérica del citoesqueleto, la cual presenta características similares a las encontradas en músculo esquelético de conejo.

-Se estudió la acción de la proteasa I sobre esta red y se encontró que era intensamente degradada tanto a 37°C como a 0°C. Esta degradación podría ser el paso inicial en la proteólisis de la miofibrilla en músculo vivo. Además, la enzima podría participar en las alteraciones post-mortem del músculo almacenado a bajas temperaturas.

-La proteasa II mostró una temperatura óptima de 60°C, pero hubo un desplazamiento de la misma hacia el lado de las temperaturas menores en presencia de SDS y ácidos grasos.

-La proteasa II es una enzima multicatalítica con especificidad por dos tipos de unión peptídica (tipo quimotripsina y tipo tripsina). La actividad "tipo quimotripsina" fue estimulada por SDS y ácidos grasos, mientras que la actividad "tipo tripsina" fue inhibida por esos compuestos. El efecto diferencial de los ácidos grasos sobre las dos actividades de la proteasa II podría servir para adaptar a la enzima a distintas condiciones metabólicas.

-Se estudiaron los cambios en el citoesqueleto del músculo de corvina durante el almacenamiento a bajas temperaturas, debido a la importancia de este modo de conservación como forma primaria de almacenamiento del pescado y por la posible participación de las redes endo y exosarcoméricas del citoesqueleto en los cambios de textura del músculo almacenado. No se registraron cambios en la apariencia del músculo pero sí hubo alteraciones en ambas redes que podrían afectar a las funciones del citoesqueleto y modificar la textura.

BIBLIOGRAFIA

1. Mortimore, G.E. (1982) *Nutrition Reviews*, 40(1):1-12
2. Schimke, R.T.; Sweeney, E.; Berlin, C.M. (1965) *J. Biol. Chem.* 240:322-331.
Schimke, R.T.; Doyle, D. (1970) *Ann. Rev. Biochem.* 39:929-968.
4. Hershko, A.; Ciechanover, A. (1982) *Ann. Rev. Biochem.* 51:335-364.
5. Russell, D.H.; Snyder, S.H. (1969) *Mol. Pharmacol.* 5:253-262.
6. Wang, C.; Touster, D. (1975) *J. Biol. Chem.* 250:4896-4902.
7. Schimke, R.T.; (1970) En: *Mammalian protein metabolism*, H.N. Munro, Ed. 4:177-277. New York Academic.
8. Recheigl, M. Jr.; (1971) En: *Enzyme synthesis and degradation in mammalian systems*, M. Recheigl Jr. Ed., p.237. Baltimore: University Park Press.
9. Dice, J.F.; Goldberg, A.L. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.* 170:213-219.
10. Dice, J.F.; Goldberg, A.L. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:3893-3897.
11. Goldberg, A.L.; St. John, A.C. (1976) *Ann. Rev. Biochem.* 45:747-803.
12. Foole, B.; Wibo, M. (1973) *J. Biol. Chem.* 248:6221-6226.
13. Hendil, K.B. (1977) *J. Cell Physiol.* 92:353-364.
14. De Martino, G.N.; Goldberg, A.L. (1979) *J. Biol. Chem.* 254:3712-3715.
15. Tanaka, K.; Ichihara, A. (1977) *J. Cell. Physiol.* 93:407-416
16. Bradley, M.O. (1977) *J. Biol. Chem.* 252:5310-5315.
17. Kaftory, A.; Hershko, A.; Fry, M. (1978) *J. Cell. Physiol.* 94:147-160.
18. Fambrough, D.M.; Devreotes, P.N. (1976) En: *Biogenesis and turnover of membrane macromolecules*. J.S. Cook, Ed. New York: Raven Press. p.121-144.
