

Nacameh

Publicación electrónica arbitrada en Ciencia y Tecnología de la Carne
cbs.izt.uam.mx/nacameh
ISSN 2007-0373

NACAMEH Vol. 9, No. 2, pp. 77-96, 2015

Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS como herramienta en el estudio de las proteínas miofibrilares. Una revisión.

Polyacrylamide gel electrophoresis-SDS as a tool to study myofibrillar proteins. A review.

María de Lourdes Pérez-Chabela¹✉, Jorge Soriano-Santos¹, Edith Ponce-Alquicira¹, Lourdes Mariana Díaz-Tenorio²

¹*Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina. Delegación Iztapalapa. CP 09340. México, D.F.* ²*Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias. Instituto Tecnológico de Sonora. 5 de Febrero 818 Sur, Col. Centro C.P. 85000. Cd. Obregón, Sonora.* ✉ *Autor de correspondencia: lpch@xanum.uam.mx.*

Resumen

Las proteínas miofibrilares forman parte de la estructura del músculo de animales terrestres y marinos. Sin embargo, aun cuando se trate del mismo tipo de proteínas, su estructura, tiempo de *rigor mortis*, así como los procesos bioquímicos en los que participan, son distintos en las diferentes especies animales. Esta revisión tiene como objetivo describir las ventajas de la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés) en el estudio de la estructura de las proteínas miofibrilares, así como la influencia de la variación de los parámetros de la técnica sobre el resultado del perfil electroforético. Se describen, además, las aplicaciones que tiene como herramienta de diagnóstico para estudios en el área de la ciencia de los alimentos, ecología y salud.

Palabras claves: SDS-PAGE, proteínas musculares, animales terrestres, animales marinos.

Abstract

Myofibrillar proteins are part of land and sea animals muscle. Nonetheless, even when muscle proteins are the same type of proteins, their structure, *rigor mortis* time, and biochemical process associated to muscle to meat conversion, are different among animal species. This review has the aim to describe the advantages of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in the study of myofibrillar proteins structure, besides the influence of many parameters on this technique to obtain an electrophoretic profile. Applications of this technique as a diagnostic tool in the food science, ecology and health are described as well.

Key Words: SDS-PAGE, muscle proteins, land animals, sea animals.

INTRODUCCIÓN

Estructura del músculo

La carne se compone además de músculo, de cantidades variables de todos los tipos de tejido conectivo, así como algo de tejido epitelial, nervioso, adiposo y óseo. La unidad estructural del músculo esquelético es una célula muy especializada llamada fibra muscular (Fig. 1), las fibras musculares a su vez están compuestas de miofibrillas, éstas son bastoncitos cilíndricos largos y finos de aproximadamente 1-2 μm de diámetro, su eje mayor es paralelo al de la fibra muscular, se extienden a todo lo largo de la fibra (Forrest y col., 1974). Las miofibrillas contienen una unidad que se repite a lo largo y se llama sarcómero, en el sarcómero (Price y Schweigert, 1981) se puede observar una banda clara compuesta de actina y otra oscura compuesta de miosina, la banda clara está dividida por una línea en forma de zig-zag que se llama línea Z (Vigoreaux, 1994). La longitud del sarcómero varía pero se puede admitir una longitud de 2.5 μm . En el sarcómero también se aprecian la zona H y la línea M. La fibra muscular es multinucleada y con los componentes típicos de cualquier célula; membrana, citoplasma, ribosomas, mitocondrias, complejo de Golgi, etc. (Sayas-Barberá y Fernández-López, 2006).

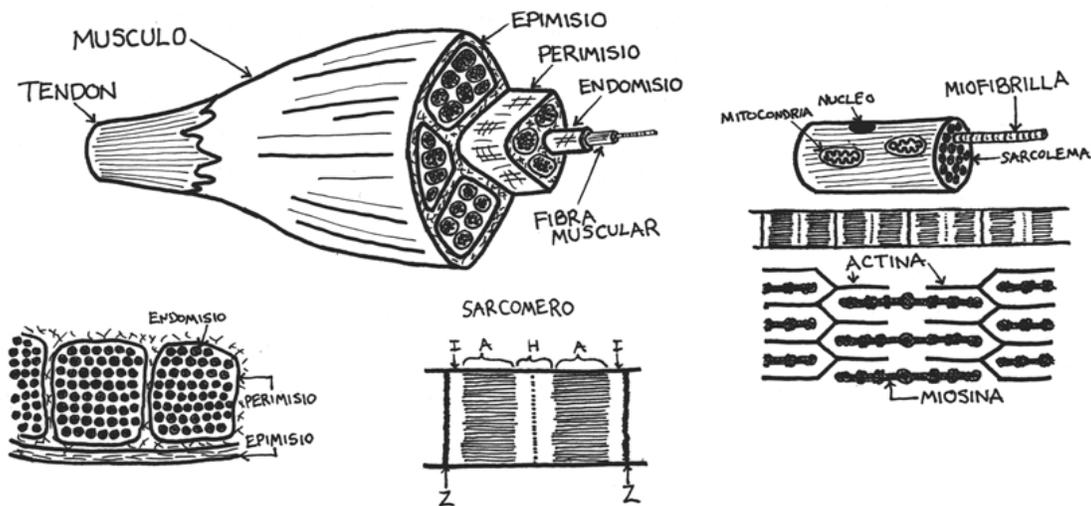


Figura 1. Estructura del músculo y proteínas musculares de animales terrestres

El tejido muscular de los animales marinos, al igual que en los animales terrestres, está compuesto de por músculo estriado. La diferencia con los músculos de animales terrestres es que el tejido muscular está constituido por bloques de músculo adyacentes llamados miómeros o miótomos, corriendo las fibras musculares de manera paralela. La unión de los miótomos por tejido conectivo se denomina miosepto (Totosaus y Kuri, 2009) (Fig. 2).

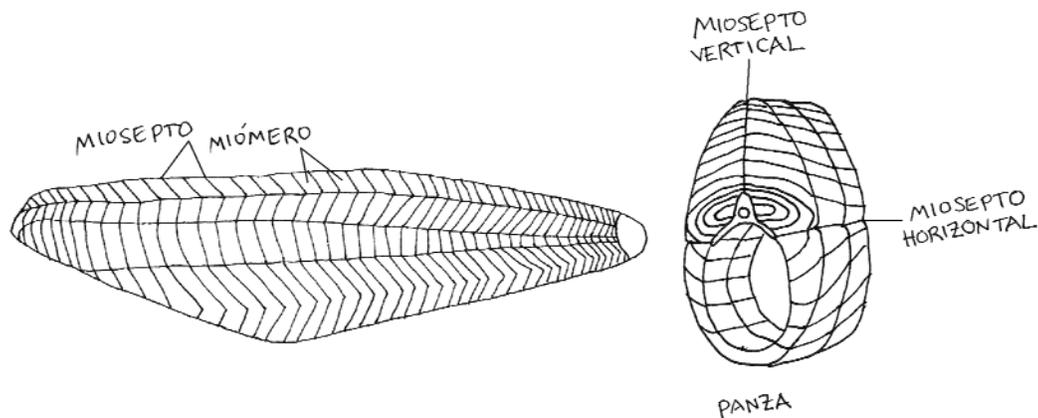


Figura 2. Estructura del músculo de animales marinos

Proteínas de la fibra muscular

Las proteínas del músculo tanto de animales terrestres como de origen acuático se clasifican en: proteínas sarcoplásmicas (solubles en agua) como ejemplo de éstas, tenemos a la mioglobina y enzimas que participan en procesos metabólicos; proteínas miofibrilares (solubles en soluciones salinas concentradas, como ejemplo, miosina y actina; y las proteínas del tejido conectivo o del estroma (insolubles en soluciones salinas concentradas. Lawrie, 1974).

