

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

Caracterización Parcial y Actividad Inhibidora de la Enzima
Convertidora de Angiotensina en Proteínas del Tejido Conectivo
de *Dosidicus gigas* Glicosiladas vía Reacción de Maillard



TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Sergio Luis Valle Sánchez

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional de Sergio Luis Valle Sánchez la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Químico Biólogo Clínico.

Dr. Roberto Rodríguez Ramírez

Presidente

Dra. Luz Angélica Ávila Villa

Secretario

Dr. Wilfrido Torres Arreola

Vocal

Dra. Jael Teresa de Jesús Quintero Vargas

Suplente

AGRADECIMIENTOS

Especial agradecimiento a mi asesor el Dr. Roberto Rodríguez Ramírez, quien sin conocerme me aceptó como su alumno y depositó su confianza en mí para desarrollar este trabajo en su laboratorio. Por su asesoramiento, por esas charlas de dudas y mutuo aprendizaje, qué después de tiempo y esfuerzo concluimos esta etapa de mi formación. Por encomendarme a insistir en mis objetivos de vida y hacerlos realidad. Gracias por sus consejos y seguiré dando lo mejor de mí en nuestra siguiente etapa.

A todos los doctores que me otorgaron su tiempo y conocimiento, en la revisión de este trabajo, a la Dra. Angélica Ávila por ser pilar en mi formación, brindarme su confianza y apoyarme en lo académico como en lo personal. Gracias al Dr. Wilfrido Torres por su atención, compromiso y su tiempo en responder mis dudas. Gracias a la Dra. Jael Quintero por su apoyo y motivación en seguir insistiendo.

A mis compañeros de laboratorio por su recibimiento, apoyo, conocimiento y amistad, a la M.C. Areli Mondaca, al M.C. Daniel Hernández, al M.C. Gabriel Barco y al M.C. Juan Flores.

A todos mis maestros de la Universidad de Sonora, en especial al Dr. David Corona, al Dr. Marco López y a la Q.F.B. Sandra Miranda, por sus enseñanzas, conocimientos, consejos y ser pilares en mi formación como Químico Biólogo Clínico.

A mi novia Iris, muchas gracias por motivarme y creer en mí, por darme ánimos en momentos de frustración, enseñarme a conservar mi humildad y siempre tener fé. Por eso y más que palabras.

A mis compañeros y amigos de licenciatura Horacio Coronado y Zulema Chalas, por su amistad y todos los momentos que vivimos en nuestra Universidad.

A la Fundación Telmex-Telcel, por la beca que me otorgaron con la cual pude concluir mi licenciatura, así como éste trabajo. Por otorgarme una gran experiencia en el evento México Siglo XXI.

DEDICATORIAS

Este trabajo se lo dedico a mi hermano Alan, a mi novia Iris y en especial, a mi madre Sonia.

A mi madre: Al ser universalmente más querido.

A quién sin escatimar esfuerzo alguno, ha sacrificado por mi gran parte de su vida, me ha formado y educado. Como un testimonio de gratitud y eterno agradecimiento, por el apoyo que desde mi niñez me brindó, y con el cual he logrado terminar mi carrera profesional, siendo para mí la mejor de las herencias. POR TODO ELLO, A TI y A DIOS: Gracias.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
OBJETIVOS	12
General	12
Específicos	12
REVISIÓN DE LA LITERATURA	13
Generalidades del Calamar Gigante	13
Composición Química del Calmar Gigante	15
Tejido Conectivo	16
Generalidades del Colágeno	18
Métodos de Caracterización de Proteínas	19
Electroforesis en Geles de Poliacrilamida en Condiciones Desnaturalizantes con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE)	20
Espectroscopia de Infrarrojo Utilizando Transformada de Fourier (FTIR)	22
Reacción de Maillard	24
Etapas Iniciales: Glicosilación No Enzimática o Glicación	25
Etapas Avanzadas: Formación de Compuestos Dicarbonilos y AGEs	27
Etapas Finales: Formación de Melanoidinas	28
Parámetros que Afectan la Reacción de Maillard	29
Actividad de agua (a_w)	29
Condición de pH	29
Temperatura	29
Tipo de carbohidrato	29
Naturaleza y concentración de los reactantes	30
Generalidades de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA)	30
Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona	31
Inhibidores de la ECA	32
METODOLOGÍA	34

Extracción de Proteínas del Tejido Conectivo de Calamar Gigante	34
Cuantificación de Proteínas	35
Glicación de Proteínas de Tejido Conectivo de Calamar Gigante Vía RM	35
Caracterización Parcial de las Proteínas Glicosiladas Vía RM	36
Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)	36
Porcentaje de Glicación (OPA)	36
Espectroscopia de Infrarrojo Utilizando Transformada de Fourier (FTIR)	37
Evaluación de las Etapas Intermedias y Finales de la RM	37
Espectro UV-Visible	38
Actividad Inhibidora de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA)	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
Caracterización Parcial de las Proteínas Glicosiladas Vía RM	40
Cuantificación de Proteínas	40
Porcentaje de Glicación (OPA)	41
Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)	42
Espectroscopia de Infrarrojo Utilizando Transformada de Fourier (FTIR)	44
Evaluación de Etapas Intermedias y Finales de la RM	47
Espectro UV-Visible	49
Actividad Antihipertensiva <i>in vitro</i>	50
Inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA)	51
CONCLUSIONES	53
RECOMENDACIONES	54
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Porcentaje de glicación de los glicoconjugados de dextrano y glucosa.	41
2.	Porcentajes de inhibición de la ECA.	51

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Distribución del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) en el océano Pacífico.	13
2.	Anatomía externa e interna del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).	14
3.	Estructura química de la membrana basal del tejido conectivo.	17
4.	Estructura química del colágeno.	18
5.	Electroforesis en geles de poliacrilamida.	21
6.	Reacción de la polimerización de la poliacrilamida y estructura química del dodecil sulfato de sodio (SDS).	22
7.	Secuencia de la medición de una muestra en IR.	23
8.	Reacción de Maillard de acuerdo con Hodge 1953.	25
9.	Primera etapa de la RM, formación del compuesto de Amadori.	26
10.	Vías principales de degradación del compuesto de Amadori durante las etapas avanzadas de la reacción de Maillard (de acuerdo con Hodge, 1953)	27
11.	Estructuras propuestas para algunos de los AGEs formados durante las etapas avanzadas de la reacción de Maillard.	28
12.	Esquema general del sistema renina-angiotensina-aldosterona.	32
13.	Estructura química de fármacos comerciales inhibidores de ECA.	33
14.	Curva de calibración de albúmina de suero bovino.	40
15.	Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7.5 % de los glicoconjugados, tiempos 0 y extracto proteico.	42
16.	Espectro típico de FTIR de proteínas solubles en pepsina de <i>D. gigas</i> .	44
17.	Espectro típico de FTIR del glicoconjugado de dextrano.	45
18.	Espectro típico de FTIR del glicoconjugado de glucosa.	45
19.	Comparación de espectros típicos de FTIR entre proteínas solubles en pepsina de <i>D. gigas</i> y sus glicoconjugados.	46
20.	Medición de etapas intermedias de la RM.	48
21.	Medición de etapas finales de la RM.	48
22.	Espectro UV-Visible de las diferentes muestras en un intervalo de 200 – 600 nm.	49
23.	Curva de calibración del logaritmo de la concentración de enalaprilato en contra del porcentaje de inhibición.	50