19. Pittman, R.C.; Green, S.R.; Attle, A.D.; Steinberg, D. (1979) *J. Biol. Chem.* 254:6876-6879.
20. Wall, D.A.; Wilson, G.; Hubbard, A.L. (1980) *Cell* 21:79-93.
21. Libby, P.; Bursztajn, S.; Goldberg, A.L. (1980) *Cell* 19:481-491.
22. De Duve, C.; Wattiaux, R. (1966) *Ann. Rev. Physiol.* 28:435-492.
23. Mortimore, G.E.; Mondon, C.E. (1970) *J. Biol. Chem.* 245:2375-2383.
24. Neely, A.N.; Nelson, P.B.; Mortimore, G.E. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 338:458-472.
25. Deter, R.L.; De Duve, C. (1967) *J. Cell Biol.* 33:437-449.
26. Neely, A.N.; Cox, J.R.; Fortney, J.A.; Schworer, C.M. Mortimore, G.E. (1977) *J. Biol. Chem.* 252:6948-6954.
27. Schworer, C.M.; Cox, J.R.; Mortimore, G.E. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87:163-170.

28. Schworer, C.M.; Shiffer, K.A.; Mortimore, G.E. (1981) *J. Biol. Chem.* 256:7652-7658.
29. Ward, W.F.; Cox, J.R.; Mortimore, G.E. (1977) *J. Biol. Chem.* 252:6955-6961.
30. Mortimore, G.E.; Ward, W.F. (1981) *J. Biol. Chem.* 256:7659-7665.
31. Wibo, M.; Poole, B. (1974) *J. Cell. Biol.* 63:430-440
32. Aoyagi, T.; Umezawa, H. (1975) En: *Proteases and biological control*. E. Reich; D.B. Rifkin; E. Shaw Ed. p. 429-454. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Lab.
33. Dean, R.T. (1975) *Nature* 257:414-416.
34. Ballard, F.J. (1977) *Essays Biochem.* 13:1-37.
35. Segal, H.L.; Doyle, D.J., Eds. (1978) En: *Protein turnover and lysosome function*. New York: Academic, p:790.
36. Bigelow, S.; Hough, R.; Rechsteiner, M. (1981) *Cell* 25:83-93.
37. Poole, B.; Wibo, M. (1973) *J. Biol. Chem.* 248:6221-6226.
38. Knowles, S.E.; Ballard, F.J. (1976) *Biochem. J.* 156:609-617
39. Epstein, D.; Elias-Bishko, S.; Hershko, A. (1975) *Biochem.* 14:5199-5204.
40. Neff, N.T.; DeMartino, G.N.; Goldberg, A.L. (1979) *J. Cell Physiol.* 101:439-458.
41. Dean, R.T. (1975a) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67:604-609.
42. Lloyd, J.B. (1978) *J. Biochem. Soc. Trans.* 6:500.
43. Haider, M.; Segal, H.L. (1972) *Arch. Biochem. Biophys.* 148:228-237.
44. Simpson, M.V. (1953) *J. Biol. Chem.* 201:143-154.
45. Mandelstam, J. (1960) *Bacteriol. Rev.* 24:289-308.
46. Olden, K.; Goldberg, A.L. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 542:385-398.
47. Halvorson, H. (1958) *Biochim. Biophys. Acta* 27:255-266.
48. Martegani, E.; Alberghina, L. (1979) *J. Biol. Chem.* 254:7047-7054.
49. Hershko, A.; Tomkins, G.M. (1971) *J. Biol. Chem.* 246: 710-714.
50. Ohkuma, S.; Poole, B. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:3327-3331.
51. Schneider, D.L. (1981) *J. Biol. Chem.* 256:3858-3864.
52. Reeves, J.P.; Reames, T. (1981) *J. Biol. Chem.* 256:6047-6053.
53. Roberts, J.W.; Roberts, C.W. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:147-151.
54. Roberts, J.W.; Roberts, C.W. (1981) *Nature* 290:422-424.
55. Etlinger, J.D.; Goldberg, A.L. (1980) *J. Biol. Chem.* 255:4563-4568.
56. Ciechanover, A.; Hod, Y.; Hershko, A. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81:1100-1105.

57. Hershko, A.; Ciechanover, A.; Rose, I.A. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:3107-3110.
58. Ciechanover, A.; Elias, S.; Heller, H.; Ferber, S.; Hershko, A. (1980) J. Biol. Chem. 255:7525-7528.
59. Wilkinson, K.D.; Urban, M.K.; Haas, A.L. (1980) J. Biol. Chem. 255:7529-7532.
60. Ciechanover, A.; Heller, H.; Elias, S.; Haas, A.L.; Hershko, A. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:1365-1368.
