

ZIMOGRAFÍA DE ACTIVIDAD CALPAÍNA EN FUENTES CÁRNICAS COMO CRITERIO DE CALIDAD

Calpain Activity Zymography from Meat Sources as Quality Criterion

Dámaris Oropeza, Liliana Kurz y Jeff Wilkesman *

AMBIOQUIM, Centro de investigación y extensión en Ambiente, Biología y Química,
Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo. jwilkesm@uc.edu.ve

*Teléfono +58.241.600.5000 ext. 375.068, jwilkesm@uc.edu.ve

RESUMEN

La falta de ternura es un problema presente en la carne bovina de buena calidad. La ternura de la carne se da por mecanismos poco conocidos y se han propuesto factores como componentes individuales y características de la especie, edad del animal, diferencias musculares, entre otros. Para un ablandamiento *post mortem* se deben romper las uniones de algunas proteínas estructurales por métodos físicos o por acción enzimática. Entre las principales enzimas endógenas que producen ablandamiento están las calpaínas. Las calpaínas son cisteín proteasas, encargadas de hidrolizar los enlaces peptídicos internos de las proteínas. Ellas pertenecen a una familia amplia de proteínas intracelulares citosólicas dependientes de calcio. El sistema calpaína (integrado por μ -calpaína, μ/m -calpaína, m-calpaína y la calpastatina, un inhibidor endógeno) es el principal responsable de la proteólisis *post mortem*. Con el objetivo de analizar y caracterizar bioquímicamente la actividad calpaína de fuentes cárnicas de diversos animales para el consumo humano, se empleó la técnica de zimografía para la detección de la actividad enzimática en geles de poliacrilamida. Las muestras, provenientes de tres tipos de carne, fueron obtenidas de una carnicería y de un matadero (res) y de un criadero rural (pollo y cerdo) y se homogeneizaron por dos métodos distintos. Luego, se concentraron cinco veces y se cuantificó la cantidad de proteínas totales. Se determinó la actividad proteolítica empleando caseína como sustrato y tirosina como patrón. La actividad obtenida (en $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) fue 0,78 para el homogenato de res; 0,34 para el de cerdo y 0,24 para el de pollo. Se realizó un análisis zimográfico para evidenciar la actividad calpaína, donde se visualizaron bandas correspondientes a masas moleculares de ~70 kDa para res, ~67 y 65 kDa para pollo y ~68 kDa para cerdo, respectivamen-

te, comprobándose la autoproteólisis de la subunidad catalítica (80 kDa) de la calpaína. El método empleado resultó ser eficiente para estudiar la actividad calpaína como posible bioindicador de ternura de carnes para consumo humano.

Palabras clave: Calpaínas, carne, ternura, proteólisis, zimografía.

ABSTRACT

The lack of tenderness is an important issue when purchasing high quality bovine meat. The mechanisms involved in meat tenderness are still not well understood and several factors have been proposed, like individual components and species-related characteristics, age, differences in muscle types, etc. For *post mortem* tenderness, physical or enzymatic methods must be employed in order to break the union of some structural proteins. The main endogenous enzymes responsible for tenderness are cathepsin and calpain. Calpain is an important example of a cysteine protease, able to hydrolyze the internal peptide bonds of proteins. They form an ample family of calcium-dependent cytosolic intracellular proteins. The calpain system (composed of μ -calpain, μ/m -calpain, m-calpain and calpastatin, an endogenous inhibitor), is responsible for *post mortem* proteolysis (especially μ -calpain) and thus, also for meat tenderness. In order to analyze and characterize biochemically the calpain activity present in meat sources from several animals for human consumption, the zymography technique was used to detect enzymatic activity in polyacrylamide gels. Samples isolated from three types of meat were obtained from a local store and also from a slaughterhouse (beef) and from a local farm (chicken and pork). Meat sample were homogenized by two different methods. Then homogenates were concentrated five times and total amount of proteins was quantified. Proteolytic activity was quantified by photometry using casein as substrate. A standard curve was

performed using tyrosine. Activity ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) was determined to be 0.78 for beef homogenate, 0.34 for pork, and 0.24 for chicken. Calpain activity was also tested by zymography, resulting in active bands corresponding to ~ 70 kDa for beef, ~ 67 and 65 kDa for chicken and ~ 68 kDa for pork. Concurrently, the autoproteolysis of the catalytic subunit (80 kDa) was confirmed. The method used is efficient to study calpain activity as possible bioindicator of meat tenderness for human consumption.

Key words: Calpains, tenderness, meat, proteolysis, zymography.

INTRODUCCIÓN

Las proteasas son enzimas que hidrolizan el enlace peptídico de las proteínas y se caracterizan por tener diversas especificidades. Hay dos clases principales de proteasas, según su sitio de acción. Las exopeptidasas actúan sobre el enlace N- o C- terminal del sustrato, mientras que las endopeptidasas hidrolizan el interior de la proteína. Estas últimas se subclasifican, de acuerdo a su sitio activo, en cuatro familias: serín-, aspártico-, cisteín- o metaloproteasas [13].