RESUMEN

El calamar gigante (*Dosidicus gigas*), es una de las principales especies marinas de la cual se obtienen desechos llamados “subproductos” que pueden ser aprovechados. Entre esos componentes se encuentran las proteínas del tejido conectivo (TC), que pueden ser utilizadas a nivel alimentario. Por otro lado, dichas proteínas pueden presentar o potencializar su bioactividad vía Reacción de Maillard (RM). De manera general la RM consiste en reaccionar, en este caso una proteína con un carbohidrato a diferentes condiciones de temperatura, pH, entre otras, por lo que se obtiene una glicoproteína o glicoconjugados (GC), los cuales pueden presentar bioactividades. El objetivo de este trabajo es caracterizar parcialmente proteínas del TC de calamar glicosiladas vía RM, así como su actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Particularmente, las proteínas del TC de calamar se glicaron vía RM con dos carbohidratos: dextrano y glucosa, en relación 1:3 proteína: carbohidrato (m/m), en condiciones controladas de temperatura (50 °C), tiempo de calentamiento (6 h) y pH (4.2). Para el caso de la caracterización parcial, en el extracto proteico se encontraron bandas de 116-200 kDa características del colágeno mediante SDS-PAGE y otras bandas de proteínas como elastina (55 kDa) y tropomiosina (36 kDa), donde la última se visualiza incremento en el peso molecular en los GC. Mientras que, en el FTIR, se encontraron las vibraciones de los enlaces característicos de las proteínas (amida A, B, I, II y III), y dichas vibraciones disminuyeron en los GC formados. Se obtuvo un porcentaje de glicación de 17.20 y 13.06 %, para los GC de dextrano y glucosa, respectivamente. Para la actividad antihipertensiva, se utilizaron dos concentraciones de los GC: 0.1 y 0.05 mg/mL, donde los GC de dextrano y glucosa a 0.1 mg/mL inhibieron el 100 % de la ECA, mientras que los GC a 0.05 mg/mL inhibieron 77.91 y 100 % para dextrano y glucosa, respectivamente. Se lograron caracterizar los glicoconjugados, obteniéndose incremento en el peso molecular y disminución en las vibraciones de los enlaces, así como la inhibición *in vitro* de la ECA.

INTRODUCCIÓN

El calamar gigante de nombre científico *Dosidicus gigas*, es un molusco cefalópodo marino que se encuentra dentro de las principales especies marinas capturadas en México, siendo Sonora y Baja California Sur los principales estados productores, además que su captura constituye un grado de desarrollo importante en el Pacífico Norte de México. Sin embargo, el consumo humano de este cefalópodo en México es bajo, independientemente de su bajo precio y alta calidad nutricional (De La Cruz y col., 2007; Salinas y col., 2005). Dentro del mercado nacional, el calamar gigante se comercializa principalmente en forma de manto, fresco, congelado, precocido, tentáculos o “bailarina” (cabeza con tentáculos) y aleta (Luna y col., 2006). Después de que el calamar es fileteado, se generan desechos denominados “subproductos”, que pueden representar hasta un 75 % del peso de la captura total en forma de huesos, aletas, cabezas, vísceras y escamas (Shahidi, 2006).

Por otro lado, esos subproductos pueden ser utilizados para obtener enzimas y subproductos de alto valor nutricional y comercial, como lo es el colágeno. Alrededor del 30 % de los subproductos contienen alto contenido del mismo, que pueden ser variables en función de la edad del espécimen, estadio de madurez, e incluso sitio y temporada de captura, además que también estos desechos pueden ser empleados para la producción industrial de colágeno y gelatina, con fines cosméticos o de alimentos balanceados para animales (Ezquerro-Brauer y col., 2002; Torres-Arreola y col., 2008).

En los últimos años, la industria alimentaria ha intentado mejorar las propiedades funcionales de proteínas de distinta naturaleza, mediante métodos físicos, enzimáticos y/o químicos (como la acetilación, desaminación, succinilación, alquilación reductiva, etc.). Concretamente, se ha prestado especial atención al efecto que ejercen los azúcares reductores sobre la estructura y funcionalidad de las proteínas, existiendo actualmente evidencias suficientes de que el calentamiento controlado de las proteínas con azúcares reductores de distinto peso molecular forma glicoconjugados vía reacción de Maillard o también llamados productos de la reacción de Maillard (PRM). Esta vía es uno de los métodos más efectivos para obtener nuevas proteínas modificadas con gran interés tecnológico (Oliver y col., 2006). Además, a diferencia de otros métodos químicos empleados para obtener proteínas modificadas, la glicosilación vía RM, también llamada glicosilación no enzimática o glicación, no implica el uso de reactivos que puedan resultar tóxicos para el consumo humano, siendo, quizás, el método más seguro para mejorar las

propiedades funcionales de las proteínas con fines alimentarios (Corzo Marta, 2010). Algunos reportes indican que la reacción de Maillard en sistemas modelo (aminoácido-azúcar) poseen actividad antioxidante y quelante (Mondaca-Navarro y col., 2017), antiproliferativa y antihipertensiva (In Huk y col., 2011), pero también las proteínas modificadas por este modo obtienen bioactividades como capacidad antioxidante (Benjakul y col., 2005), antialérgica (Nakamura y col., 2005) y antihipertensiva (Hong y col., 2014).

Indiscutiblemente, la hipertensión arterial es una enfermedad que afecta a alrededor del 20 % de los adultos en el mundo. Es un factor de riesgo importante de enfermedades cardiovasculares como la arteriosclerosis, apoplejía, infarto agudo al miocardio, o bien, enfermedades renales. Por lo tanto, la disminución los niveles de la presión sanguínea a la normalidad es necesaria para prevenir dichas patologías (Alemán y col., 2013). La enzima convertidora de angiotensina (ECA) desempeña un papel central en la regulación de la presión arterial, ésta cataliza la conversión de angiotensina I en angiotensina II, un potente vasoconstrictor, por lo que la angiotensina II promueve el incremento de la presión arterial (Murray y FitzGerald, 2007). En los últimos años, los péptidos y/o proteínas así, como los PRM generados a partir de ellos, han recibido una atención especial, ya que aquellos que inhiben la actividad de la ECA pueden ser considerados como alternativas no farmacológicas para la prevención y el control de la hipertensión arterial (Alemán y col., 2013; Hong y col., 2014).

En la actualidad, los subproductos de origen marino están explotándose, así como nuevas tecnologías para obtener alimentos funcionales con gran impacto en el sector salud, ambiental, industrial y nutricional. Por lo anterior, el presente estudio, pretende potencializar el contenido proteico de un subproducto del calamar gigante (tentáculos) otorgándole funcionalidad mediante la reacción de Maillard, por lo cual se realizó una caracterización parcial de los glicoconjugados obtenidos así como la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina, la cual desempeña un papel importante en la hipertensión arterial.

OBJETIVOS

General

Caracterizar parcialmente proteínas del tejido conectivo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) glicosiladas vía reacción de Maillard, así como la actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina (ECA).

Específicos

- Extraer proteínas del tejido conectivo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) y desarrollar su glicosilación vía reacción de Maillard a partir de diferentes condiciones: tiempo, temperatura y concentración de los reactantes.
- Caracterizar parcialmente proteínas del tejido conectivo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) glicosiladas vía reacción de Maillard mediante técnicas electroforéticas y espectroscópicas, con el fin de observar incremento en el peso molecular y disminución en las vibraciones de los enlaces de los grupos funcionales.
- Evaluar la capacidad antihipertensiva *in vitro* en proteínas del tejido conectivo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) glicosiladas vía reacción de Maillard mediante la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA).

REVISIÓN DE LA LITERATURA

Generalidades del Calamar Gigante

El calamar gigante fue descrito primeramente en 1835 por D'Orbigny, a quien se le debe el nombre científico de *Dosidicus gigas*, el cual, se distribuye a lo largo del Océano Pacífico oriental (37° N a 47° S), desde California hasta el sur de Chile. Actualmente se reconocen dos zonas de concentración de calamar gigante en México, una en aguas frente a las costas de Jalisco y Colima y otra en la costa pacífica de Baja California hasta en el interior del Golfo de California. Existe otra zona que va desde el ecuador hasta los 28° S, principalmente frente a costas de Perú (Figura 1), (Nesis, 1983; Nigmatullin y col., 2001). Se ha propuesto que la distribución del calamar gigante responde a una combinación de factores bióticos y abióticos, ampliando o contrayendo su distribución espacial y temporal (SAGARPA, 2014).