61. Hershko, A.; Ciechanover, A.; Heller, H.; Haas, A.L.; Rose, I.A. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:1783-1786.
62. Goldberg, A.L.; Dice, J.F. (1974) Ann. Rev. Biochem. 43:835-869.
63. Dice, J.F.; Dehlinger, P.J.; Schimke, R.T. (1973) J. Biol. Chem. 248:4220-4228.
64. Dehlinger, P.J.; Schimke, R.T. (1972) J. Biol. Chem. 246:2574.
65. Evans, W.H.; Gurd, J.W. (1972) Biochem. J. 128:691.
66. Dice, J.; Schimke, R.T. (1973) Arch. Biochem. Biophys. 158:97-105
67. Ropers, S.W.; Rechsteiner, M.C. (1985) En: Intracellular protein catabolism. E. Khairallah; J.S. Bond J.; W.C Bird, Eds. Alan R. Hiss. p.405-416
68. Hershko, A.; Heller, H.; Eytan, E.; Kaklij, G.; Rose, I. A. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:7021-7025.
69. Hershko, A.; Heller, H.; Eytan, E.; Reiss, Y. (1986) J. Biol. Chem. 261:11992-11993.
70. Levine, R.L.; Oliver, C.N.; Fulks, R.M.; Stadtman, E.R. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2120-2124
71. Levine, R.L. (1983) J. Biol. Chem. 258:11823-11827
72. Oliver, C.N.; Levine, R.L.; Stadtman, E.R. (1982) En: Experiences in biochemical perception. L.N.Ornston; S.G. Sligar, Eds. New York: Academic Press. p. 233-249.
73. Roseman, J.E.; Levine, R.L. (1985) Fed. Proc. 44:1092 (Abstract)
74. Rivett, A.J. (1985) J. Biol. Chem. 260:300-330.
75. Royers, S.; Wells, R.; Rechsteiner, M. (1986) Sci. 234:364-368.
76. Setlow, P. (1976) J. Biol. Chem. 251:7853-7862.
77. Sinensky, M.; Logel, J. (1983) J. Biol. Chem. 258:8547-8549.
78. Noguchi, T.; Kandatsu, M. (1969) Agric. Biol. Chem. 33:1226-1228.
79. Waxman, L.; Krebs, E.G. (1978) J. Biol. Chem. 253:5888-5891.
80. Toyohara, H.; Makinodan, Y.; Tanaka, K.; Ikeda, S. (1983) Agric. Biol. Chem. 47:1151-1154.
81. Hjelmeland, K. (1983) Comp. Biochem. Physiol. 76B:365-37222.
82. Busconi, L.; Folco, E.J.; Martone, C.; Trucco, R.E.; Sánchez, J.J (1984) FEBS Lett. 176:211-214
83. Folco, E.J.; Busconi, L.; Martone, C; Trucco, R.E.; Sánchez, J.J (1984) FEBS Lett. 176:215-219.

84. Busconi, L.; Folco, E.J.; Martone, C.B.; Trucco, R.E.; Sánchez, J.J. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* 252: 329-333.
85. Melloni, E.; Salamino, F.; Sparatore, B.; Michetti, M.; Pontremoli, S.; Horecker, B.L. (1984) *Arch. Biochem. Biophys.* 232:513-519.