Las cisteín proteasas, caracterizadas por un grupo tiol de un residuo de cisteína en su sitio activo, han sido aisladas de animales, plantas y bacterias, de las cuales se conoce un grupo representativo, entre éstas se encuentran las calpaínas o proteasas neutras activadas por calcio, y son una familia de proteasas con un papel metabólico muy activo [4]. Se ha identificado en diferentes sistemas enzimáticos que los cambios estructurales asociados al ablandamiento de la carne están directamente relacionados con la actividad de las calpaínas, representadas por las m-calpaínas, μ/m -calpaínas, μ -calpaínas y la calpastatina que actúa como inhibidor enzimático.

La calidad de la carne es juzgada por sus atributos sensoriales, como la terneza. Existe preocupación en este tema, pues son varios los factores que confieren la terneza a la carne, entre ellos, el trato al animal antes de morir, componentes individuales, características de la especie, edad del animal, y los diferentes músculos entre animales de una especie. Los estudios acerca de la terneza de la carne han aumentado, debido a su gran variación genética y dificultad de obtener datos fenotípicos que, necesariamente, requieren del sacrificio de los animales [20]. Existe evidencia que las calpaínas están directamente relacionadas con la suavidad de la carne, catalizando la reacción de proteólisis y degradando las proteínas estructurales del músculo *post mortem* [4].

El almacenamiento *post mortem* ha sido considerado esencial para la obtención de carne tierna, pues una vez completado el *rigor mortis*, se inician los cambios en la carne que la hacen más suave [18]. La maduración de la carne involucra varios procesos bioquímicos ligados a la degradación proteolítica del músculo. Se han propuesto tres sistemas proteolíticos

asociados a la proteólisis *post mortem*, las catepsinas lisosomales, el complejo de las proteínas multicatalíticas y las calpaínas (del inglés *calcium ion dependent papain like cysteine protease*, o cisteín proteasas parecidas a papaína dependientes de ion calcio) [4, 21].

En mamíferos, la familia de calpaínas comprende diversas isoformas específicas de tejido, se conocen con nombres derivados a partir de sus requerimientos de calcio: la μ -calpaína, μ/m -calpaína, la m-calpaína y la calpastatina. La μ/m -calpaína ha sido encontrada hasta el día de hoy solo en aves [15]. La μ -calpaína requiere entre 3 y 50 μM Ca^{2+} para alcanzar la mitad de su actividad máxima, mientras que la m-calpaína necesita $0,2$ a 1 mM para su activación. La μ/m -calpaína se activa entre 3 y 1000 μM . La calpastatina actúa como regulador catalítico [4]. El pH óptimo *in vivo* de estas enzimas oscila entre $7,2$ y $8,2$ [6]. Empero, a valores inferiores de pH, se registra aún actividad calpaína suficiente para producir un mejoramiento apreciable en la suavidad de la carne, especialmente si se permite un período de maduración apropiado [4]. Las tres isoformas de esta proteasa son heterodímeros con una masa molecular nativa de ~ 110.000 , y constan de una subunidad grande (80 kDa, la subunidad catalítica) y una subunidad pequeña (30 kDa, la subunidad reguladora). Una característica de las calpaínas es que son muy susceptibles a autoproteólisis inducida por calcio. La exposición prolongada al calcio da como resultado una pérdida de la actividad proteolítica y la destrucción final de la enzima [11]. Como secuela de la autoproteólisis, las subunidades de 80 y 30 kDa se degradan produciendo polipéptidos de ~ 78 y 18 kDa. Tras los cambios conformacionales que conducen a la autólisis de las subunidades, la subunidad larga liberada está lista para ejercer su actividad proteolítica [21]. La autólisis y la disminución de la actividad proteolítica de las calpaínas son altamente dependientes de la presencia de sustrato, pH y temperatura [11].

Con el trasfondo asociado a la seguridad alimentaria, en esta investigación se planteó analizar y caracterizar bioquímicamente la actividad calpaína de fuentes cárnicas de diversos animales para el consumo humano y estandarizar un método para la visualización de actividad calpaína en geles de poliacrilamida a través de zimografía. El propósito fue establecer una metodología que la industria cárnica nacional pueda implementar como patrón de calidad. Así puede tenerse un mayor conocimiento acerca de la relación calpaína y terneza, y en un futuro podría establecerse como parámetro para optimizar la valoración del producto final.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos químicos

Todos los reactivos empleados fueron de alto grado de pureza. Ácido acético, azul brillante de Coomassie (CBB), etanol, bis-acrilamida, albúmina de suero bovino (BSA), caseína, leupeptina, 2-mercaptoetanol (2-ME) y fluoruro de fenilmetil-

sulfonilo (PMSF) (Sigma-Aldrich). Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido clorhídrico, ácido ortofosfórico, acrilamida, y azul de bromofenol (Fischer Scientific). Glicerol, Trizma base, Triton X-100, glicina y ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico (HEPES) (Promega Corporation). Persulfato de amonio y tetrametiletlenodiamina (TEMED) (Riedel-de-Haën).