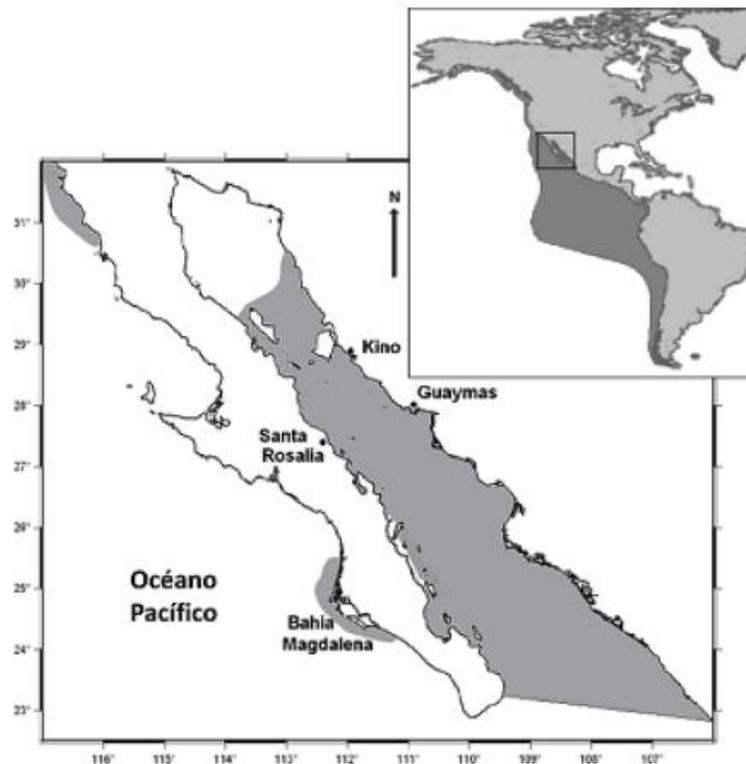


Figura 1. Distribución del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en el océano Pacífico. (SAGARPA, 2014).

Dosidicus gigas es el mayor miembro de la familia *Ommastrephidae*, y pertenece a los más avanzados de la subfamilia de los *Ommastrephinae*, siendo este un organismo con una longitud media del manto (LM) de 150 cm y un peso desde 30 hasta 50 Kg. Es un organismo muy robusto y con la pared corporal gruesa. El cartílago de unión del manto con la cabeza presenta una bifurcación en forma de "T" invertida característica de la familia *Ommastrephidae*. Se distingue de sus congéneres por la prolongación de los extremos distales de sus brazos en filamentos largos y delgados con 100 a 200 pares de succionadores o ventosas pequeñas estrechamente agrupadas, membrana dorsal protectora, trabéculas sumamente desarrolladas y papilas expuestas (Ehrhardt y col., 1986). En pocas palabras, la anatomía externa e interna del calamar gigante consta del manto, aleta, cromatóforos, ojos, pluma, brazos, tentáculos y succionadores, además de sus branquias, gónada, corazón, cerebro, saco de tinta, pico y sifón, véase figura 2 (Brown y Kiesel, 2003).

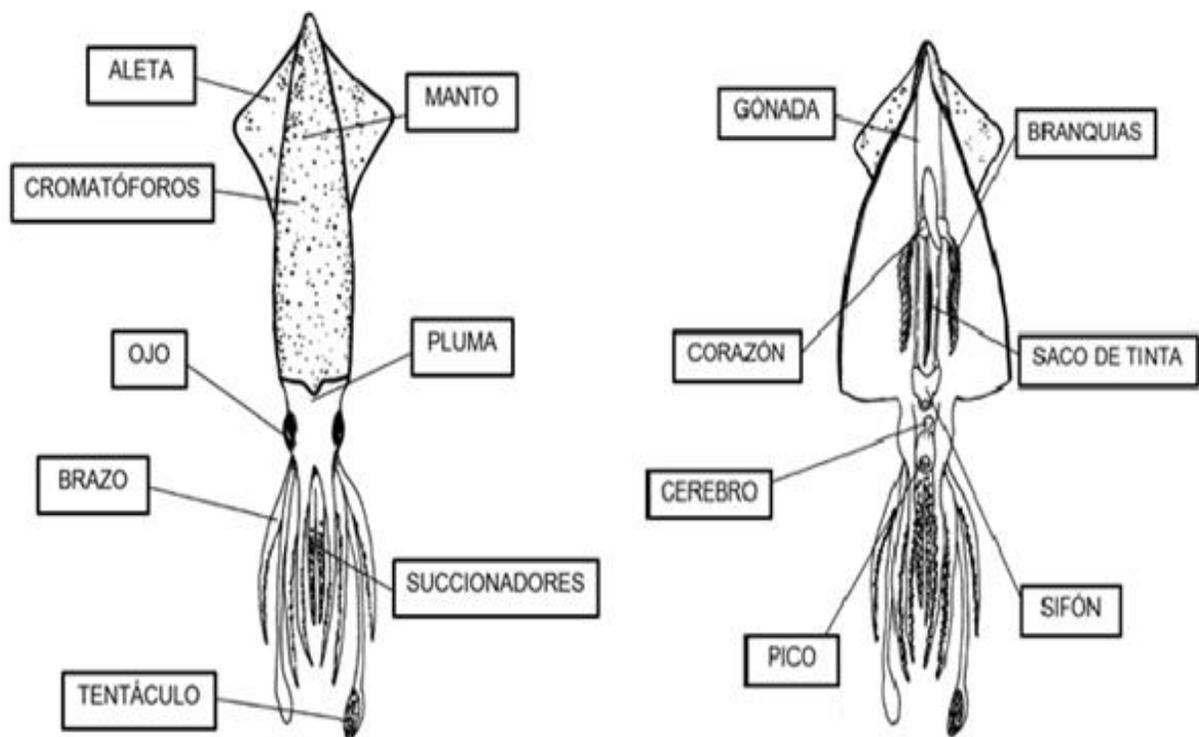


Figura 2. Anatomía externa e interna del calamar gigante (*Dosidicus gigas*). (Brown y Kiesel 2003)

En la especie *Dosidicus gigas*, es reconocible un ligero dimorfismo sexual al alcanzar la madurez, las hembras son ligeramente más grandes y de mayor peso en comparación con los machos (Nesis, 1983; Nigmatullin y col., 2001). El calamar gigante es desovador múltiple, es decir, presenta una ovulación sincrónica por grupos, en la cual existen ovocitos en diferentes grados de desarrollo. Los ovocitos de mayor tamaño mantienen un crecimiento sincrónico para formar una nidada; *D. gigas* en su historia de vida sólo tiene una temporada reproductiva, en la cual es capaz de poner diferentes nidadas (Rocha y col., 2001).

La alimentación de *D. gigas* es variada, es un depredador por naturaleza y se alimenta de otras especies marinas como copépodos, eufáusidos, camarones pelágicos, cangrejos rojos, moluscos heterópodos y varios peces (Nigmatullin y col., 2001). El espectro alimenticio es variante, dependiendo de la ontogenia del calamar gigante también dependerá su alimentación. Desde una LM de 4-10 cm hasta una LM de 42 cm se puede alimentar de copépodos, mictófidios e inclusive de otros calamares (Schetinnikov, 1989).

Composición Química del Calamar Gigante

La composición química de las especies marinas, incluyendo al calamar gigante, varía dependiendo de sus características como lo son: el sexo, talla, alimentación, temporada y localización de la captura, entre otros. Existen muchas variaciones, en cuanto a la composición química se refiere, de especie a especie, así como también dentro de la misma especie; esta variación en la composición como la del músculo puede ocasionar cambios de sabor, color, textura y apariencia (Arias Joe, 2009). El calamar gigante es una fuente de proteínas de alta calidad, ya que son digeribles y posee todos los aminoácidos esenciales. Proteínas como las del manto difieren de otros vertebrados, debido a que el 75-85 % corresponde a fracciones miofibrilares y entre ellas se encuentra la miosina, seguido de actina y paramiosina, siendo esta última particularmente común en los invertebrados marinos y puede representar hasta el 25 % en proteínas. Las proteínas sarcoplasmáticas representan el 15 % del total (Murrieta-Martínez y col., 2015).