Proteínas sarcoplásmicas

Las proteínas sarcoplásmicas constituyen el 35% del total de las proteínas, son solubles en agua y se encuentran en el citoplasma celular, en este grupo se encuentran las catepsinas, la mioglobina y las enzimas de la glucólisis (Forrest y col., 1974).

Proteínas del tejido conectivo

Las fibras musculares de animales terrestres se encuentran dispuestas de una forma característica debido a una serie de componentes del tejido conectivo que actúan tanto de envoltura como de elemento de separación, siendo éste el responsable de la dureza de la carne (Greaser y Warren, 2011).

El tejido conectivo recubre las diferentes partes del músculo en capas llamadas epimisio, perimisio y endomisio (López de Torre y Carballo, 1991). Este tejido se encuentra en forma de láminas o bandas compuestas de hilos de fibras formadas de tres tipos de proteínas; colágena, elastina y reticulina (Ouali, 1990). La colágena es una de las pocas proteínas que contiene grandes cantidades de hidroxiprolina y es la proteína más abundante del tejido conectivo, está formada por 3 moléculas de tropocolágena unidas por enlaces de lisina

(Lawrie y Ledward, 2006). Los animales jóvenes tienen mayor cantidad de colágena pero menor número de enlaces de lisina y los animales viejos tienen menor porcentaje de colágena pero con mayor número de enlaces (López de Torre y Carballo, 1991). En los peces, la colágena no se hace más resistente con la edad, por lo que no se ve afectada su dureza. El tejido conectivo de los peces es más débil que el de los mamíferos y las aves. Tiene menor contenido de colágena, está menos polimerizado y se gelatiniza a 40°C a diferencia de los animales terrestres que gelatiniza a temperaturas mayores a 75°C, es por esto que durante la cocción del pescado, la estructura se degrada y se desprenden en forma de escamas (Sayas-Barberá y col., 2009).

Proteínas miofibrilares

Las proteínas miofibrilares constituyen alrededor del 55-60% de las proteínas del músculo, basada en sus funciones fisiológicas dentro del músculo, las proteínas miofibrilares pueden clasificarse en proteínas contráctiles y proteínas reguladoras (Forrest y col., 1974).

Las proteínas contráctiles son la miosina y la actina, las cuales están directamente relacionadas en el ciclo de la contracción/relajación del músculo vivo. Las proteínas reguladoras no están relacionadas directamente con la estructura de la fibra pero tienen una función reguladora muy importante en la contracción. Las proteínas reguladoras se dividen en dos grupos: las proteínas reguladoras mayores y las proteínas reguladoras menores (Lawrie, 1974). La composición de proteínas miofibrilares es la misma en animales de tierra que en marinos. En la Fig. 3 se muestran las proteínas miofibrilares del músculo.

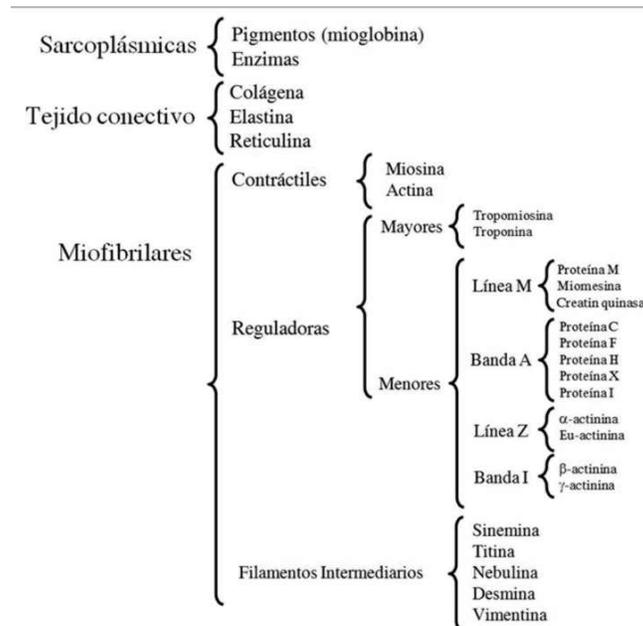


Figura 3. Clasificación de las proteínas musculares

Fundamento de la Electroforesis

La electroforesis es una herramienta que se utiliza para la separación, identificación y purificación de proteínas. En un principio se utilizaron geles de almidón, pero posteriormente se reemplazaron por geles de poliacrilamida, impartiendo a las proteínas una carga negativa, misma que ocasiona que migren al ánodo de un circuito eléctrico. El principio que se utiliza en electroforesis se fundamenta en la atracción de cargas eléctricas. Cuando una proteína presenta una carga eléctrica neta, en un campo eléctrico se desplazará al electrodo con carga contraria. La velocidad de migración es proporcional a la relación entre las cargas de la proteína y su masa. Cuanto mayor carga por unidad de masa, más rápida será la migración.

Formación y características de los geles de poliacrilamida

Existen diferentes técnicas y aparatos para el uso de la separación y purificación de proteínas por electroforesis. Sin embargo, la técnica más empleada es la formación de una placa de gel de poliacrilamida en la que se utiliza el método desarrollado por Laemmli (1970). En este método se lleva a cabo la preparación de placas de gel de poliacrilamida que contienen dodecil sulfato de sodio, denominando esta técnica como "SDS-PAGE", por las siglas en inglés de *Sodium Dodecil Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis*. Las placas de gel de poliacrilamida se forman por la co-polimerización de la acrilamida para lo cual se utiliza un agente entrecruzador como la N,N'-metilen bis-acrilamida en presencia de un catalizador de ion persulfato en forma de persulfato de amonio y un iniciador como TEMED (N,N,N,N'-tetrametilendiamina). La polimerización depende de la temperatura. Se recomienda utilizar una temperatura por encima de los 20°C para prevenir una polimerización incompleta. La polimerización se debe realizar en una atmósfera inerte ya que el oxígeno puede actuar como un neutralizador de radicales libres, generados por el ión persulfato, por lo que se deben utilizar cámaras verticales que dispongan de dos placas de vidrios selladas o en tubos para formar geles en disco (Disc gel) y de esta manera disminuir la absorción de oxígeno por los geles. Las soluciones de acrilamida se desgasifican pues el oxígeno es un inhibidor de la polimerización. Además, durante la polimerización se libera calor que podría provocar la formación de burbujas en el seno del gel. En la electroforesis en disco, también se emplea riboflavina para polimerizar la acrilamida. La polimerización se lleva a cabo utilizando radiación que va desde la azul hasta la ultravioleta (UV), una lámpara fluorescente es suficiente para este fin. De este modo, la co-polimerización de la acrilamida se lleva a cabo por foto-polimerización (Davis, 1964; Wengenmayer y col., 1974). La velocidad de polimerización está determinada por la concentración de persulfato de amonio y TEMED. Mientras que la porosidad del gel, la determinan las proporciones relativas de poliacrilamida (C) y bis-acrilamida (T), siendo menor el poro cuanto más bisacrilamida haya en relación a la concentración de acrilamida. El porcentaje total de acrilamida/bis-acrilamida determina el rango de separación del gel. Habitualmente los geles se denominan en función del % de acrilamida/bisacrilamida que

contienen. Así, la mayoría de las proteínas se separan bien en el rango de 5 a 10%. Un menor porcentaje (mayor tamaño de poro) es mejor para separar proteínas de gran tamaño.