Fuente biológica y homogeneización

Las muestras de carne de res (*Bos taurus*), cerdo (*Sus scrofa*) y pollo (*Gallus gallus*) se obtuvieron de dos fuentes. La primera comprada en una carnicería, y la segunda en el Matadero Municipal de Aroa Cooperativa SUM-SUM C.A., municipio Bolívar, estado Yaracuy, Venezuela, para adquirir la carne de res inmediatamente después del sacrificio del animal. La carne de pollo y cerdo se obtuvo de un criadero rural. Los músculos extraídos de los animales fueron el *longissimus dorsi* para la res y cerdo, y el músculo pectoral para el pollo. Las muestras fueron llevadas al laboratorio de biotecnología del Centro de Investigaciones en Ambiente, Biología y Química (AMBIOQUIM), en la Universidad de Carabobo, procediéndose con la obtención del homogenato.

Dos métodos de extracción fueron empleados: *Método A*: propuesto por Arthur y Mykles [1], con algunas modificaciones, donde 200 mg de tejido muscular se colocaron en un homogeneizador de varilla con 2 mL de tampón de extracción (50 mM HEPES, pH 7,6; 150 mM NaCl, 10% v/v glicerol, 0,1% v/v Triton X-100, 5 mM EDTA, 10 mM 2-ME, 100 µM PMSF y 10 µg/mL leupeptina), a 4°C. Seguido de esto, el homogenato se centrifugó a 12.000 x *g* por 10 min a 4°C en una centrifuga Eppendorf, modelo 5417R, Eppendorf, Alemania, el precipitado fue descartado y el sobrenadante se recuperó, y se mantuvo almacenado a -20°C en congelador Whirlpool, Modelo ED2CHOXKO07, Whirlpool Corporation, EUA hasta su uso. *Método B*: propuesto por Koohmaraie [9] con algunas modificaciones. En un homogeneizador de varilla se trataron 200 mg de tejido muscular con 2 mL de tampón de extracción [50 mM Tris, 10 mM EDTA y 10 mM 2-ME ajustando el pH a 7,8 con HCl 6 N, a 4°C]. Seguido de esto, el homogenato se centrifugó a 28.000 x *g* por 120 min. El sobrenadante se recuperó y el precipitado fue descartado. Se concentraron luego 500 µL de los sobrenadantes obtenidos por ambos métodos de extracción, empleando centricones de 10.000 Da, a 7.516 x *g* por 30 min a 4°C, hasta obtener un volumen final de 100 µL.

Cuantificación de la cantidad de proteínas totales

Se utilizó el protocolo de Bradford [2], empleando BSA como patrón (100 µg/mL en H₂O) con el cual se realizó una curva de calibración de 0 a 10 µg de proteína por cada 100 µL. Se adicionó 1 mL de reactivo de Bradford a 100 µL de muestra, se mezcló y dejó en reposo por 5 min a 27°C y a continuación se midió la absorbancia en el espectrofotómetro Thermo Scientific, Modelo Genesys 10-S, Thermo Electron Corporation, EUA a 595 nm.

Cuantificación de la actividad calpaína

Los péptidos liberados de la caseína por efecto de las calpaínas se determinaron cuantitativamente por espectrofotometría [9]. Se mezclaron 125 µL de muestra con 125 µL de tampón de reacción [100 mM Tris, 10 mM 2-ME, 5 g/L caseína y 5 mM CaCl₂ pH 7,5 a 25°C, ajustado con ácido acético 1 N]. La mezcla se incubó en una mini-incubadora (J.P. Selecta, Modelo Medilow-LG, J.P. Selecta S.A., España) a 25°C por 60 min, para luego detener la reacción adicionando 250 µL TCA 5%. Seguidamente, se centrifugó a 2.000 x *g* por 30 min y se midió la absorbancia del sobrenadante a 280 nm. Se empleó una curva de calibración con tirosina como patrón.

Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

Para determinar el perfil de actividad proteolítica del homogenato se realizó una electroforesis empleando un equipo de mini-electroforesis (Bio-Rad, Modelo: PowerPac Basic, Bio-Rad Laboratories Inc., EUA) en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 10; 12 y 12,5% m/v, en condiciones reductoras y no reductoras [14]. El homogenato se disolvió como sigue: 5 µL de muestra en 15 µL de agua y 10 µL de tampón de carga 4 x; se inyectaron en el gel 20 µL de esta solución. El gel se sometió a 100 V por 90 min a 4°C. Se usó CBB para la tinción del gel. Marcadores de pesos moleculares de proteínas estándares fueron ensayados de manera paralela.