Tejido Conectivo

El tejido conectivo o conjuntivo se caracteriza porque sus células no se encuentran adosadas entre sí, sino englobadas en una matriz con sustancia fundamental blanda. Este tejido desempeña múltiples funciones como el soporte y protección de órganos formando el armazón y recubrimiento dentro de éstos y de los vasos sanguíneos y nervios, además de la difusión de sustancias y la ubicación de las células de defensa del organismo. El tejido conectivo está ya presente en los invertebrados, y alcanza particular desarrollo y variedad en los vertebrados (Panigua, 2007). El tejido conectivo está compuesto por células y matriz extracelular, la cual comprende a la sustancia fundamental y a las fibras inmersas en ella. La sustancia fundamental consta de agua, sales minerales, proteínas, glucoproteínas (proteínas a las que se unen algunos oligosacáridos) y proteoglucanos (proteínas con largas cadenas hidrocarbonadas del tipo glucosaminoglucanos). Las fibras son de dos tipos: colágenas y elásticas. La proporción entre la sustancia fundamental y las fibras, y el tipo y distribución de estas últimas determinan la coloración y variedad del tejido conectivo (Fortoul, 2013).

La membrana basal es el límite entre el epitelio y el tejido conectivo subyacente. Los componentes de la membrana basal se disponen formando cinco capas que, mencionadas desde el epitelio hacia la lámina fibrosa, contienen: 1) laminina (a la que está unida la entactina); 2) proteoglucanos (principalmente el perlecano); 3) colágeno tipo IV; 4) proteoglucanos y 5) fibronectina. En la membrana basal de los endotelios hay colágeno del tipo XVIII y en la de los epitelios planos poliestratificados, colágeno del tipo XVII asociado a los hemidesmosomas (Figura 3), (Paniagua, 2007).

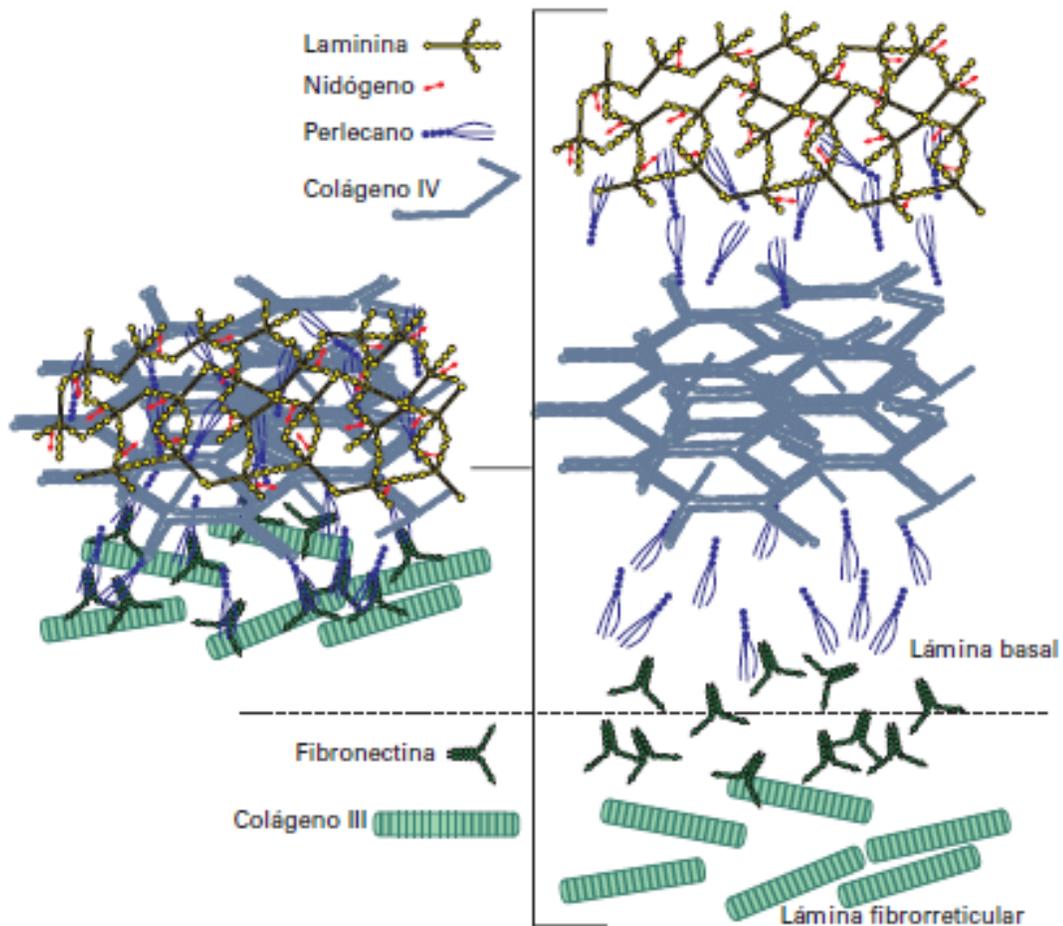


Figura 3. Estructura química de la membrana basal del tejido conectivo. (Paniagua 2007).

En organismos marinos, el tejido conectivo desempeña un papel importante en la conexión de células, proporcionando una estrecha relación entre su función y la textura muscular. En los peces y cefalópodos, el colágeno es el principal constituyente del tejido conectivo, y su concentración y función dependen de muchos factores, como la temperatura del agua, edad o sexo del animal, y las características del colágeno están relacionados con la estabilidad de las fibras musculares (Osuna-Amarillas y col., 2015).

Generalidades del Colágeno

El colágeno es la proteína más abundante del reino animal y es localizado en la matriz extracelular (Bächinger y Engel, 2005). Está conformado por fibrillas las cuales proporcionan soporte mecánico y resistencia, que depende de la formación de enlaces covalentes intramoleculares y entrecruzamiento de las unidades proteicas. Todos los tipos de colágeno que son capaces de formar fibrillas en vertebrados superiores son los tipos I, II, III, V y XI, mismos que están entrecruzados en un mecanismo basado en reacciones de aldehídos generados enzimáticamente por la lisil oxidasa en cadenas laterales de lisina o hidroxilisina (Eyre y Wu, 2005). La característica común de todos los colágenos es el dominio de una triple hélice helicoidal con la secuencia repetida Glicina-X-Y en la estructura primaria donde normalmente X y Y corresponden a los aminoácidos prolina e hidroxiprolina, respectivamente, además dicha hélice se encuentra en los tejidos conectivos incluyendo tendones, huesos y piel. Una gran variación en la longitud de la triple hélice se puede encontrar en la naturaleza (Figura 4), (Bächinger y Engel, 2005; Muyonga y col., 2004).

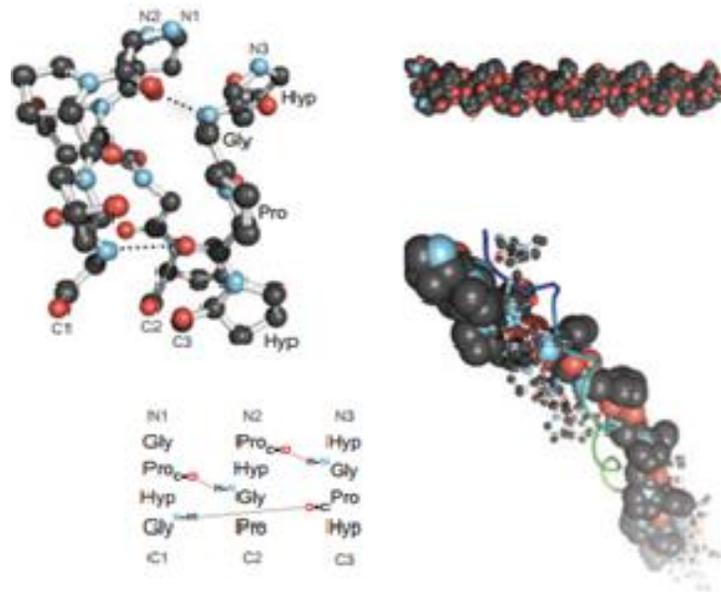


Figura 4. Estructura química del colágeno. (Shoulders y Rainers, 2009).