Las siguientes formulas se utilizan para determinar el tamaño de poro, a través del control de la concentración total de T y de C:

$$T = [a+b/V] 100(\%)$$

$$C = [b/a+b] 100(\%)$$

Donde "a" es la masa de acrilamida en gramos, "b" es la masa de bis-acrilamida en gramos y "V" es el volumen en mL. Cuando C permanece constante y T incrementa, el tamaño del poro disminuye. Cuando T permanece constante y C incrementa, el tamaño del poro sigue una función parabólica: a altos y bajos valores de C, el tamaño de los poros son grandes, obteniéndose el menor tamaño de los poros a C= 5% (Hjertén, 1962). Una vez seleccionado el tamaño de poro del gel, el análisis de proteínas puede realizarse en función del estado de las proteínas: nativo o desnaturizado. Por lo tanto, la técnica electroforética suele clasificarse en: electroforesis en condiciones nativas o desnaturizantes.

La electroforesis desnaturizante, la más común, también conocida como SDS-PAGE, debido a que se utiliza el detergente dodecil sulfato de sodio o SDS. Este tratamiento asegura la desnaturización total de la proteína por pérdida de su estructura tridimensional. Un tratamiento de la proteína con 2-mercaptoetanol, a 100°C durante 5 min, provoca la reducción de puentes disulfuro y como consecuencia una separación de las cadenas polipeptídicas. A su vez, la cadena hidrocarbonada hidrófoba del SDS rodeará a las cadenas polipeptídicas, ya separadas, orientando el ion sulfato, hidrofílico, con carga negativa hacia el medio acuoso. De esta manera todas las cadenas polipeptídicas adquieren una carga negativa neta y todas las cadenas polipeptídicas quedan aisladas.

La migración es proporcional a la carga y al tamaño de la molécula pero no a su forma. La separación de los complejos SDS-proteína es proporcional solo a la masa de la proteína pues todas tienen la misma carga por unidad de masa. Se puede entonces determinar el peso molecular aparente de cualquier proteína por comparación con un patrón de proteínas de pesos moleculares conocidos. Las movilidades de las proteínas en los geles de SDS-PAGE son funciones lineales del logaritmo de su peso molecular (Weber y Osborne, 1969).

La electroforesis nativa o en condiciones no desnaturizantes (PAGE nativa), es la que somete a las proteínas a migración sin desnaturización. En esta situación las proteínas migran en función de su carga, de su tamaño y de su forma. Además se mantienen, en ciertos casos, las interacciones entre subunidades y entre proteínas. Las proteínas se mantienen en una solución amortiguadora no reductor-no desnaturizante con lo que se asegura que las proteínas mantienen la estructura secundaria y su densidad de carga

nativa (Arndt y col., 2012). Los sistemas amortiguadores empleados en estos casos son: tris-glicina (pH 8.3 a 9.5), tris-borato (pH 7.0 a 8.5) y tris-acetato (pH 7.2 a 8.5).

Sistemas de soluciones amortiguadoras usadas en electroforesis

La corriente eléctrica en la electroforesis se aplica, principalmente, por los iones que contienen las soluciones amortiguadoras que se emplean durante la separación de proteínas. Las soluciones amortiguadoras suministran los iones que acarrearán la corriente, mantienen el pH deseado y son disipadoras del calor que se genera durante el proceso. En los sistemas nativos, las soluciones amortiguadoras proporcionan el pH que se requiere para mantener la actividad biológica de las proteínas.

Las soluciones amortiguadoras para la electroforesis se han clasificado como continuas o discontinuas, dependiendo si se utiliza una o varias soluciones amortiguadoras durante el corrimiento de la electroforesis. Cuando las soluciones proteínicas para el análisis electroforético son muy diluidas, el sistema discontinuo es el más aconsejable; mientras que cuando se tienen concentraciones por arriba de 1 mg/mL, se recomienda utilizar el sistema de solución amortiguadora continuo para una mejor separación de proteínas (Chen y col., 1978).

El sistema de solución amortiguadora continuo utiliza las mismas soluciones amortiguadoras, a un pH constante, en el gel, muestra y reservorio de los electrodos de la cámara de electroforesis. En este sistema la muestra se carga directamente en el gel en el cual se llevará a cabo la separación de proteínas, ésta se realiza por la diferencia en la movilidad de las proteínas en el campo eléctrico. Casi cualquier solución amortiguadora puede usarse en este tipo de electroforesis, pero se prefieren aquellas de baja fuerza iónica porque no genera tanto calor durante la migración de las proteínas en el gel. La selección de la solución amortiguadora dependerá de las características de la proteína a analizar. De manera general la concentración de la solución amortiguadora está en el rango de 0.01 a 0.1 M.

Los sistemas de solución amortiguadora discontinuos, también conocidos como sistemas de solución amortiguadora multifásicos, emplean diferentes iones en el gel y los electrodos. Estos sistemas están diseñados para aumentar la zona de inicio en separaciones de alta resolución, aún con muestras diluidas. El aumento de las muestras en la zona de inicio se llama "empaquetamiento" o concentración de la muestra de proteínas. Es un fenómeno electroquímico basado en la diferencia de movilidades entre las proteínas y los iones de la "solución amortiguadora del frente" que contiene un colorante para localizar la migración de los iones de la solución amortiguadora en el gel, ayudando a su visualización. Las muestras se diluyen en la solución amortiguadora del gel, de tal forma que las proteínas quedarán entre las soluciones amortiguadoras del gel y el de los electrodos, conocida como "solución amortiguadora de la cola". Cuando se aplica el campo eléctrico, los iones del frente se mueven por delante de las proteínas a separar,

mientras que los iones de la solución amortiguadora de los electrodos migran por detrás de las proteínas. En el empaquetamiento de las proteínas éstas quedan entre los iones de las soluciones amortiguadoras del frente y de la cola de manera que disminuyen la movilidad de las proteínas. Los geles que se utilizan en este sistema de solución amortiguadora se dividen en dos segmentos. El gel más pequeño, que se coloca en la parte superior, se conoce como gel de empaquetamiento de poros más grandes en comparación al gel de resolución (o gel de separación), el cual se coloca inmediatamente después del anterior, sirve también como un medio anticonvectivo durante el proceso de empaquetamiento. La separación de proteínas se lleva a cabo en el gel de resolución o separación de un tamaño de poro similar al tamaño de las proteínas de interés. Una vez que entran las proteínas en el gel de separación, su velocidad de migración disminuye por el efecto de tamizado que realizan los poros pequeños del gel. Las proteínas se separan con base a su tamaño y carga (Hjertén y col., 1964).