86. Takano, E.; Kitahara, A.; Sasaki, T.; Kannagi, R.; Murachi, T. (1986) *Biochem. J.* 235:97-102.
87. DeMartino, G.N.; Croall, D.E. (1984) *Arch. Biochem. Biophys.* 232:713-720.
88. Barrett, A.J.; Fritz, H.; Grubb, A.; Isemura, S.; Jarvinen, M. et al. (1986) *Biochem. J.* 236:312.
89. DeMartino, G.N.; Blumenthal, D.K. (1982) *Biochem.* 21: 4297-4303.
90. Dahlmann, B.; Rutschmann, M.; Kuehn, L.; Reinauer, H. (1985) *Biochem. J.* 228:171-177.
91. Ishiura, S.; Yamamoto, T.; Nojima, M.; Sugita, H. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 882:305-310.
92. Yamamoto, T.; Nojima, M.; Ishiura, S.; Sugita, H. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 882:297-304.
93. Holzer, H.; Heinrich, P.C. (1980) *Ann. Rev. Biochem.* 49:63-91.
94. Barrett, A.J. Ed. (1977) *Proteinase in mammalian cells and tissues*. Amsterdam: Elsevier.
95. Hartley, B.S. (1960) *Ann. Rev. Biochem.* 29:45.
96. Laskowski, M. Jr.; Kato, I. (1980) *Ann. Rev. Biochem.* 49:593-626.
97. Jackson, C.M.; Nemerson, Y. (1980) *Ann. Rev. Biochem.* 49:765-811.
98. Patthy, L. (1985) *Cell* 41:657-663.
99. Neurath, H. (1984) *Science* 224:350-357.
100. Blow, D.M. (1976) *Acc. Chem. Res.* 9:145
101. Neurath, H.; Walsh, K.A. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:3825-3832.
102. Wilk, S. (1983) *Life Sci.* 33:2149-2157.
103. Starkey, F.M. (1977) *En: Proteinases in mammalian cells and tissues*. A.J. Barrett, Ed. Amsterdam Elsevier
104. Muller-Esterl, W.; Fritz, H. (1981) *Methods Enzymol.* 80:621-632.
105. Polgar, L.; Halasz, P. (1982) *Biochem. J.* 207:1-10.
106. Barrett, A.J.; Kambhavi, A.A.; Brown, M.A.; Kirschke, H.; Knight, C.G.; Tamai, M.; Hanada, K. (1982) *Biochem J.* 201:189-198.
107. Umezawa, H.; Aoyagi, T. (1983) *En: Proteinase inhibitors: Medical and biological aspects*. N. Katunuma H. Umezawa; H. Holzer, Eds. New York: Springer-Verlag p.3-15.
108. Keilová, H.; Turková, J. (1970) *FEBS Lett.* 11:287-288.
109. Murachi, T.; Tanaka, K.; Hatanaka, M.; Murakami, T. (1981) *En: Advances in enzyme regulation*. G. Weber, Ed. New York, Oxford: Pergamon Press. 19:407-424
110. Murachi, T. (1983) *Trends Biochem. Sci.* 8:167-169.
111. DeMartino, G.N. (1983) *J. Mol. Cell. Cardiol.* 15:17-19.