Las tres cadenas polipeptídicas que forman la triple hélice también es llamada tropocolágeno, la cual es cilíndrica y mide alrededor de 280 nm de longitud y 1.5 nm de diámetro. Cada cadena, llamada cadena alfa (α), contiene aproximadamente 1000 aminoácidos y tiene un peso molecular de 100 kDa, dependiendo del tipo. Las moléculas de tropocolágeno pueden ser formados por tres cadenas idénticas (homotrímeros) como en los colágenos II y III o por dos o más cadenas diferentes (heterotrímeros) como en los colágenos I, IV y V (Ezquerria-Brauer y col., 2012).

Métodos de Caracterización de Proteínas

El conocimiento sobre la estructura y función de las proteínas procede del estudio de muchas proteínas individuales. Para estudiar una proteína o varias proteínas en detalle es necesario separarlas y disponer de técnicas que permitan determinar sus propiedades como su tamaño, aminoácidos, grupos funcionales, entre otras. Existen diversas técnicas que nos ayudan a estudiar proteínas, como una centrifugación diferencial para separarlas según su solubilidad, precipitación con sales y/o solventes, o bien, diálisis para separarlas de los disolventes y así, aprovechar el tamaño de las mismas. Por otro lado, existen métodos más potentes para el fraccionamiento de proteínas como la cromatografía en columna, la cromatografía de intercambio iónico y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Otra técnica importante para la separación de proteínas se basa en el desplazamiento de las proteínas en un campo eléctrico, proceso denominado electroforesis. También, se puede investigar el tamaño de las proteínas mediante espectrometría de masas. Particularmente, se han diseñado métodos para determinar la estructura tridimensional de una proteína como la difracción de rayos X, la resonancia magnética nuclear e inclusive la espectroscopia de infrarrojo nos puede dar noción de la estructura secundaria de las proteínas, como un porcentaje de alfas hélice y hojas beta plegadas (Nelson y Cox, 2009).

Electroforesis en Geles de Poliacrilamida en Condiciones Desnaturalizantes con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE)

La electroforesis es un método analítico semipreparativo, en el que se separan biomoléculas, en dependencia entre otros factores de su carga y bajo la acción de un campo eléctrico. Fue empleado por primera vez por Tiselius en el año 1937. Raymond y Weintraub en 1959 emplearon como soporte para la electroforesis un gel de poliacrilamida (PAGE), posteriormente el método fue perfeccionado por varios investigadores como Davis y Ornstein. La popularidad de este creció rápidamente y se logró un aumento de la resolución. El dodecil sulfato de sodio (SDS) se introduce en esta técnica en 1970 por Laemmli, y ya en 1972 se emplean agentes reductores y SDS en la determinación del peso molecular de proteínas en lo que se denominó electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (García-Pérez, 2000).

En la electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE), el tratamiento con SDS asegura la desnaturalización 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 rodea 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 (Pérez-Chabela y col., 2015). 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 (Figura 5), (Weber y Osborne, 1969).

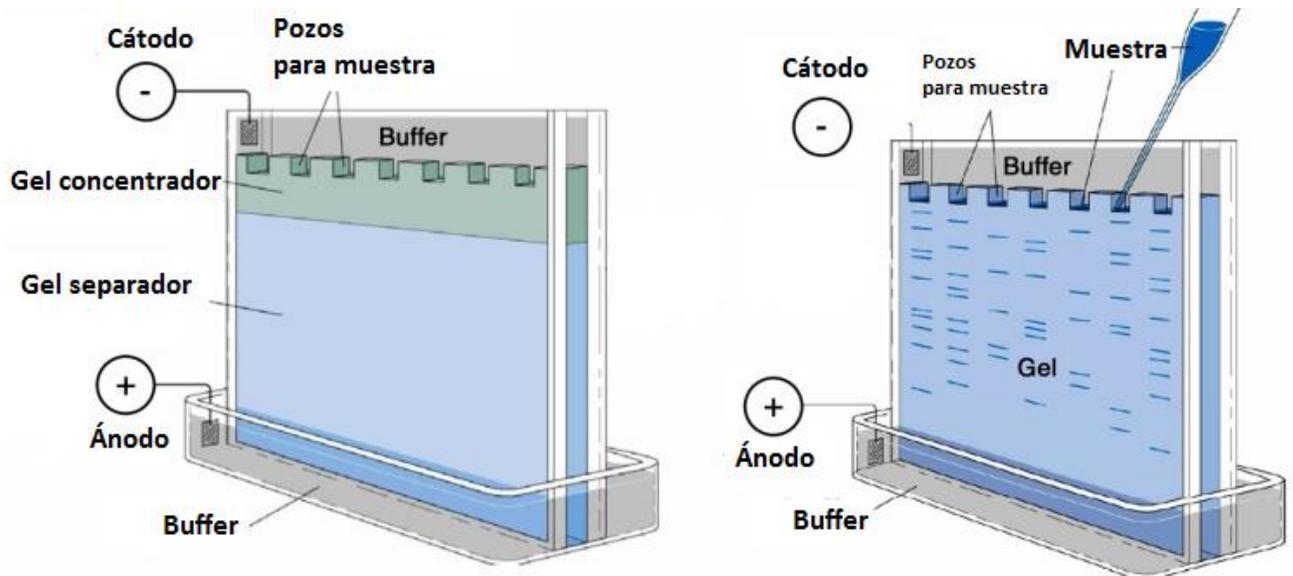


Figura 5. Electroforesis en gels de poliacrilamida. Modificado de Muntané Relat, 2010.

Los gels de poliacrilamida se forman por la co-polimerización de la acrilamida para lo cual se utiliza un agente entrecruzador como la N, N'-metilenbisacrilamida en presencia de un catalizador de ion persulfato en forma de persulfato de amonio y un iniciador como TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilendiamino). La polimerización depende de la temperatura y se debe realizar en una atmósfera inerte ya que el oxígeno puede actuar como un neutralizador de radicales libres, generados por el ión persulfato. Las soluciones de acrilamida se desgasifican debido a que el oxígeno es un inhibidor de la polimerización, véase figura 6. Además, durante la polimerización se libera calor que podría provocar la formación de burbujas en el seno del gel (Pérez-Chabela, 2015).

IR. La luz infrarroja va de la fuente luminosa a un separador de haces, por lo regular hecho de KBr pulido, colocado a un ángulo de 45°. Parte del haz pasa a través del separador de haces y parte se refleja a un ángulo recto. El haz reflejado pega en un espejo estacionario, mientras que el haz transmitido pega en un espejo que se mueve a una velocidad constante. Los haces regresan de los espejos para volver a combinarse en el separador de haces. El haz del espejo móvil ha recorrido una distancia distinta a la del haz del espejo fijo, y los dos haces se combinan para crear un patrón de interferencia llamado interferograma, el cual contiene de manera simultánea todas las frecuencias, pasa a través del compartimiento de la muestra para alcanzar el detector. El interferograma mostrado tiene toda la información contenida en el espectro mostrado en la mitad inferior. Se dice que este interferograma está en el dominio del tiempo, que corresponde a la energía observada por el detector a medida que el espejo se mueve a través de la señal. Un algoritmo de computo estándar llamado transformada de Fourier convierte el dominio del tiempo al espectro en el dominio de la frecuencia que permite observar la intensidad de la absorción como una función de la frecuencia o longitud de onda (figura 7), (Wade 2012).