Zimografía

Para visualizar el perfil de actividad enzimática de las calpaínas, se procedió con el método propuesto por Arthur y Mykles [1]. Se emplearon geles al 10 ó 12,5% de acrilamida, empleando caseína al 1% como sustrato. Los geles fueron pre-corridos en tampón de corrida [25 mM Tris base, 125 mM glicina, 1 mM EDTA, pH 8, 4°C, adicionando 10 mM 2-ME justo antes de su uso], por 15 min a 100 V y 4°C. Seguido de esto, se disolvieron 5 µL de los sobrenadantes en tampón de muestra [20% v/v glicerol; 0,1 M Tris-HCl, pH 6,8; 10 mM EDTA; 10 mM 2-ME y 0,02% azul de bromofenol] y se cargó en el gel, se corrió la electroforesis por ~150 min a 100 V y 4°C. Una vez concluida la electroforesis se procedió a lavar el gel con tampón de incubación (50 mM Tris-HCl pH 7, 5 mM CaCl₂, 10 mM 2-ME), con dos cambios cada 30 min. El gel se incubó por 18 h en el mismo tampón a 27°C con agitación leve. Seguidamente, se colocó el gel en solución de tinción al 1% de CBB por 2 h y luego se destiñó el gel lavando con solución de destinción entre 30 y 60 min, hasta observar la aparición de bandas traslúcidas sobre un fondo azul intenso [1, 19, 25, 26].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El factor más importante relacionado con la aceptación de la carne por parte del consumidor es la terneza, y ésta mejora durante el almacenamiento *post mortem* [22], debido a la proteólisis de las principales proteínas miofibrilares causada

por las calpaínas [11]. La determinación cuantitativa de la cantidad de proteínas reveló que, hay mayor concentración de proteínas totales en el homogenato de pollo, seguido por el de cerdo y por último el de res en las muestras provenientes de la carnicería. La cuantificación de la actividad enzimática empleando caseína como sustrato (TABLA I), arrojó como resultado que el homogenato de res presenta mayor actividad enzimática, seguida por el de pollo y por último el de cerdo.

Para el análisis electroforético se emplearon geles de poli-acrilamida al 12%. Se observó el patrón electroforético de los homogenatos en condiciones no reductoras. Si bien para todas las muestras se vió un patrón común (resultados no mostrados), no se detectó actividad por zimografía (resultado no mostrado). Se infirió que la actividad calpaína había disminuido por debajo de la sensibilidad del método ($< \text{pmol}$) [25], dado que la muestra superaba el tiempo *post mortem*, el cual no se conocía con exactitud. Además, se sabe que la actividad calpaína disminuye en función del tiempo [7, 11, 12]. La cuantificación de la actividad (TABLA I), no registrada por zimogramas, quizá se deba a una actividad proteasa global y no específica a calpaína. Camou y col. [3] estudiaron la actividad calpaína durante el almacenamiento *post mortem*, encontrando que la actividad μ -calpaína disminuye rápidamente durante el envejecimiento y su actividad es menor al 5% después de 72 h. Después de 48 h, las calpaínas pueden no ser proteolíticamente activas a pH 5,8 (valor de pH del músculo *post mortem*).

Debido a ello, se decidió cambiar a una fuente biológica obtenida inmediatamente después del sacrificio del animal, directamente del matadero para el caso de la carne de res y de un criadero rural para la carne de cerdo y pollo. Los homogenatos se prepararon 96 h después de la muerte del animal. El protocolo se varió y se homogeneizaron las muestras en una licuadora (marca Oster, modelo 4090, Oster de Venezuela), se pesaron 200 mg/mL (balanza marca Ohaus, modelo Scout Pro SP2001, Scout Corporation, China) y seguido de esto se procedió a centrifugar. Se ha reportado que el uso de diferentes tampones de extracción influye notablemente sobre la actividad calpaína [22]; por ello se realizaron los análisis por dos vías de extracción distintos.

La FIG. 1a muestra el patrón electroforético de los homogenatos preparados por el método A, donde se observan al menos 13 bandas bien definidas para cada carril. El ensayo por zimografía muestra (FIG. 1b) una correspondencia de las bandas de ~ 80 kDa en el perfil electroforético con la actividad

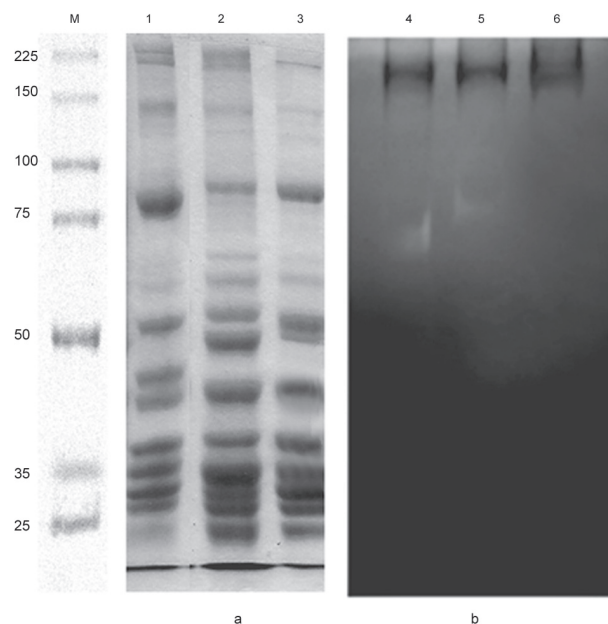


FIGURA 1. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD CALPAÍNA EN SOBRENADANTES (MÉTODO A) POR ELECTROFORESIS Y ZIMOGRAFÍA. (A) SDS-PAGE AL 10% EN CONDICIONES NO REDUCTORAS. (B) ZIMOGRAMA. CARRILES 1 Y 4: CERDO (30 μg); 2 Y 5: RES (30 μg); (3) Y 6: POLLO 30 μg . M: MARCADOR DE PESOS MOLECULARES (kDa).

registrada en la zimografía. Esto implica la presencia de autó-lisis, ya que la forma nativa de 110.000 no está presente.