111. DeMartino, G.N. (1983) *J. Mol. Cell . Cardiol.* 15:17-19.
112. DeMartino, G.N.; Goldberg, A.L. (1979) *J. Biol. Chem.* 254:3712-3715.
113. Ismail, F.; Gevers, W. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 742:399-408.
114. Orłowski, M.; Michaud, Ch.; Wilk, S. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 94:1145-1153.
115. Dahlmann, B.; Kuehn, L.; Rutschmann, M.; Reinauer, H. (1985) *Biochem. J.* 228:161-170.
116. Nojima, M.; Ishiura, S.; Yamamoto, T.; Okuyama, T.; Furuya, H.; Sugita, H. (1986) *J. Biochem.* 99:1605-1611.
117. Mc Guire, J.; DeMartino, G.N. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 873:279-289.
118. Wilk, S.; Orłowski, M. (1983) *J. Neurochem.* 40:842-849.
119. Ishiura, S.; Sugita, H. (1986) *J. Biochem.* 100:753-763
120. Holmes, M.A.; Matthews, B.W. (1982) *Biochem.* 20:6912-6920.
121. Bond, J.S.; Beynon, R. J. (1985) *Int. J. Biochem.* 17:565-574.
122. Tang, J. (1983) *Acid proteinases: Structure, function and biology.* New York: Plenum.
123. Hasilik, A.; Neufeld, E.F. (1980) *J. Biol. Chem.* 255:4946-4950.
124. Erickson, A.H.; Conner, G.E.; Blobel, G. (1981) *J. Biol.Chem.* 256:11224-11231.
125. Samarel, A.M.; Worobec, S.W.; Ferguson, A.G.; Decker, R.S.; Lesch, M. (1986) *Am. J. Physiol.: Cell Physiol.* 250:C589-596.
126. von Figura, K.; Hasilik, A. (1986) *Ann. Rev. Biochem.* 55:167-193.
127. McKorte, R.A.; Turner, R.B.; Bradford, M.M.; Williams, W.L. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 7:492-498
128. Davie, E.W. (1981) *Methods Enzymology* 80C:153-172.
129. Holzer, H.; Heinrich, P.C. (1980) *Ann. Rev. Biochem.* 49:63-91.
130. Vandeburgh, H.; Kaufman, S. (1980) *J. Biol. Chem.* 255:5826-5833.
131. Goll, D.E.; Robson, R.M.; Stromer, M.H. (1977) *En: Food proteins.* J.R. Whitaker; S.R. Tannenbaum. Westport:AVI.p.121-174
132. Goll, D.E.; Arakawa, N.; Stromer, M.H.; Busch, W.A.; Robson, R.M. (1970) *En: The physiology and biochemistry of muscle as a food.* E.J. Briskey; R.G. Cassens; B.B. Marsh, Eds. Madison:The University of Wisconsin Press.
133. Goll, D.E.; Stromer, M.H.; Olson, D.G.; Dayton, W.R.; Suzuki, A.; Robson, R.M. (1974) *Proc. Meat. Ind. Res. Conf. Arlington (Va.):American Meat Institute Foundation.*
134. Huxley, H.E.; Hanson, J. (1954) *Nature* 173:973-976.
135. Huxley, A.F.; Niedegergerke, R. (1954) *Nature* 173:971-

136. Huxley, H.E. (1969) *Science* 164:1356-1366.
137. Huxley, H.E. (1973) *Nature* 243:445-449.
138. Wang, K.; Ramirez-Mitchell, R. (1979) *J. Cell. Biol.* 83:389a (Abstr.).
139. Wang, K. Williamson, C.L. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:3254-3258.
140. Ishikawa, H.; Bischoff, R.; Holtzer, H. (1968) *J. Cell Biol.* 38:538-555.
141. Steinert, P.M. (1981) En: *Electron microscopy of proteins*. J.R. Harris, Ed. New York: Academic Press. 1:125-166.
142. Lazarides, E. (1982) *Ann. Rev. Biochem.* 51:219-250.
143. Price, M.G.; Sanger, J.W. (1983) *Cell and muscle motility*. R.M. Dowben; J.W. Shay, Eds. New York: Plenum. 3: 1-40.
144. Lazarides, E.; Hubbard, B.D. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:4344-4348.
145. Robson, R.M.; O'Shea, J.M.; Hartzer, 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.; Huiatt, T.W. (1984) *J. Food Biochem.* 8:1-24.
146. Wang, K. (1985) En: *Cell and muscle motility*. J.W. Shay, Ed. Plenum. 6:315-369
147. Coffey, J.W.; Deduve, C. (1968) *J. Biol. Chem.* 243: 3255-3263.
148. Schwartz, W.N.; Bird, J.W.C. (1977) *Biochem. J.* 167: 811-820.
149. Bird, J.W.C.; Spanier, A.M.; Schwartz, W.N. (1978) En: *Protein turnover and lysosome function*. New York: Academic. p. 589-603.