Utilización de la electroforesis en la separación de proteínas miofibrilares

Muchas de las técnicas electroforéticas se utilizan tanto en animales terrestres como en el origen marino, sin embargo, existen diferencias debido a su estructura, proceso, etcétera. Entre algunos beneficios de la electroforesis en la separación de proteínas miofibrilares en animales terrestres y de origen marino podemos mencionar:

- Acción de proteasas en la degradación de proteínas miofibrilares
- Identificación de especies
- Electroforesis en la predicción de propiedades tecnofuncionales de las proteínas de la fauna de acompañamiento
- Identificación de alérgenos en alimentos de origen acuático

Acción de proteasas en la degradación de proteínas miofibrilares

Animales terrestres

La conversión de músculo a carne es un proceso químico-enzimático que sucede después de la muerte del organismo, su proceso es dependiente de la temperatura, así como de las condiciones *antemortem* y de sacrificio. Básicamente el proceso involucra variaciones en el pH del músculo, ocasionando modificaciones en las proteínas, la disminución del pH se traduce en un endurecimiento (*Rigor mortis*) del músculo, posteriormente por la acción de proteasas endógenas se produce un ablandamiento (resolución). Durante el almacenamiento *postmortem* la textura de la carne puede modificarse por acción de proteasas (endógenas y exógenas) en este punto, la electroforesis es una herramienta útil, ya que puede evidenciar los cambios en las proteínas del músculo, de tal manera que podemos predecir cambios en la textura de la carne (Cheng y col., 2014; Jiang, 1998). La degradación de proteínas miofibrilares como titina, nebulina, troponina T, desmina, filamina y vinculina ha sido reportada desde hace ya varios años, esto es porque éstas

proteínas se ha visto que son degradadas durante el almacenamiento *postmortem* (Hopkins, 2001). Claeys y col. (1995) utilizaron dos diferentes concentraciones de geles de SDS-PAGE: uno con una concentración de acrilamida al 8% para proteínas con pesos moleculares del rango de 20-200 kDa y el segundo gel con un porcentaje de acrilamida del 4% para proteínas de 50-1000 kDa como la titina. De esta manera se ha podido identificar carne de res, carnero, venado y conejo. Es un método adecuado para carnes tratadas hasta 100°C, puesto que a temperaturas más elevadas, las bandas de proteínas pueden desaparecer.

Después de la muerte empiezan a actuar principalmente, dos sistemas enzimáticos: las catepsinas y las calpaínas. Las catepsinas son enzimas ácidas que normalmente actúan durante la maduración de la carne, las calpaínas, por otra parte, son enzimas neutras que maximizan el efecto de las catepsinas, las calpaínas necesitan calcio para ser activadas. González-Tenorio y col. (2004) utilizaron electroforesis en geles de poliacrilamida para conocer la degradación de proteínas miofibrilares causada por calpaínas, en músculos duros de bovinos, ellos encontraron que existe una alta degradación al día 5, donde las proteínas localizadas en la línea Z, α -actinina entre ellas, tiende a desaparecer o sufrir degradación durante el tiempo de almacenamiento. Posteriormente, Pérez-Chabela y col. (2005) estudiaron la activación de las calpaínas marinando carne de 4 especies: bovinos, caballo, gallina y conejo con cloruro de calcio. La degradación de las proteínas por las calpaínas se estudió mediante SDS-PAGE: La electroforesis mostró que las calpaínas se activaron y degradaron ciertas proteínas, con diferentes grados de acción debido a diferencias inherentes del animal. Todas las especies muestran un incremento en el número de bandas de peso molecular grande (arriba de 200 kDa). Bovino y caballo son las especies más afectadas por la marinación con calcio, en donde aparecen una gran cantidad de bandas de pesos moleculares pequeños, así como la aparición de un componente 30kDa, resultado de la degradación de la troponina. La actividad de las calpaínas tiende a ser mayor en especies grandes (caballo y bovino) que en pequeñas (conejo y gallina) esto tal vez debido a su corto tiempo de *Rigor mortis* (Fig. 4).

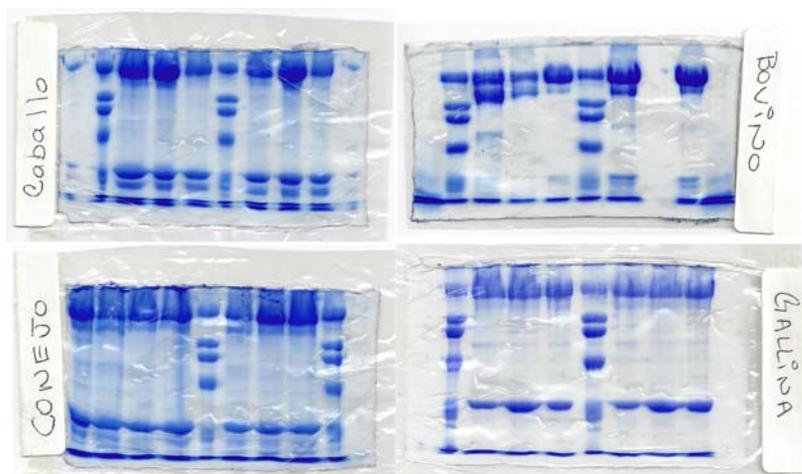


Figura 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de diferentes especies animales.

De Castro y col. (2008) estudiaron como se modifica la estructura de las miofibrillas y proteínas sarcoplásmicas en pollos utilizando como herramienta SDS-PAGE cuando son sometidos a estrés antes del sacrificio, el estrés causa un patrón de fragmentos específicos de proteínas miofibrilares, como la aparición de la troponina T, sin embargo, los valores de fuerza de corte no son alterados. Choi y col. (2010) estudiaron las variaciones en las isoformas de la cadena pesada de la miosina, tipo de fibras musculares y calidad de la carne de cerdo, aunque la desnaturalización de las proteínas miofibrilares ha sido estudiada por electroforesis de una dimensión y Western-blot, en este estudio utilizaron electroforesis de dos dimensiones (2-D). Sus resultados mostraron que los músculos tienen una alta degradación a los 45 min *postmortem*, la electroforesis 2-D mostró buenos resultados sobre todo para separar las isoformas de la troponina T la cual es muy compleja, esta proteína ha sido reportada como marcador para examinar la proteólisis *postmortem*. El efecto de la maduración de carne de cordero empleando electroforesis SDS-PAGE fue estudiado por Torres y col. (2012) ellos encontraron evidencia de que el *Rigor mortis* terminaba a las 16 h de sacrificado el animal y después de éste tiempo empezaba la proteólisis al degradarse gradualmente la desmina, titina y troponina T, esta última proteína se empieza a degradar a las 20 h y desaparece a los 7 días y está demostrado que esta proteína es un buen sustrato de las calpaínas, en este estudio también utilizaron 2 concentraciones de acrilamida 12 y 15% para identificar los pesos moleculares de las proteínas, los cuales coincidieron con los reportados por otros autores. Las proteínas de muy alto peso molecular (subunidades arriba de 200 kDa) son muy difíciles de separar en geles de poliacrilamida, esto se ha tratado de solucionar usando geles con muy baja concentración de acrilamida, acrilamida mezclada con agarosa o gradientes de acrilamida, sin embargo, los geles son difíciles para usar porque se distorsionan y rompen fácilmente durante el manejo. Para estas proteínas se debe de utilizar un gel vertical de agarosa, con esto las proteínas de pesos moleculares entre 200 y 4,000 kDa pueden ser claramente separadas, este sistema es extensivamente utilizado en muestras de músculo (Greaser y Warren, 2011). La electroforesis también ha sido usada para estudiar el efecto de las altas presiones en músculos *Longissimus dorsi* de bovino. Las altas presiones son un método de conservación cuyo uso se ha incrementado en la industria de la carne, esto debido a que puede extender la vida de anaquel y aumentar la calidad de la carne y propiedades funcionales (Ma y col., 2011).