A continuación se prepararon sobrenadantes por los métodos de extracción A y B. Se obtuvo actividad para los tres sobrenadantes durante la realización de los ensayos fotométricos (TABLA II). Por zimografía, no obstante, solo presentaba actividad el homogenato de pollo (imagen no mostrada), con una banda representativa de ~ 70 kDa. Esto confirmó la posibilidad de autólisis por parte de la calpaína encargada de la proteólisis *post mortem*, debido a la presencia de calcio en el medio de reacción.

En función del comportamiento observado durante el análisis de estos sobrenadantes, se procedió a concentrar las muestras cinco veces su volumen. Se atribuyó que no existía suficiente cantidad de enzima en los sobrenadantes provenientes de los homogenatos, impidiendo su detección por el método zimográfico. La cantidad de proteínas totales presen-

**TABLA I
DETERMINACIÓN PRELIMINAR DE ACTIVIDAD CALPAÍNA EN SOBRENADANTES**

Fuente ^a	Concentración ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) ($\pm 0,01$)	Proteínas totales (μg) ($\pm 0,01$)	Actividad total ^b ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}$)	Actividad específica ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de homogenato)
Cerdo	6,52	7,82	$2,6 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,2$
Pollo	6,76	8,11	$5,5 \pm 0,3$	$3,3 \pm 0,2$
Res	3,95	4,75	$3,7 \pm 0,9$	$3,7 \pm 0,9$

^aEmpleando muestras de carnicería extaidas por el método B, con un volumen final de 250 μL . ^b Medida a 280nm, con 5 g/L de caseína a 25°C, 60 min.

TABLA II
EFECTO DE LA EXTRACCIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD CALPAÍNA

Método	Fuente	Concentración ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)	Proteínas totales ^a (μg)	Actividad total ^b ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}$)	Actividad específica ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)
A (Arthur)	Cerdo	18 ± 2	7,3 ± 0,9	8 ± 2	3,7 ± 0,7
	Pollo	14,5 ± 0,1	5,81 ± 0,05	7 ± 1	3,7 ± 0,7
	Res	15 ± 2	6,0 ± 0,6	4,0 ± 0,2	2,1 ± 0,1
B (Koohmaraie)	Cerdo	19 ± 2	7,7 ± 0,9	8,5 ± 0,2	3,6 ± 0,1
	Pollo	15,3 ± 0,1	6,1 ± 0,1	8,9 ± 0,3	4,7 ± 0,2
	Res	16 ± 1	6,4 ± 0,6	8,0 ± 0,2	4,0 ± 0,1

^a Para un volumen final de 125 μL . ^b Actividad medida a 280 nm, con 5 mg/mL de caseína a 25°C y 60 min.

TABLA III
EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD CALPAÍNA

Método de extracción	Fuente	Proteínas totales sin concentrar ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Proteínas totales concentradas ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Actividad total ^{a,b} ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}$)	Actividad específica ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)
A (Arthur)	Cerdo	18 ± 2	48 ± 2	0,21 ± 0,02	0,035 ± 0,002
	Res	15 ± 2	37 ± 3	0,46 ± 0,01	0,099 ± 0,004
	Pollo	14,5 ± 0,1	49,0 ± 0,1	0,25 ± 0,01	0,040 ± 0,002
B (Koohmaraie)	Cerdo	19 ± 2	41 ± 3	1,76 ± 0,03	0,344 ± 0,005
	Res	16 ± 1	19 ± 2	1,8 ± 0,1	0,78 ± 0,04
	Pollo	15,3 ± 0,1	66 ± 4	1,95 ± 0,01	0,236 ± 0,002

^a Actividad medida a 280 nm, con 5 g/L caseína, 25°C y 60 min. ^b Volumen inicial a concentrar 500 μL , volumen final concentrado 100 μL .

tes en las muestras concentradas fue recalculado. La TABLA III presenta una tendencia similar para las muestras tratadas con los diferentes métodos de extracción. Por el método A, empero, se obtiene ~10 veces menor actividad proteolítica en comparación con el método B.

La actividad de las muestras extraídas por el método A es más específica, ya que están presentes una serie de inhibidores en el tampón de extracción (EDTA, PMSF, leupeptina), que no inhiben la actividad calpaína, pero sí otras proteasas. Además, el tampón de extracción contiene NaCl y Triton X-100, los cuales facilitan la extracción de la proteína citoplasmática [1]. El método B, en contraste, da valores más altos de actividad para los mismos homogenatos. El tratamiento de la muestra en este método es más sencillo, sólo se adiciona EDTA y 2-ME como agente reductor. Esto sugiere que quizás se estén midiendo otras actividades proteasas que en el método A están inhibidas.