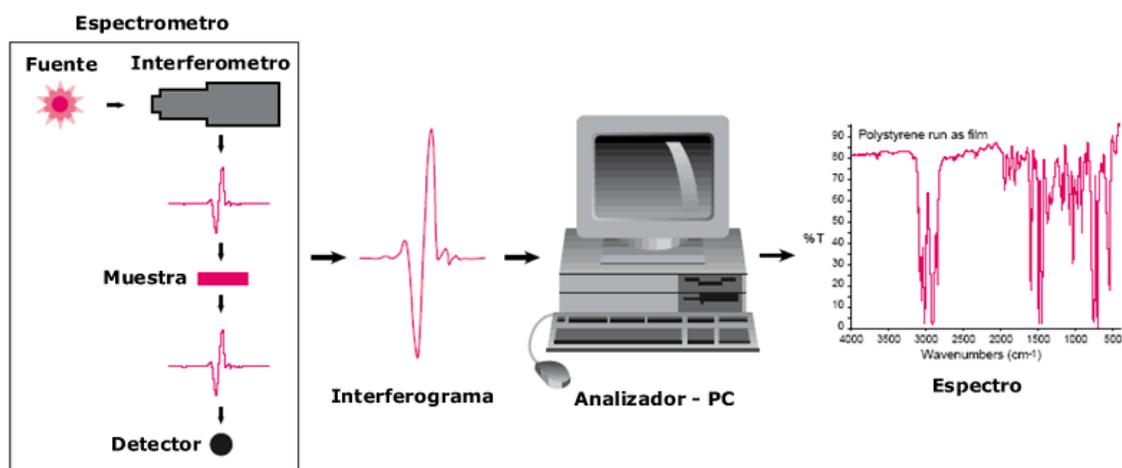


Figura 7. Secuencia de la medición de una muestra en IR. Modificado de UHV 2015.

Los espectros de FTIR nos pueden brindar información sobre la composición química y estructura conformacional de las proteínas, así como los cambios que puedan presentar al someterse al calor o a una glicación (Gómez-Guillén y col., 2010)

Reacción de Maillard

Esta reacción, conocida también como reacción de oscurecimiento de Maillard u oscurecimiento no enzimático, designa un grupo muy complejo de transformaciones que traen consigo la producción de múltiples compuestos que afectan el sabor, el aroma y el valor nutritivo de los productos involucrados (Badui, 2006). La reacción, fue descrita cuando en 1912, el científico francés Louis-Camille Maillard (1878-1936) publicó un documento donde describía la reacción entre aminoácidos y azúcares reductores que durante el calentamiento resultaron en un oscurecimiento en la mezcla de reacción (Maillard 1912).

La reacción de Maillard es increíblemente compleja, pero puede ser resumida en varias etapas de acuerdo con Hodge 1953, como se muestra en la figura 8.

- I. Etapa inicial: Productos sin color y sin absorción en el ultravioleta (alrededor de 280 nm).
Reacción A: Condensación azúcar-amina.
Reacción B: Re arreglo de Amadori.
- II. Etapa intermedia: Productos coloridos o amarillos con alta absorción en el ultravioleta.
Reacción C: Deshidratación de azúcar.
Reacción D: Fragmentación de azúcar.
Reacción E: Degradación de aminoácidos (degradación de Strecker).
- III. Etapa final: Productos altamente coloridos.
Reacción F: Condensación aldólica.
Reacción G: Condensación aldehído-amina y formación de compuestos heterocíclicos nitrogenados.

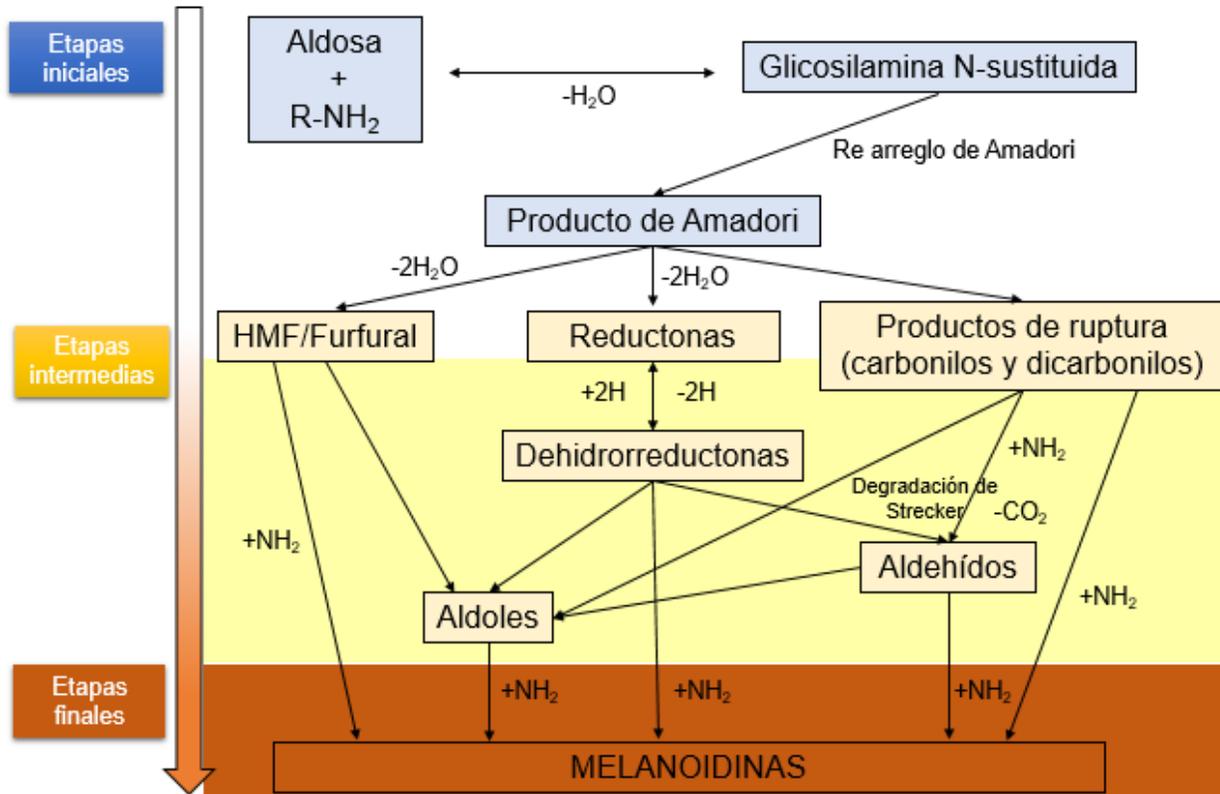


Figura 8. Reacción de Maillard de acuerdo con Hodge 1953. Modificado de Caballero y col., 2016; Nursten 2005.

Es generalmente aceptado que la RM engloba una serie de reacciones complejas interrelacionadas, que pueden ocurrir simultáneamente. Sin embargo, con el fin de simplificar, estas reacciones pueden ser divididas en tres etapas denominadas “inicial”, “avanzada” y “final” (Corzo Marta, 2010).

Etapas Iniciales: Glicosilación No Enzimática o Glicación

Es la etapa mejor caracterizada de la RM. En esta etapa se produce la unión covalente entre una amina primaria proveniente de un aminoácido, péptido o proteína y un grupo carbonilo, generalmente un aldehído o cetona, el cual procede normalmente de un azúcar reductor, aunque también puede proceder de la degradación del ácido ascórbico o de productos formados durante la oxidación lipídica (Chuyen, 1998). El producto de condensación formado pierde una molécula de agua para generar un enlace tipo imina “base de Schiff”, que, por ciclación, se transforma en

la correspondiente glicosilamina N-sustituida, la cual es muy inestable y experimenta un reordenamiento irreversible, denominado reordenamiento de Amadori o de Heyns (Amadori, 1929; Heyns, 1953), dependiendo de si el carbohidrato de partida es una aldosa (D-glucosa) o una cetosa (D-fructosa), respectivamente, para dar lugar al correspondiente compuesto de Amadori (1-amino-1-desoxi-2-cetosa) (Figura 9), o de Heyns (2-amino-2-desoxi-aldosa), el cual es el primer producto estable de la reacción (Ames, 1992).