Animales marinos

La calidad de los productos acuáticos puede definirse como las características que hacen que el consumidor prefiera el producto, se compone de características externas como apariencia, textura, color y sabor, o internas como variables físicas, químicas, microbiológicas y de inocuidad (Hardy y Lee, 2010). La calidad organoléptica se mide por métodos sensoriales o instrumentales, cada uno con sus ventajas y desventajas, por lo que

se recomienda siempre relacionar los dos resultados obtenidos. Para los productos de origen acuático, una de las características organolépticas más empleadas es la textura, se considera que es la interpretación sensorial y expresión de la estructura interna de la carne. Se evalúa sometiendo la muestra a pruebas mecánicas, la respuesta puede indicarnos características como dureza/firmeza, gomosidad, resiliencia, cohesividad, entre otras (Cheng y col., 2014). Pornra y col. (2007) evaluaron el cambio de textura de la carne del crustáceo de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii* almacenado a bajas temperaturas; se realizaron análisis (sensoriales e instrumentales) de textura, microbiológicos, histológicos, enzimáticos y electroforéticos por SDS-PAGE. Analizando las proteínas separadas en los geles de poliacrilamida, se observó que las bandas correspondientes a la cadena pesada de miosina y a la actina permanecieron sin cambios hasta el día 3 de almacenamiento a 5 °C, la concentración de éstas disminuyó significativamente los siguientes días. Estos resultados fueron consistentes con el incremento en la actividad proteolítica, la evidencia histológica mostró una ruptura gradual de la línea Z de los sarcómeros (degradación de las miofibrillas), así como una ruptura de mitocondrias. El conjunto de procesos ocasiona una pérdida en la integridad de las proteínas responsables de la firmeza de la carne, este ablandamiento se ve reflejado en la disminución de valores en evaluaciones sensoriales e instrumentales de la textura.

Posteriormente, Sriket y col. (2012) encontraron la solución a la pérdida de firmeza mediante el uso de leguminosas. Ellos demostraron que cuando se inyectaron extractos acuosos de semillas de soya o de bambara, la carne del crustáceo *Macrobrachium rosenbergii* almacenado en hielo, no sufrió cambios drásticos en valores del esfuerzo al corte, así como en la aceptabilidad. Los inhibidores presentes en las leguminosas disminuyeron o frenaron la actividad proteolítica de las enzimas endógenas, así como el crecimiento de bacterias psicrófilas. En SDS-PAGE se observó que las proteínas musculares del control permanecieron sin cambio hasta el día 6, a este día se observó una ligera disminución en la concentración de la banda correspondiente a la cadena pesada de la miosina (CPM), el siguiente cambio significativo se presentó del día 8 al 10 con una considerable disminución en la CPM; se asume que los cambios son resultado de la hidrólisis de proteínas, pues a partir del día 4 se presenta un aumento gradual de la actividad de proteasas, así como la pérdida de preferencia del producto. El resto de las proteínas miofibrilares permanecieron sin cambio, esto debido a que la actina, troponina y tropomiosina son menos susceptibles a la proteólisis. Finalmente, al concluir el experimento (día 10), se observaron unas ligeras modificaciones en la CPM de muestras tratadas con los extractos de leguminosas, por lo que se infiere que la reacción sólo se retrasa, esto porque el tipo de inhibición presentada es reversible.

La electroforesis también se emplea para evaluar el efecto del almacenamiento en la miosina en productos ahumados y marinados, estos métodos se emplean para preservar la calidad sanitaria, así como mejorar la calidad sensorial (olor-sabor); sin embargo los

tratamientos que implican cambios de calor, de pH y de concentraciones de sales, desnaturalizan las proteínas de la carne. Este tipo de evaluaciones se realizaron en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) cruda, ahumada y marinada (NaCl y ácido acético), almacenada a 4 °C durante 9 semanas (Baylan y col., 2015). Los resultados revelaron que en trucha cruda los patrones proteicos cambian después de la segunda semana de almacenamiento a 4 °C. Para el caso de las muestras ahumadas y preservadas a 4 °C, la concentración de las bandas disminuye en la semana 4, algunas bandas desaparecen completamente en la semana 8 y 9. En las truchas marinadas se observó que la intensidad de las proteínas de peso molecular mayor a 116 kDa disminuyó a partir de la tercera semana. Otras proteínas miofibrilares de menor peso molecular se comienzan a degradar durante la segunda y tercera semana, incluso algunas proteínas desaparecen antes de llegar a la semana 9. Para el caso de la actina, se mantuvo estable hasta la semana 7, para degradarse en las siguientes semanas. Si bien estos autores no realizaron correlaciones con evaluaciones de textura, podemos inferir que la textura cambiará a medida que el perfil proteico se modifique.

Siguiendo con los métodos de conservación los tratamientos de secado son ampliamente usados, la aplicación o disipación de calor tiene efecto en las proteínas, por consiguiente en las propiedades funcionales de estas. Deng y col. (2015) secaron filetes de calamar (*Todarodes pacificus*) usando tres métodos: aire caliente, bomba de calor y liofilizado. Para medir el efecto de los tratamientos en la miosina se realizaron separaciones en geles de electroforesis (SDS-PAGE), de los resultados se analizaron los cambios en la cadena pesada de miosina (CPM) de 250 kDa, la meromiosina pesada (MMP) de 170 kDa, la meromiosina ligera (MML) de 100 kDa y la tropomiosina de 43 kDa. El perfil proteico en el tratamiento L es similar al control, solo desaparece la banda correspondiente a la CPM, así mismo se observa un incremento en la concentración de MMP y MML, por lo que se deduce que durante el proceso de liofilización la CPM se degrada. Los tratamientos de secado AC y BC también muestran ausencia de CPM, el perfil del tratamiento por aire caliente muestra un incremento significativo en la banda correspondiente a la tropomiosina y el perfil de BC muestra un incremento en MML, lo que hace suponer que bomba de calor es un tratamiento menos agresivo para las proteínas miofibrilares. Apoyándose en ensayos de digestibilidad *in vitro*, se infiere que la proteína es significativamente más digerible si se liofiliza o se trata con bomba de calor, por el contrario el secado con aire caliente disminuye considerablemente.

Con los estudios presentados se demuestra que la separación de proteínas miofibrilares en SDS-PAGE es útil en alimentos, ya que es posible demostrar el efecto de los procesos para la mejora de la calidad de los mismos. Mediante esta herramienta es posible predecir los cambios en la estructura tisular, así como en la textura.