En la FIG. 2, se muestra el perfil electroforético del homogenato extraído por el método A en condiciones reductoras y no reductoras. Se observa que en condiciones no reductoras (FIG. 2b), existen unas bandas bien definidas en la parte superior del gel de ~99; 100 y 108 kDa, correspondientes al sobrenadante concentrado de cerdo, res y pollo. Este comportamiento no se observa en los carriles del 1-3 en condiciones re-

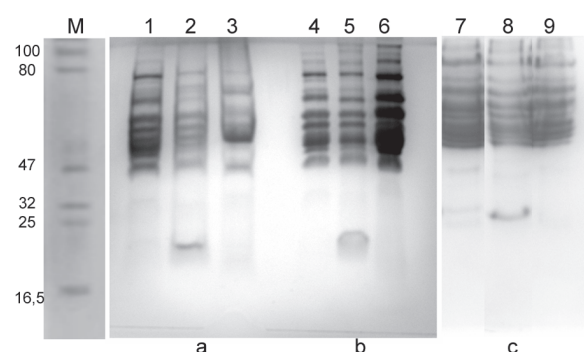


FIGURA 2. ELECTROFEROGRAMAS DE LOS SOBRENADANTES (MÉTODO A). PAGE (12,5%) EN CONDICIONES REDUCTORAS (a), NO REDUCTORAS (b) y NATIVAS (c). CARRILES 1, 4 y 7: SOBRENADANTE DE CERDO (14 μg); 2, 5 y 8: RES (11 μg); Y 3, 6 y 9 POLLO 15 μg . M: MARCADOR DE PESO MOLECULAR (kDa).

ductoras (a), las bandas correspondientes a estos pesos moleculares no se observan, lo cual indica que, la proteína de estudio es un heterodímero, corroborando reportes previos [4,11]. La FIG 2c muestra el perfil electroforético obtenido de los sobrenadantes en condiciones nativas donde se comprueba la existencia de la banda con un peso molecular de ~100 kDa (carriles 7-9).

Existe la posibilidad de que la μ -calpaína se encuentre activa y desnaturizada en las subunidades que la componen, ya que en estos ensayos el tampón de muestra contiene SDS, lo que origina la formación de complejos desnaturizados proteína-SDS [5], excepto para la electroforesis nativa. La autólisis de la calpaína, específicamente de la μ -calpaína, puede ser el factor predominante en este ensayo. Las calpaínas del músculo esquelético tienen una masa molecular de 110 kDa en geles no desnaturizantes, el cual es disociado a dos subunidades de 80 y 30 kDa en SDS-PAGE. A su vez, se reporta que la subunidad de 80 kDa de μ -calpaína se autolisa durante el almacenamiento *post mortem* en fragmentos de 78; 76; 75; 61 y hasta 23 kDa [8, 10, 15, 24]. μ -calpaína es supuestamente responsable de la proteólisis de las proteínas miofibrilares durante el almacenamiento *post mortem*, y la principal responsable de la terneza. Se ha confirmado que μ -calpaína está activa en el músculo *post mortem* [23]. Otra de las razones para atribuirle la degradación miofibrilar a esta calpaína, es que la concentración intracelular de Ca^{2+} en el músculo *longissimus* es suficientemente alta para activar a la μ -calpaína y no a la m-calpaína [17]. Adicionalmente, Veiseth y col. [24] observaron que la autólisis de la μ -calpaína fue detectada por primera vez a las 3 h *post mortem* y que entre las 3 y 24 h después del sacrificio se empieza a autolisar la subunidad larga (80 kDa) de μ -calpaína originando los fragmentos de 78 y 76 kDa. Empero, Koohmaraie [11], en sus estudios por SDS-PAGE, obtuvo como resultado de la autólisis de las subunidades de 80 y 30 kDa, la generación de polipéptidos de 61; 55; 40; 27; 23 y 18 kDa; donde el resultado de autólisis de la subunidad de 30 kDa produce solo un polipéptido con el peso molecular estimado de 18 kDa, los demás fragmentos son generados de la subunidad de 80 kDa.

Para comprobar si la subunidad larga de la μ -calpaína se encontraba desnaturizada, se procedió con el análisis de las muestras concentradas mediante SDS-PAGE (12,5%) en condiciones no reductoras, en conjunto con el análisis de los homogenatos por zimografía (FIG. 3). En este ensayo se detectó degradación de la caseína copolimerizada, obteniéndose actividad proteolítica en los carriles correspondientes a las muestras de pollo y cerdo por los dos métodos de extracción propuestos, la muestra de res extraída por el método A presentó poca actividad, y no se logró distinguir con claridad su banda al momento de escanearla. Las bandas obtenidas corresponden a ~60 kDa para res, ~57 y 51 kDa para pollo y ~59 kDa para cerdo de los extractos por el método A, y de ~57 y 49 kDa para pollo y ~55 kDa para cerdo de los extractos por el método B, comprobando así, por el perfil electroforético donde se presentan bandas con masas moleculares cercanas a los obtenidos por zimografía, que la calpaína se encuentra autolisada.