150. Kirschke, H.; Kargel, H.J.; Riemann, S.; Bohley, P. En: *Proteinases and their inhibitors: Structure function and applied aspects*. V. Turk; L. Vitale, Eds. Oxford: Pergamon Press. p.93-101.
151. Wildenthal, K.; Wakeland, J.R.; Ord, J.M.; Stull, J. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96:793-798.
152. Riebow, J.F.; Young, R.B. (1980) *Biochem. Med.* 2:316-323.
153. Woodbury, R.G.; Gruzinski, G.M.; Lagunoff, D. (1978) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 75:2785-2789.
154. Kuo, T.H.; Giacomelli, F.; Kithier, K.; Malhotra, A. (1981) *J. Mol. Cell. Card.* 13:1035-1049.
155. Noguchi, T.; Kandatsu, M. (1971) *Agric. Biol. Chem.* 35: 1092-1100.
156. Mayer, M.; Amin, R.; Shafrir, E. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* 161:20-25.
157. Holmes, D.; Parsons, M.E.; Park, D.C.; Pennington, R.J. (1971) *Biochem. J.* 125:98.
158. Murakami, U.; Uchida, K. (1978) *Biochem. Biophys. Acta* 525:219-229.
160. Kay, J.; Siemankowski, L.M.; Siemankowski, R.F.; Greweling, J.A.; Goll, D.E. (1982) *Biochem. J.* 201: 279-285.

161. Dayton, W.R.; Goll, D.E.; Zeece, M.G.; Robson, R.M.; Reville, W.J. (1976) *Biochem.* 15:2150-2158.
162. Dayton, W.R.; Goll, D.E.; Stromer, M.H.; Reville, W.J.; Zeece, M.G.; Robson, R.M. (1975) En: *Proteases and biological control*. E. Reich, D.B. Rifkin, E. Shaw, Eds New York: Cold Spring Harbor. 2:551-577
163. Femrick, S.M.; Scheneiderman, S.; Stracher, A. (1980) *Fed. Proc.* 39:2043.
164. Davies, P.J.A.; Wallach, D.; Willingham, M.C.; Pastan, I.; Yamaguchi, M.G.; Robson, R.M. (1978) *J. Biol. Chem.* 253:4034-4042.
165. O'Shea, J.M.; Robson, R.M.; Huiatt, T.W.; Hartzer, M.K. Stromer, M.H. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89:972-980.
166. Dayton, W.R.; Reville, W.J.; Goll, D.E.; Stromer, M.H. (1976) *Biochem.* 15:2159-2167.
167. Makinodan, Y.; Ikeda, S. (1971) *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 37:1002-1006.
168. Siebert, G.; Smith, A.; Von Malortie, R. (1965) *Z. Physiol. Chem.* 342:20-39.
169. Taneda, T.; Watanabe, T.; Seki, N. (1985) *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 49:219-228.
170. Makinodan, Y.; Hirotsuka, M.; Ikeda, S. (1979) *J. Food Sci.* 44:1110-1114.
171. Makinodan, Y.; Ikeda, S. (1969) *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish* 35:749-757.
172. Makinodan, Y.; Ikeda, S. (1977) *J. Food Sci.* 42:1026-1029.
173. Hase, J.; Kobashi, K.; Nakai, N.; Mitsui, E.; Iwata, K. Takedera, T. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 611:205-213.
174. Lawrie, R.A. En: *Meat science*, 2da. ed. p. 125-152. New York: Pergamon.
175. Cheftel, J.C.; Cheftel, H. (1980) En: *Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos*. Vol. 1. p.65-97. Zaragoza: Acribia
176. Buttkus, H.; Tomlinson, N. (1966) En: *The physiology and biochemistry of muscle as a food*. E.J. Briskey; R.G. Cassens; J.C. Trautman, Eds. p. 197-203. Madison: The University of Wisconsin Press.