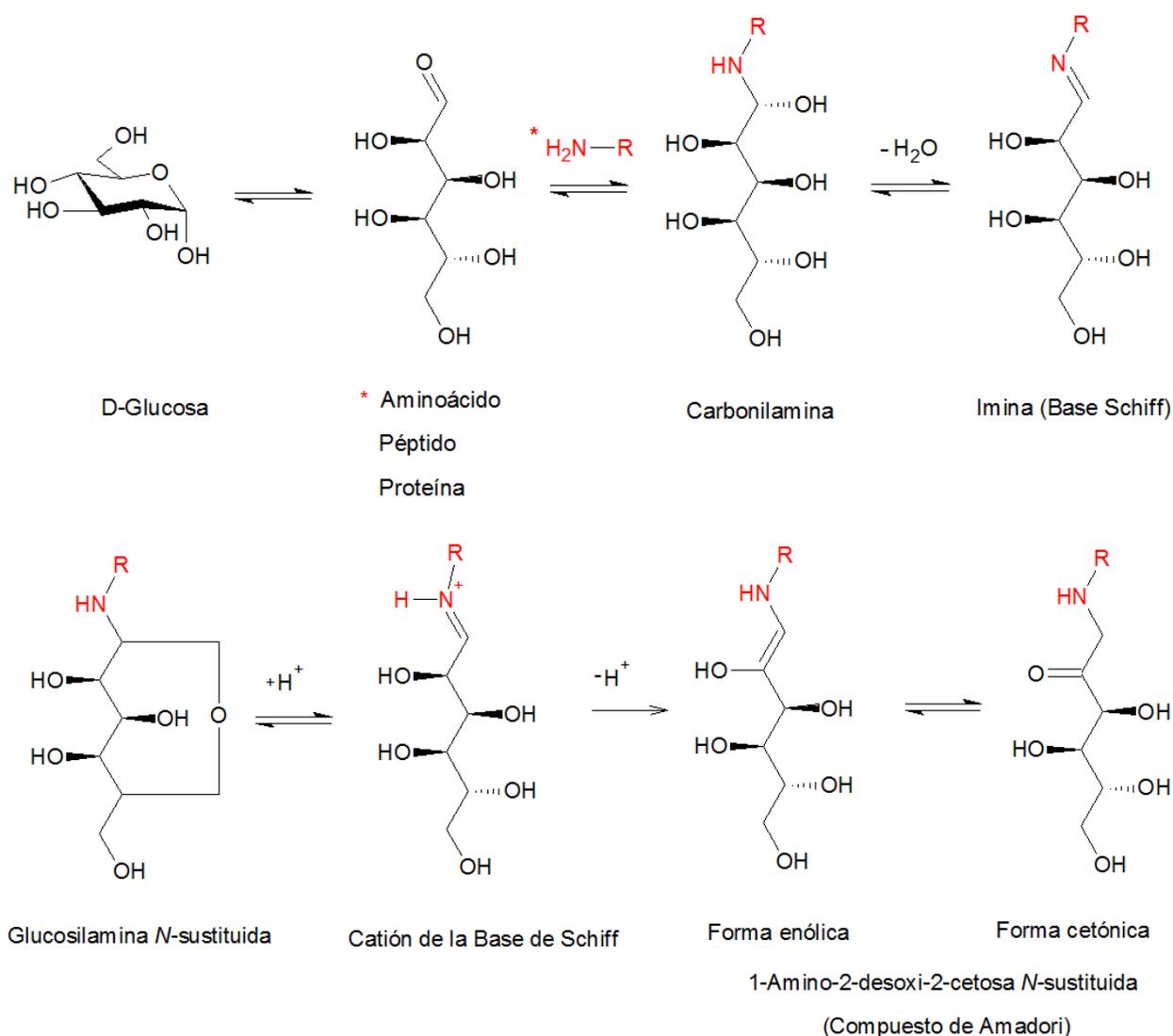


Figura 9. Primera etapa de la RM, formación del compuesto de Amadori. (Nursten, 2005)

Etapas Avanzadas: Formación de Compuestos Dicarbonilos y AGEs

Durante esta etapa se produce la fragmentación de azúcares y la degradación de aminoácidos (degradación de Strecker). El compuesto de Amadori/Heyns, a pesar de ser bastante estable en alimentos con baja actividad de agua, puede experimentar varias reacciones irreversibles de degradación, que conducen a la formación de una gran cantidad de compuestos intermedios de reacción pobremente caracterizados, muchos de ellos con un aroma y sabor típicos (Ledl y Schleicher, 1990). En función del pH, se pueden distinguir dos vías principales de degradación (Figura 10), (Hodge, 1953).

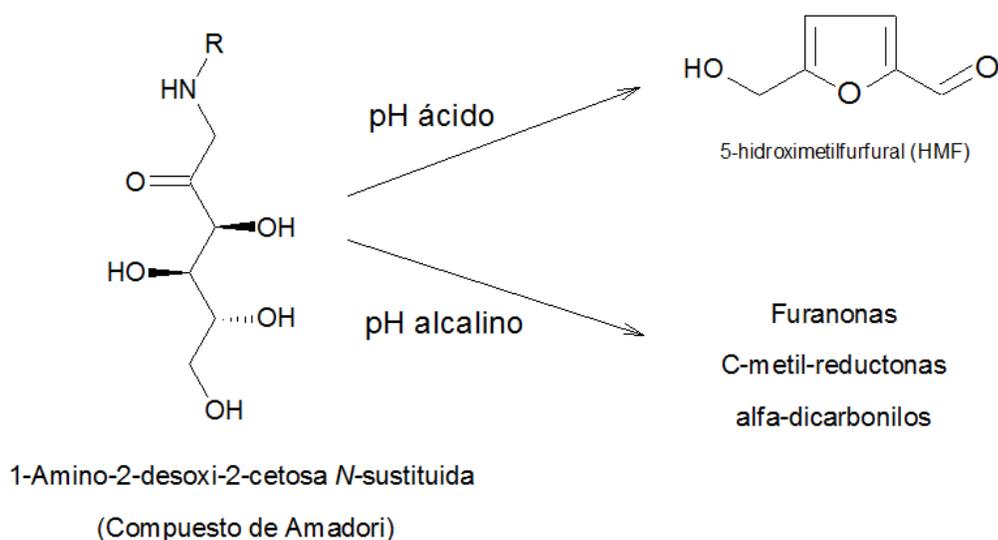


Figura 10. Vías principales de degradación del compuesto de Amadori durante las etapas avanzadas de la reacción de Maillard (de acuerdo con Hodge, 1953). (Corzo Marta, 2010).

Adicionalmente, debido a su elevada reactividad con los grupos amino libres, los compuestos dicarbonilos pueden reaccionar tanto con los residuos de lisina o arginina de las proteínas, así como con intermediarios de los compuestos de Amadori/Heyns, dando lugar a la formación de derivados aminoacídicos, denominados “productos finales de las etapas avanzadas de la glicación” (“advanced glycation endproducts”, AGEs) (Van Nguyen, 2006), los cuales se suelen caracterizar por presentar fluorescencia. Entre los diferentes AGEs fluorescentes que se pueden formar en los alimentos destaca la “N- ϵ -carboximetil-lisina” (CML), la cual resulta de la

degradación oxidativa de los compuestos de Amadori/Heyns formados entre la lisina y una aldosa/cetosa y es utilizada como indicador de la formación de AGEs en alimentos (Ames, 2008). Otros AGEs producidos de esa degradación y que se han encontrado en alimentos como la leche y el pan son pirralina, pronillisina, GODIC y pentosidina, véase figura 11 (Henle, 2005).