Electroforesis en la identificación de especies

Para la identificación de especies se utilizan métodos de electroforesis y electroenfoque, así como variantes de estos procedimientos, especialmente donde las especies individuales de carne o pescado son de interés. Desde hace años la identificación de especies para alimentos ha cobrado mayor importancia, esto se debe a la desconfianza que tiene el consumidor en el origen, composición y procesamiento de los alimentos. Los análisis de identificación de especies tienen como objetivo el autenticar al alimento, característica importante para consumidores con requerimientos especiales, tal es el caso de personas con ciertas creencias religiosas, quienes desean estar seguros que sus alimentos están libres de partes animales restringidas para su consumo. También es importante para los que padecen alergia a la carne de algún tipo de animal, o incluso si se sospecha que el producto es ilegal, pues el origen de la carne puede ser de alguna especie protegida o en peligro de extinción, finalmente, también puede servir para identificar fraudes en alimentos, certificando que el producto realmente está elaborado con la carne que se declara. Los métodos frecuentes aplicados para la identificación de especies, son basados en diferentes índices, y por consiguiente, los resultados obtenidos con estos métodos no pueden ser comparados en la práctica. El principio de estos métodos es mostrar la presencia de constituyentes típicos del tejido muscular de una especie determinada. Los siguientes métodos pueden ser empleados para determinar las especies que contiene la carne: Métodos electroforéticos, inmunológicos, cromatográficos y genéticos. Para identificar las proteínas miofibrilares: miosina, actina, α -actinina, tropomiosina y troponina, la SDS-PAGE es una buena opción (Montowska y Pospiech, 2007). Ortea y col. (2012) escribieron una revisión sobre las herramientas bioquímicas que se emplean para autenticar especies de crustáceos, encontraron que es posible distinguir entre géneros de camarones y cangrejos, comparando patrones de proteínas sarcoplásmicas (separadas con SDS-PAGE) sin embargo, no se pueden diferenciar especies del mismo género. Por el contrario si se emplean técnicas de isoelectroenfoque en proteínas sarcoplásmicas de camarón, podemos distinguir entre diferentes especies comerciales, incluso pueden emplearse en productos procesados térmicamente, esto gracias a una proteína que liga Ca^{+2} y presenta un punto isoeléctrico entre 4 y 5. Con relación a especies de agua dulce, tenemos que en el mercado europeo se venden filetes de “perca” congelados, estos pueden ser de perca europea (mayor costo y demanda), perca del Nilo, lucioperca o un híbrido de lubina. Algunos comercializadores aprovechan la imposibilidad de reconocer a simple vista la especie de origen y venden como filetes de perca europea la carne de las especies antes mencionadas. Realizando una electroforesis 2D y analizando las manchas en los patrones proteicos, se observa que en la región ácida se encuentran proteínas especie-específica. Por ejemplo para el caso del híbrido de lubina (*Sunshine bass*) es muy fácil identificarla por la presencia de 5 manchas de proteína que

no se presenta en el resto de las “percas”; por el contrario existen 7 puntos de proteína que son comunes a las especies puras de perca; lo anterior nos ayuda en caso de querer distinguir entre un filete de una especie pura o un híbrido (Montowska y Pospiech, 2007).

Electroforesis en la predicción de propiedades tecnofuncionales de las proteínas de la fauna de acompañamiento

Debido al incremento mundial en el consumo de especies acuáticas, la industria alimentaria se ha enfrentado a varios retos, por mencionar algunos, tenemos el aprovechamiento de la fauna de acompañamiento de especies comerciales. Durante la pesca se capturan especies de bajo o nulo valor comercial, pero en su músculo presenta proteínas con propiedades deseables a nivel alimentario, esto es, presentan un gran valor nutricional, incluso pueden presentar propiedades funcionales ideales para la elaboración de alimentos. Dentro de las tecnologías para la extracción y conservación de estas proteínas se encuentra la elaboración de pasta de pescado picado, surimi y aislados de proteínas (Azadian y col., 2012). El surimi es carne de pescado que fue molida y lavada para eliminar los sabores y olores característicos, está compuesto de proteína miofibrilar soluble en soluciones salinas, presenta propiedades únicas de formar geles, esta característica es útil para producir sucedáneos. La fuerza de gel del surimi se debe a dos factores: la formación de una red de entrecruzamiento entre la cadena pesada de la miosina, esta reacción es catalizada por la transglutaminasa (TGasa) endógena, y a la formación de enlaces covalentes y puentes disulfuro. La formación del gel depende del ajuste de la temperatura (suwari) de gelificación, este factor es dependiente de la especie (Benjakul y col., 2003), quiere decir que la gelificación de las proteínas miofibrilares de una especie adaptada al frío, será distinta a la de una especie de aguas tropicales. Araki y Seki (1993) utilizaron la SDS-PAGE al 10% como herramienta para evidenciar el desarrollo de la polimerización de la miosina por acción de la TGasa, los geles mostraron un aumento en número y concentración de bandas con mayor masa que la cadena pesada de la miosina, concluyendo que el grado de polimerización era dependiente del tiempo de incubación. Así mismo usando geles al 1.8% demostraron que la especie es un factor importante en la polimerización de la miosina, ya que bajo las mismas condiciones las proteínas del bacalao (*Gadus chalcogrammus*) y las de carpa (*Cyprinus carpio*) no presentaron el mismo grado de polimerización para formar el gel de surimi. La especie de bacalao citada presentaba un mayor número y concentración de bandas que en carpa. Estudios subsecuentes en especies tropicales: *Nemipterus bleekeri*, *Priacanthus tayenus*, *Sphyrna jello* y *Pennahai macrophthalmus* (Benjakul y col., 2003) demostraron la importancia de la incubación previa a 25 °C para formar los geles de surimi. Comparando con el control (sin incubación) se observó una disminución de la concentración de la cadena pesada de la miosina, en las especies *P. tayenus*, y *S. jello* se presentó más este fenómeno, coincidentemente los geles de estas especies presentaron una mayor fuerza de ruptura de gel y grado de

deformación, lo que indica que la miosina se polimerizó para formar un gel que es resistente.

El surimi no es la única manera de aprovechar a las especies de bajo valor comercial, también es posible preparar los aislados de proteína de pescado (APP), éstos se preparan solubilizando la proteína del músculo a diferentes valores de pH, con esta alternativa es posible separar proteínas indeseables del músculo. La principal ventaja es que el rendimiento es mayor, ya que se recuperan las proteínas musculares que se encuentran adheridas a piel y hueso, otro beneficio radica en la posibilidad de recuperar otras proteínas como las sarcoplásmicas, hemoglobina, mioglobina, proteasas, entre otros; finalmente la posibilidad de reducir la cantidad de lípidos neutros y los membranales, contribuye a reducir la tasa de oxidación de lípidos. Azadian y col. (2012) compararon las propiedades funcionales de la pasta molida, el surimi y los APP de carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*), auxiliándose con la SDS-PAGE de las proteínas presentes en los ingredientes citados, fue posible explicar las diferencias. En los APP de pH 2.5 y 3.5 se observa una nueva banda a 195 kDa y una reducción en la intensidad de las bandas correspondientes a CPM, esto como resultado de la ligera disociación de la MMP; tanto en las fracciones ácidas como alcalinas se presenta otra banda nueva de 150 kDa. Cuando se compararon los APP ácidos con el músculo molido se encontró que varias bandas de mediana masa molecular desaparecían (57-90 kDa) y se formaban algunas de baja masa molecular, esto pudo deberse a la acción de las proteasas endógenas. El perfil proteico del surimi es similar al de la pasta de pescado. Los cambios proteicos en los APP resultaron en una mayor eficiencia de recuperación de proteínas, del mismo modo se presentan diferencias en las propiedades funcionales, se mejora la capacidad de retención de agua, la capacidad de emulsión, la capacidad de espumado y la de absorción de agua. Concluyendo, las proteínas separadas por electroforesis nos pueden ayudar a predecir los cambios en las propiedades funcionales, ya que cada una se relaciona a un tipo de fracción proteica o a una proteína en específico.