177. Currie, R.W.; Wolfe, F.H. (1980) *Meat Sci.* 4:123-143.
178. Stanley, D.W. (1983) *Food Microstructure* 2:99-109.
179. Bate-Smith, E.C. (1948) *J. Soc. Chem. Ind.* 67:83.
180. Wilson, G.D.; Bray, R.W.; Phillips, P.H. (1954) *J. Anim. Sci.* 13:826.
181. Carmichael, D.J.; Lawrie, R.A. (1967) *J. Food Technol.* 2:299.
182. Bailey, A.J. (1972) *J. Sci. Food Agric.* 23:995.
183. Hoagland, R.; McBryde, C.N.; Powick, W.C. (1917) *USDA Bull.* 433
184. Deatherage, F.E.; Harsham, A. (1947) *Food Res.* 12:164-172.
185. Goll, D.E.; Henderson, D.W.; Kline, E.A. (1964) *J.*

- Food Sci. 29:590-596.
186. Parrish, F.C. Jr.; Goll, D.E.; Newcomb, W.J.I.; de Lumen, B.O.; Chaudhry, N.M.; Kline, E.A. (1969) *J. Food Sci.* 34:196-202.
 187. Locker, R.H. (1960) *J. Sci. Food Agric.* 11:520-526.
 188. Sharp, J. G. (1963) *J. Sci. Food Agric.* 14:468-479.
 189. Henderson, D.W.; Goll, D.E.; Stromer, M.H. (1970) *Am. J. Anat.* 128:117-136.
 190. Stroner, M.H.; Goll, D.E.; Reville, W.J.; Olson, D.G.; Dayton, W.R.; Robson, R.M. (1974) *Proc. IV, International Congress Food Sci. Tech. Vol. I, p.401-418. Valencia, España: Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos.*
 191. Arakawa, N.; Goll, D.E.; Temple, J. (1970) *J. Food Sci.* 35:703-711.
 192. Fujimaki, M.; Arakawa, N.; Okitani, A.; Takagi, O. (1965) *J. Food Sci.* 30:937-943.
 193. Collan, Y.; Salmenpera, M. (1976) *Acta Neuropath.* 35:219-233.
 194. Macbride, M.A.; Parrish, F. C. Jr. (1977) *J. Food Sci.* 42:1627-1629.
 195. Olson, D.G.; Parrish, F.C. Jr. (1977) *J. Food. Sci.* 42:506-509.
 196. Dabrowska, R.; Barylko, B.; Nowak, E.; Drabikowski, W.; (1973) *FEBS Letters* 29:239-242.
 197. Olson, D.G.; Parrish, F.C. Jr.; Dayton, W.R.; Goll, D.E. (1977) *J. Food Sci.* 42:117-124.
 198. Lusby, M.L.; Ridpath, J.F.; Parrish, F.C. Jr.; Robson, R.N. (1983) *J. Food Sci.* 48:1787-1790.
 199. Young, D.A.; Graafhuis, A.E.; Davey, C.L. (1981) *Meat Sci.* 5:41-55.
 200. Zeece, M.G.; Robson, R.M.; Lusby, M.L.; Parrish, F.C. (1983) *Inst. Food Technol. Annual Meeting Program Abstract p.153.*
 201. Maruyama, K.; Kimura, M.; Kimura, S.; Ohashi, K.; Suzuki, K.; Katunuma, N. (1983) *J. Biochem.* 92:711-715
 202. Seki, N.; Dogane, Y.; Watanabe, T. (1980) *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 46:607-615.
 203. Kremsdorf, D.L.; Josephson, R.U.; Spindler, A.A.; Phleger, C.F. (1979) *J. Food Sci.* 44:1044-1048.
 204. Seki, N.; Watanabe, T. (1984) *J. Biochem.* 95:1161-1167.
 205. Kimura, S.; Miyaki, T.; Takema, Y.; Kubota, M. (1981) *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 47:787-792.