Koohmaraie [11] reporta resultados similares en cuanto a la actividad de estos fragmentos productos de la autólisis de la subunidad de 80 kDa. El autor [11] señala que el producto de la autólisis de 61 kDa es casi tan activa como la subunidad de 80 kDa intacta. Adicionalmente, reporta que un polipéptido de 60 kDa y otro de 56 kDa retienen la actividad en ausencia

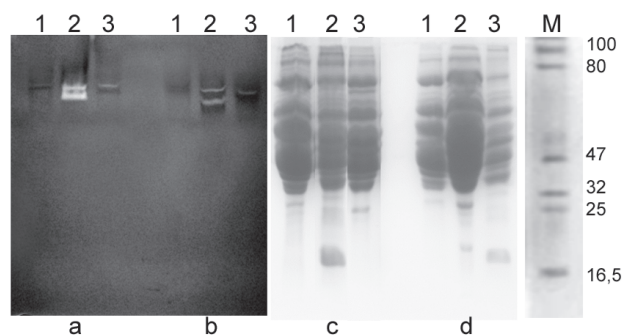


FIGURA 3. ZIMOGRAMA (a,b) Y SDS-PAGE (c,d) (12,5%) DE SOBRENADANTES CONCENTRADOS. MÉTODO A (a,c) CARRILES 1: 0,6 mg SOBRENADANTE DE RES; 2: 0,7 mg SOBRENADANTE DE POLLO; 3: 0,7 mg SOBRENADANTE DE CERDO; MÉTODO B (b,d). CARRILES 1: 0,3 mg SOBRENADANTE DE RES; 2: 1 mg SOBRENADANTE DE POLLO; 3: 0,6 mg SOBRENADANTE DE CERDO. M: MARCADOR DE PESO MOLECULAR (kDa).

de la subunidad de 80 kDa. También indican que polipéptidos de 40 kDa representan una forma inactiva de la calpaína. Otra forma de evidenciar la autólisis es en las muestras de pollo, que aparece como un doblete a alturas del gel muy cercanas. Esta muestra presenta mayor actividad tipo calpaína. El tejido de pollo presenta activa la μ - y μ/m calpaína, una calpaína que hasta los momentos se ha encontrado solo en aves y su distribución en el tejido de pollo varía de un músculo a otro [15]. La terneza *post mortem* ocurre más rápido en la carne de pollo porque ésta se completa en 2 d, luego de ella se alcanza en la carne de cerdo, completada a los 5 d y por último en la carne de res, que toma casi 2 semanas en completarse [10]. Koohmaraie y col. [10] concluyen que la diferencia de terneza entre la carne de cerdo y res y por consiguiente la del pollo, se debe a la regulación causada por la calpastatina.

Se ha reportado [16] que durante las primeras 72 h de almacenamiento de la carne se produce hasta el 80% de la terneza máxima posible por efecto de la proteólisis *post mortem* del músculo. Este efecto está relacionado con alta actividad μ -calpaína y baja actividad de la calpastatina. Existe coincidencia en que la concentración de calpastatina al momento de la muerte del animal es uno de los factores que afecta la calidad de la carne. Si al momento del sacrificio los niveles de calpastatina son altos, la carne será menos tierna.

CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

La extracción de calpaínas por el método A logró mantener la actividad enzimática durante el proceso de análisis, y contuvo mayor cantidad de actividad calpaína específica. Se corroboró la importancia de poseer muestras frescas para la obtención de resultados positivos de actividad calpaína. El perfil electroforético obtenido en condiciones desnaturizantes reductoras, no reductoras y nativas confirmó la estructura heterodimérica de calpaína. La zimografía reveló bandas de actividad