Identificación de alérgenos en alimentos de origen acuático

Las alergias a los alimentos son reacciones inmunes adversas a algunas proteínas presentes en alimentos, los alimentos de origen acuático se encuentran dentro de los 8 alimentos con mayor capacidad alérgena. La situación se ha incrementado debido al aumento en el consumo de alimentos de origen acuático, por lo anterior el análisis de su capacidad alérgena se ha convertido en prioridad mundial, ya que en todo el mundo diferentes grupos de personas presentan reacciones alérgicas. Estas son causadas por la respuesta de la inmunoglobulina E (IgE) a algunas proteínas musculares, mismas que se manifiestan en síntomas gastrointestinales, asma, dermatitis, o incluso anafilaxis. Existen reportes de proteínas alérgenas tanto en pescados como en crustáceos y moluscos, tanto de agua dulce como marinos (Sveinsdóttir y col., 2012; Tomm y col., 2013; van der Poel, 2009). Para caracterizar estos alérgenos se preparan extractos del alimento (crudos o

tratados térmicamente) para posteriormente separar las proteínas por electroforesis, de tal manera que podemos identificar y semi-cuantificar el causante de alergia. Combinando las técnicas de SDS-PAGE e IEF, la prueba tendrá mayor resolución y sensibilidad para algunas especies donde se tienen reconocidos los patrones proteicos de alérgenos. Aunque si se desea una mayor certeza de la capacidad alérgena se recomienda aplicar una prueba de *immunoblotting* usando el suero de pacientes alérgicos, aprovechando la especificidad anticuerpo-antígeno es posible detectar pequeñas cantidades de alérgeno (Montowska y Pospiech, 2007). En peces teleósteros como la perca del Nilo y el bacalao se han detectado proteínas alérgenas mediante electroforesis de 2D. Tomm y col. (2013) demostraron que para estas especies la parvalbúmina (proteína sarcoplásmica responsable de alergias en pescado) presenta una baja reactividad de la IgE, algo incongruente debido a la alta conservación de esta proteína entre las especies. Con ayuda de ensayos de Western Blot evidenciaron la presencia de ocho proteínas alérgenas en la perca, de las cuales una correspondía a la actina, para el caso del bacalao se encontraron cinco proteínas alérgenas, siendo parte de estas la tropomiosina y la cadena ligera de la miosina.

En crustáceos y moluscos tenemos que la tropomiosina es la principal responsable de reacciones alérgicas, es una proteína que aún después del proceso térmico o tratamiento ácido conserva su calidad alérgica. Se ha identificado esta proteína en crustáceos como: langosta (roja, noruega, espinosa), camarón (tigre, kuruma y rosa) y cangrejo (king, snow y horsehair). También se descubrió que las cadenas ligeras de la miosina en el camarón patiblanco y tigre son alérgenas. Para el caso específico de los moluscos como ostiones y mejillones presentan como alérgenos las cadenas pesadas de la miosina, troponina y actina (Rahman y col., 2014). La electroforesis es una herramienta que puede ayudar a evidenciar la presencia de proteínas potencialmente alérgenas, incluso usando anticuerpos del suero del paciente sería posible confirmar el grado de alergia que pudiera presentar.

CONCLUSIONES

La electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS es una técnica sencilla, rápida y reproducible para la separación e identificación de proteínas. El análisis de proteínas con esta técnica permite detectar el efecto del proceso sobre los alimentos para la mejora de la calidad de los mismos. Mediante esta herramienta es posible predecir los cambios en la estructura tisular, así como su relación con la textura y calidad de la carne, tanto de animales terrestres como marinos. También es una herramienta que puede ayudar a evidenciar la presencia de proteínas potencialmente alérgenas.

BIBLIOGRAFÍA

ARAKI, H., N. SEKI. 1993. Comparison of reactivity of transglutaminase to various fish actomyosin. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59: 711–716.

- ARNDT, C., S. KORITSKA, H. BARTSCH, M. BACHMANN. 2012. Native polyacrilamide gels. *Methods in Molecular Biology* 869: 49-53.
- AZADIAN, M., M. MOOSAVI-NASAB, E. ABEDI. 2012. Comparison of functional properties and SDS-PAGE patterns between fish protein isolate and surimi produced from silver carp. *European Food Research and Technology* 235: 83-90.
- BAYLAN, M., G. MAZI, N. OZCAN, B.D. OZCAN, M. AKAR, A. COSKUN. 2015. Changes of electrophoretic protein profiles of smoked and marinated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during refrigerated storage. *Journal of Agricultural Sciences* 21: 262-269.
- BENJAKUL, S., A. CHANTARASUWAN, W. VISESSANGUAN. 2003. Effect of medium temperature setting on gelling characteristics of surimi from some tropical fish. *Food Chemistry* 82: 567-574.
- CHEN, B., A. GRIFFITH, N. CATSIMPOOLAS, A. CHRAMBACH, D. RODBARD. 1978: Bandwidth: Comparison between continuous and multiphasic zone electrophoresis. *Analytical Biochemistry*. 89: 609-615.
- CHENG, J.-H., D.-W. SUN, Z. HAN, X.-A. ZENG. 2014. Texture and structure measurements and analyses for evaluation of fish and fillet freshness quality: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13: 52-61.
- CHOI, Y.M., S.H. LEE, J.H. CHOE, M.S. RHEE, S.K. LEE, S.T. JOO, B.C. KIM. 2010. Protein solubility is related to myosin isoforms, muscle fiber types, meat quality traits, and postmortem protein changes in porcine *Longissimus dorsi* muscle. *Livestock Science* 127: 183-191.
- CLAEYS, E., L. UYTTERHAEGEN, B. BUTS, D. DEMEYER. 1995. Quantification of beef myofibrillar proteins by SDS-PAGE. *Meat Science* 39:177-193.
- DAVIS, J.B. (1964). Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum protein. En: *Gel Electrophoresis*. New York: Annals of the New York Academy of Sciences, pp. 404-427.
- DE CASTRO SANTOS, C., E.F. DELGADO, M.J.E. MACHADO, A. DE MOURA PEDREIRA, C.J. CONTRERAS CASTILLO, M.G. BARRETO, M.C. BROSSI, I.J. OLIVEIRA DA SILVA. 2008. Sarcoplasmatic and myofibrillar protein changes caused by acute heat stress in broiler chicken. *Scientia Agricola* 65: 453-458.
- DENG, Y., Y. LUO, Y. WANG, Y. ZHAO. 2015. Effect of different drying methods on the myosin structure, amino acid composition, protein digestibility and volatile profile of squid fillets. *Food Chemistry* 171: 168-176.
- FORREST, J.C., D.E. ABERLE, H.B. HENDRICK, M.D. JUDGE, R.A. MERKEL. 1974. *Fundamentos de Ciencia de la Carne*. Zaragoza: Editorial Acribia.