 206. Taneda, T.; Watanabe, T.; Seki, N. (1983) *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 49:219-228.
 207. Kirtley, M.E.; Koshland, D.E. Jr. (1972) *Methods in Enzymology XXVI, Part. C. p.578-601.*
 208. Portzio, M.; Pearson, A. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 490:27-39.
 209. Davis, B.J. (1964) *Ann. New York Acad. Sci.* 121:404-427.
 210. Gill, T.A.; Keith, R.A.; Smith Lall, B. (1979) *J. Food Sci.* 44:661-667.
 211. Wang, K.; Ramirez Mitchell, R. (1983) *J. Cell Biol.*

- 96:562-570.
212. Merril, C.R.; Dunau, M.L.; Goldman, D. (1981) *Sci.* 211:1437-1438.
 213. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr A.L.; Randall R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193:266-275
 214. Lazarides, E. (1980) *Nature* 283:249-256.
 215. Maruyama, K.; Matsubara, S.; Natori, R.; Konamura, Y.; Kimura, S.; Ohashi, K.; Murakami, F.; Handa, S.; Eguchi, G. (1977) *J. Biochem.* 82:317-337.
 216. O'Shea, J.M.; Robson, R.M.; Hartze, M.K.; Huaitt, T.W.; Rathbun, W.E.; Stromer, M. H. (1981) *Biochem. J.* 195:345-356.
 217. Ouchterlony, O. (1948) *Acta Path. Microbiol. Scand.* 25:186.
 218. Kido, H.; Fukusen, N.; Katunuma, N. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* 239:436-443.
 219. Sawada, H.; Yokosawa, H.; Ishii, S. (1984) *J. Biol. Chem.* 259:2900-2904.
 220. Folco, E.J. (1987) Tesis-Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Buenos Aires. Argentina.
 221. Moreno, V.J.; de Moreno, J.E.A.; González, V.M. (1982) Informe del primer año de Investigaciones del Proceso Pesquero de los Recursos Costeros. INIDEP. Mar del Plata. Argentina.
 222. Ackman, R.G. (1979) En: *Advances in fish science and technology*. J.J. Connell Ed. Surrey England: Fishing News Books p.86-103.
 223. Van der Vusse, G.J.; Reneman, R.S. (1984) *J. Mol. Cell Cardiol.* 16:677-682.
 224. Makinodan, Y.; Kyaw, N.N.; Ikeda, S. (1982) *Comp. Biochem. Physiol.* 73B:785-789.
 225. Stubbs, C.D.; Smith, A.D. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 779:89-137.
 226. Slootboom, A.J.; Jansen, E.H.J.M.; Vlijm, H.; Patrus, F.; Soares de Araujo, P.; Haas, G.H. (1978) *Biochem.* 17:4593-4600.
 227. Kameyama, T.; Etlinger, J.D. (1979) *Nature* 279:344-346
 228. Dyer, W.J.; Fraser, D.I. (1950) *J. Fish Res. Bd. Can.* 16:43-52.
 229. Barassi, C.A.; Pécora, R.P.; Roldán, H.; Trucco, R.E. (1987) *J. Sci. Food Agric.* 38:373-377.
 230. Rivett, A.J. (1985) *J. Biol. Chem.* 260:12600-12606.
 231. Ray, K.; Harris, H. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:7545-7549.
 232. Makinodan, Y.; Yokoyama, Y.; Kinoshita, M.; Toyohara, H. (1987) *Comp. Biochem. Physiol.* 87B:1041-1046.
 233. Iwata, K.; Kobashi, K.; Hase, J. (1974) *Bull. Jpn. Soc Sci. Fish.* 40:189-200.
 234. Toyohara, H.; Makinodan, Y. (1986) *Agric. Biol. Chem.* 50:2131-2132.