proteolítica correspondiente a masa moleculares de ~114 kDa en homogenato de pollo, ~103 kDa en el homogenato de res y ~99 kDa en el homogenato de cerdo, a las 96 h *post mortem*, por el método A, provenientes de sobrenadantes sin concentrar. La calpaina presente en los homogenatos de estudio se autolisó en función del tiempo de almacenamiento. Por zimografía se revelaron bandas de actividad proteolítica correspondiente a masa moleculares de ~60 kDa para res, 57 y 51 kDa para pollo y 59 kDa para cerdo de los extractos por el método A, y de 57 y 49 kDa para pollo y 55 kDa para cerdo de los extractos por el método B de los sobrenadantes concentrados. Es indispensable para el empleo de esta técnica una concentración relativamente elevada de proteínas totales en el sobrenadante y realizar ensayos a pH ácido (~4,5), ya que las calpainas han arrojado actividad en ese rango de pH [4, 11]. La implementación de esta técnica como criterio para asegurar la ternura en la carne es factible, mas debe estandarizarse el procedimiento.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue subvencionado parcialmente por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo (CDCH-UC), N° CDCH-AM-031-11. Los autores agradecen la permisología otorgada para experimentar en los laboratorios de Bioquímica y Biotecnología del Dpto. de Biología-FACYT-UC. Se agradece también la asistencia técnica del personal especialista adscrito a ellos. Este trabajo contó con la colaboración académica de la Université de Toulouse, INP-ENSAT, Francia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ARTHUR, J.; MYKLES, L. Calpain zymography with casein or fluorescein isothiocyanate casein. **Meth. Mol. Biol.** 144:109-116. 2000.
- [2] BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72:248-254. 1976.
- [3] CAMOU, J.; MARCHELLO, J.; THOMPSON, V.; MARES, S.; GOLL, D. Effect of postmortem storage on activity of μ - and m-calpain in five bovine muscles. **J. Anim. Sci.** 85:2670-2681. 2007.
- [4] CHACÓN, A. La suavidad de la carne: Implicaciones físicas y bioquímicas asociadas al manejo y proceso agroindustrial. **Agron. Mesoamer.** 15(2):225-243. 2004.
- [5] GARCÍA, H. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. **Univer. Diag.** 1(2):31-41. 2000.
- [6] GOLL, D.; THOMPSON, V.; LI, H.; WEI, W.; CONG, J. The calpain system. **Physiol. Rev.** 83:731-801. 2003.
- [7] HUFF-LONERGAN, E.; ZHANG, W.; LONERGAN, S. Biochemistry of postmortem muscle — Lessons on mechanisms of meat tenderization. **Meat Sci.** 86:184–195. 2010.
- [8] KENT, M.; SPENCER, M.; KOOHMARAIE, M. Postmortem proteolysis is reduced in transgenic mice overexpressing calpastatin. **J. Anim. Sci.** 82:794-801. 2004.
- [9] KOOHMARAIE, M. Quantification of Ca^{2+} -dependent protease activities by hydrophobic and ion-exchange chromatography. **J. Anim. Sci.** 68:659-665. 1990.
- [10] KOOHMARAIE, M.; WHIPPLE, G.; KRETCHMAR, D.; CROUSE, J.; MERSMANN, H. Postmortem proteolysis in longissimus muscle from beef, lamb and pork carcasses. **J. Anim. Sci.** 69:617-624. 1991.
- [11] KOOHMARAIE, M. Effect of pH, temperature, and inhibitors on autolysis and catalytic activity of bovine skeletal muscle μ -calpain. **J. Anim. Sci.** 70:3071-3080. 1992.
- [12] KOOHMARAIE, M. Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. **Meat Sci.** 43S1:193-201. 1996.
- [13] LAGUNA, J.; PIÑA, E. "Estructura y propiedades de las proteínas" y "Funciones de las proteínas". **Bioquímica de Laguna**. 5ta Ed. México, Editorial El Manual Moderno. Pp. 145-151, 170-184. 2002.
- [14] LAEMMLI, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** 227:680-685. 1970.
- [15] LEE, H.; SANTÉ-LHOUELLIER, V.; VIGOROUX, S.; BRIAND, Y.; BRIAND, M. Role of calpains in postmortem proteolysis in chicken muscle. **Poult. Sci.** 87:2126-2132. 2008.
- [16] MOTTER, M.; CORVA, P.; KRAUSE, M.; PEREZ, M.; SORIA, L. Rol de la calpastatina en la variabilidad de la ternura de la carne bovina. **BAG, J. Basic Appl. Genet.** 20:15-24. 2009.
- [17] MORGAN, J.; WHEELER, T.; KOOHMARAIE, M. SAVELL, J.; CROUSE, J. Meat tenderness and the calpain proteolytic system in longissimus muscle of young bulls and steers. **J. Anim. Sci.** 71:1471-1476. 1993.
- [18] RAMÍREZ, J. Características bioquímicas del músculo, calidad de la carne y de la grasa de conejos seleccionados por velocidad de crecimiento. Barcelona-España. Universidad Autónoma de Barcelona. Tesis Doctoral. Pp. 4-16, 27-31, 49-50. 2004.
- [19] RASER, K.J.; POSNER, A.; WANG, K. K. W. Casein zymography: A method to study μ -calpain, m-calpain, and their inhibitory agents. **Arch. Biochem. Biophys.** 319:211–216. 1995.

- [20] SORIA, L.; CORVA, P. Factores genéticos y ambientales que determinan la terneza de la carne bovina. **Arch. Latinoam. Prod. Anim.** 12:73-88. 2004.
- [21] UZCÁTEGUI, S.; JEREZ, N. Factores que afectan la actividad de las proteasas dependientes del calcio y su relación con el proceso de ablandamiento de la carne. **Arch. Latinoam. Prod. Anim.** 16:177-186. 2008.
- [22] VEISETH, E.; KOOHMARAIE, M. Effect of extraction buffer on estimating calpain calpastatin activity in post-mortem ovine muscle. **Meat Sci.** 57:325-329. 2001.
- [23] VEISETH, E.; SHACKELFORD, S.; WHEELER, T.; KOOHMARAIE, M. Effect of postmortem storage on mu-calpain and m-calpain in ovine skeletal muscle. **J. Anim. Sci.** 79:1502-1508. 2001.
- [24] VEISETH, E.; SHACKELFORD, S.; WHEELER, T.; KOOHMARAIE, M. Indicators of tenderization are detectable by 12 h postmortem in ovine longissimus. **J. Anim. Sci.** 82:1428-1436. 2004.
- [25] WILKESMAN, J.; KURZ, L. Protease Analysis by Zymography: A Review on Techniques and Patents. **Recent Pat. Biotechnol.** 3:175-184. 2009.
- [26] WILKESMAN, J.; KURZ, L. Advances in zymography techniques and patents regarding protease analysis. **Recent Pat. Biotechnol.** 6:106-14. 2012.