- GONZÁLEZ-TENORIO, R., J. MATEO-OYAGUE, A. TOTOSAUS, M.L. PÉREZ-CHABELA. 2004. Effect of lactic acid bacteria or gluconolactone on textural and physicochemical properties of calcium chloride marinated bovine *Bracheocephalicus* muscle. *Research Advances in Food Science* 4: 57-63.
- GREASER, M.L., C.M. WARREN. 2011. Protein electrophoresis in agarose gels for separating high molecular weight proteins. Capítulo 10 en: *Protein Electrophoresis*. B.T. Kurien & R.H. Scofield (editores). New York: Humana Press, pp. 11-118.
- HARDY, R. W., C. LEE. 2010. Aquaculture feed and seafood quality. *Bulletin of Fisheries Research Agency* 31: 43–50.
- HJERTÉN, S., S. JERSTEDT, A. TISELIUS. 1964. Some aspects of the use of “continuous” and “discontinuous” buffer systems in polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 11: 219-223.
- HJERTÉN, S. 1962. "Molecular sieve" chromatography on polyacrylamide gels, prepared according to a simplified method. *Archives in Biochemical and Biophysical Suppl* 1. 147-151.
- HOPKINS, D.L. 2001. The degradation of myofibrillar proteins in beef and lamb using denaturing electrophoresis. *Journal of Muscle Foods* 13: 81-102.
- JIANG, S.-T. 1998. Contribution of muscle proteinases to meat tenderization. *Proceedings of the National Science Council B* 22: 97-107.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- LAWRIE, R.A. 1974. *Ciencia de la Carne*. Zaragoza: Editorial Acribia, pp. 91-149.
- LAWRIE, R.A., D.A. LEDWARD. 2006. The structure and growth of muscle. Capítulo 3 en: *Lawrie's Meat Science*. Boca Raton: CRC Press, pp. 41-74.
- LÓPEZ DE TORRE, G., G.B.M. CARBALLO. 1991. *Manual de Bioquímica y tecnología de la carne*. Madrid: Ediciones A. Madrid Vicente, pp. 21-31.
- MA, H, G. ZHOU, D.A. LEDWARD, X. YU, R. PAN. 2011. Effect of combined high pressure and thermal treatment on myofibrillar proteins solubilization of beef muscle. *International Journal of Molecular Sciences*. 12: 3034-3041.
- MONTOWSKA, M., E. POSPIECH. 2007. Species identification of meat by electrophoretic methods. *ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* 6: 5-16.
- ORTEA, I., A. PASCOAL, B. CAÑAS, J.M. GALLARDO, J. BARROS-VELÁZQUEZ, P. CALO-MATA. 2012. Food authentication of commercially-relevant shrimp and prawn species: From classical methods to Foodomics. *Electrophoresis* 33: 2201–2211.

- PÉREZ-CHABELA, M.L., I. GUERRERO-LEGARRETA, M.C. GUTIÉRREZ-RUIZ, J.M. BETANCOURT-RULE, A. PÉREZ-TORRES, M. USTARROZ-CANO, M. 2005. Effect of calcium chloride marination on electrophoretical and structural characteristics of beef, horse, rabbit and chicken meat. *International Journal of Food Properties* 8: 207-219.
- PORNRA, S., T. SUMATE, S. ROMMANEE, K. SUMOLAYA, W.L. KERR. 2007. Changes in the ultrastructure and texture of prawn muscle (*Macrobrachium rosenbergii*) during cold storage. *LWT-Food Science and Technology* 40: 1747–1754.
- PRICE, J.D., B.S. SWEIGERT. 1991. *The science of meat and meat products*. San Francisco: W.H. Freeman and Company.
- RAHMAN, A.M.A., R.J. HELLEUR, M.F. JEEBHAY, A.L. LOPATA. 2014. Characterization of seafood proteins causing allergic diseases. Capítulo 5 en: *Allergic diseases-highlights in the clinic, mechanisms and treatment*. C. Pereira (editor). Rijeka: InTech, pp. 107-140.
- SAYAS-BARBERÁ, E., J. FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.A. PÉREZ-ALVAREZ. 2009. Anatomía y ultraestructura del pescado. Capítulo 4 en: *Tecnología de Productos de Origen Acuático*. I. Guerrero, M.R. Rosmini & R. Armenta (editores). México: Editorial LIMUSA, pp. 57-74.
- SAYAS-BARBERÁ, E., J. FERNÁNDEZ-LÓPEZ. 2006. Ultraestructura e histología. Capítulo 3 en: *Ciencia y Tecnología de Carnes*. Y.H. Hui, I. Guerrero & M. Rosmini (editores) México: Editorial Limusa, pp. 89-110.
- SRIKET, C., S. BENJAKUL, W. VISESSANGUAN, K. HARA, A. YOSHIDA. 2012. Retardation of post-mortem changes of freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) stored in ice by legume seed extracts. *Food Chemistry* 135(2): 571-579.
- SVEINSDOTTIR, H., S.A.M. MARTIN, O.T. VILHELMSSON. 2012. Application of proteomics to fish processing and quality. En: *Food Biochemistry and Food Processing*. B.K. Simpson (editor). Londres: Wiley-Blackwell, pp. 406-424.
- TOMM, J.M., T. VAN DO, C. JENDE, J.C. SIMON, R. TREUDLER, M. VON BERGEN, M. AVERBECK. 2013. Identification of new potential allergens from Nile perch (*Lates niloticus*) and cod (*Gadus morhua*). *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology* 23(3): 159-167.
- TORRES, L.G.A., B.I.C. SÁNCHEZ, L.P. RESTREPO, H.W. ALBARRACÍN. 2012. Estudio de la maduración de cordero empleando electroforesis SDS-PAGE. *Revista Colombiana de Química* 41(2): 263-282.

- TOTOSAUS A., V. KURI. 2009. Funcionalidad y textura. Capitulo 11 en: Tecnología de Productos de Origen Acuático. I. Guerrero, M.R. Rosmini & R. Armenta (editores). México: Editorial LIMUSA, pp. 171-182.
- OUALI, A. 1990. Meat tenderization: possible causes and mechanisms. A review. *Journal of Muscle Foods* 1: 129–165.
- VAN DER POEL, L., CHEN, J. Y PENAGOS, M. 2009. Food allergy epidemic – is it only a Western phenomenon? *Current Allergy & Clinical Immunology* 22: 121-126.
- VIGOREAUX, J.O. 1994. The muscle Z band: lessons on stress management. *Journal Muscle Research and Cell Motility* 15: 237-255.
- WEBER, K., M. OSBORN. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry* 244: 4406-4412.
- WENGENMAYER, F., K.H. UEVERSCHAR, G. KURZ. 1974. Alterations of enzymes by riboflavin and by bromophenol blue during preparative disc-electrophoresis. *FEBS Letters* 40: 224-228.