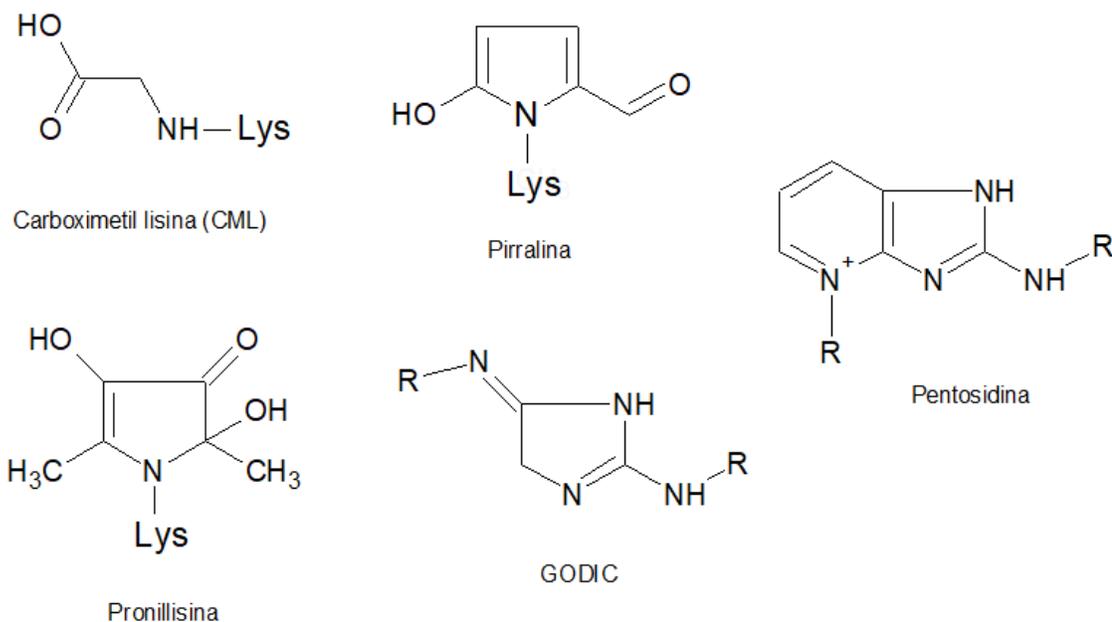


Figura 11. Estructuras propuestas para algunos de los AGEs formados durante las etapas avanzadas de la reacción de Maillard. (Henle, 2005; Oliver y col., 2006).

Etapas Finales: Formación de Melanoidinas

Las etapas finales de la RM engloban una serie de reacciones de ciclación, deshidratación, retroaldolización, reordenamiento, isomerización y condensación de los productos iniciales de la reacción, que dan lugar a oligómeros y polímeros nitrogenados de alto peso molecular, altamente coloreados e insolubles en agua, llamados melanoidinas (Friedman, 1996). Debido a su difícil aislamiento y elevada complejidad, la estructura de las melanoidinas todavía es objeto de estudio. Hasta la fecha, se han propuesto 3 estructuras posibles para las melanoidinas: (i) son sustancias coloreadas de alto peso molecular, formadas durante las etapas avanzadas de la reacción, las cuales se entrecruzan con grupos amino libres de las proteínas (Arg, Lys), dando lugar a estructuras coloreadas de elevado peso molecular (Hofmann, 1998); (ii) son estructuras

macromoleculares constituidas por unidades repetidas de furanos y/o pirroles, unidas a través de reacciones de policondensación (Tressl y col., 1998); (iii) el esqueleto de las melanoidinas está constituido principalmente por productos de degradación de los azúcares (grupos aldehído), formados durante las etapas iniciales de la RM, polimerizados y unidos por compuestos amino (Cämmerer y col., 2002).

Parámetros que Afectan la Reacción de Maillard

Actividad de agua (a_w). Actividades de agua entre 0.2 y 0.3 se consideran idóneas para el almacenamiento de alimentos desecados ya que, en estas condiciones, el agua se encuentra fuertemente ligada y no disponible, por lo que la reacción de Maillard es mínima (Kato y col., 1990).

Condición de pH. A pH alcalino se incrementa la velocidad y alcanza un máximo a pH 10; sin embargo, hay que recordar que existen muy pocos alimentos que tengan pH > 7 en forma natural (como el huevo). Por lo contrario, el mecanismo se inhibe en condiciones muy ácidas, que normalmente no se encuentran en los alimentos (Badui 2006).

Temperatura. Las temperaturas elevadas también la aceleran, pero debido a que su energía de activación es baja, se observa de igual manera hasta en condiciones de refrigeración. En términos generales, la E_a es del orden de 16 a 30 kcal/mol, y el valor de su coeficiente de temperatura, Q_{10} (en el intervalo de 0 a 70 °C), es de dos a tres; es decir, por cada 10 °C de aumento, la velocidad se incrementa entre dos y tres veces (Badui 2006). El incremento tanto en la temperatura como en el tiempo de almacenamiento favorece de forma exponencial el pardeamiento no enzimático (Ryu y col., 2003).

Tipo de carbohidrato. Se ha descrito que la reactividad de los azúcares reductores disminuye con el peso molecular (Nacka y col., 1998). A su vez, la reactividad de los monosacáridos depende de varios factores (Baisier, 1992), incluyendo: proporción de azúcar existente en forma acíclica o abierta (forma reactiva) en disolución acuosa, presencia de grupos cargados en la molécula de azúcar (por ejemplo, grupos fosfato) y electrofilicidad del grupo

carbonilo. De acuerdo con esto, en general, es aceptado que las aldosas (como la glucosa y la galactosa) son intrínsecamente más reactivas que las cetosas (como la fructosa y la tagatosa), sin embargo, en la bibliografía se encuentran datos aparentemente contradictorios sobre las reactividades de la glucosa y la fructosa (Yeboah y col., 2001). Además, se ha descrito que las cetosas podrían dar lugar a un mayor entrecruzamiento y agregación proteica que las aldosas durante las etapas avanzadas de la RM (Sun y col., 2006).

Naturaleza y concentración de los reactantes. En cuanto a la reactividad de los aminoácidos, los más reactivos son los “grupos ϵ -NH₂ libres” de la lisina, así como el “grupo α -NH₂” situado en el extremo amino terminal. Por tanto, un mayor contenido en residuos de lisina podría conllevar un mayor grado de glicación de la proteína. El grupo imidazol de la histidina, el grupo indol del triptófano y el grupo guanidino de los residuos de arginina también son susceptibles de reaccionar con azúcares reductores, pero en menor medida (Oliver y col., 2006).

Generalidades de la Enzima Convertidor de Angiotensina (ECA)

La enzima convertidora de angiotensina (EC 3.4.15.1) es una dipeptidilcarboxipeptidasa, lo que significa que elimina los dipéptidos de los extremos carboxilo de sus sustratos. También es una metalopeptidasa de zinc activada por iones cloruro y tiene una amplia especificidad de sustrato *in vitro*. La enzima se distribuye ampliamente en mamíferos y parece ser similar en conejo, perro, rata, cerdo y al ser humano y estar presente en un gran número de tejidos incluyendo pulmón, riñón, plasma, cerebro, y en el revestimiento endotelial del sistema vascular (Guan-Hong y col., 2004; Wyvratt y Patchett, 1985). Las formas más abundantes tienen pesos moleculares en el intervalo 130-140 kDa, de los cuales aproximadamente el 25% es carbohidrato en peso y por lo tanto es considerada una glicoproteína (El-Dorry y col., 1982). La ECA consta de un sitio activo dividido en tres subunidades o subsitios: S1, S'1 y S'2 (Wyvratt y Patchett, 1985).

Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

El aparato yuxtaglomerular es la región de cada nefrona donde la arteriola aferente entra en contacto con la última porción de la rama ascendente gruesa del asa de Henle, este aparato es esencial para la regulación de la presión arterial debido a que las células granulares del interior de la arteriola aferente secretan la enzima renina a la sangre; esta enzima cataliza la conversión del angiotensinógeno (una proteína) en angiotensina I (un polipéptido de diez aminoácidos) (Fox Stuart, 2011).

La secreción de renina en la sangre resulta entonces en la formación de angiotensina I, la cual es convertida en angiotensina II (un octapéptido con alto poder vasoconstrictor) por la enzima convertidora de angiotensina (Scow y col. 2008). Tal conversión ocurre de manera primaria a medida que la sangre pasa a través de los capilares pulmonares, donde está presente la mayor parte de la ECA. La angiotensina II, estimula la corteza suprarrenal para que secrete aldosterona; por tanto, la secreción de renina desde las células granulares del aparato yuxtaglomerular inicia el sistema renina-angiotensina-aldosterona (Figura 12), (Fox Stuart, 2011).

La importancia clínica del bloqueo del sistema renina-angiotensina-aldosterona debido a la inhibición de la ECA, se ha esclarecido durante los últimos años, lo que ha generado que los inhibidores de la ECA sean considerados como terapia de primera línea contra la hipertensión arterial (Aleixandre y col., 2008).

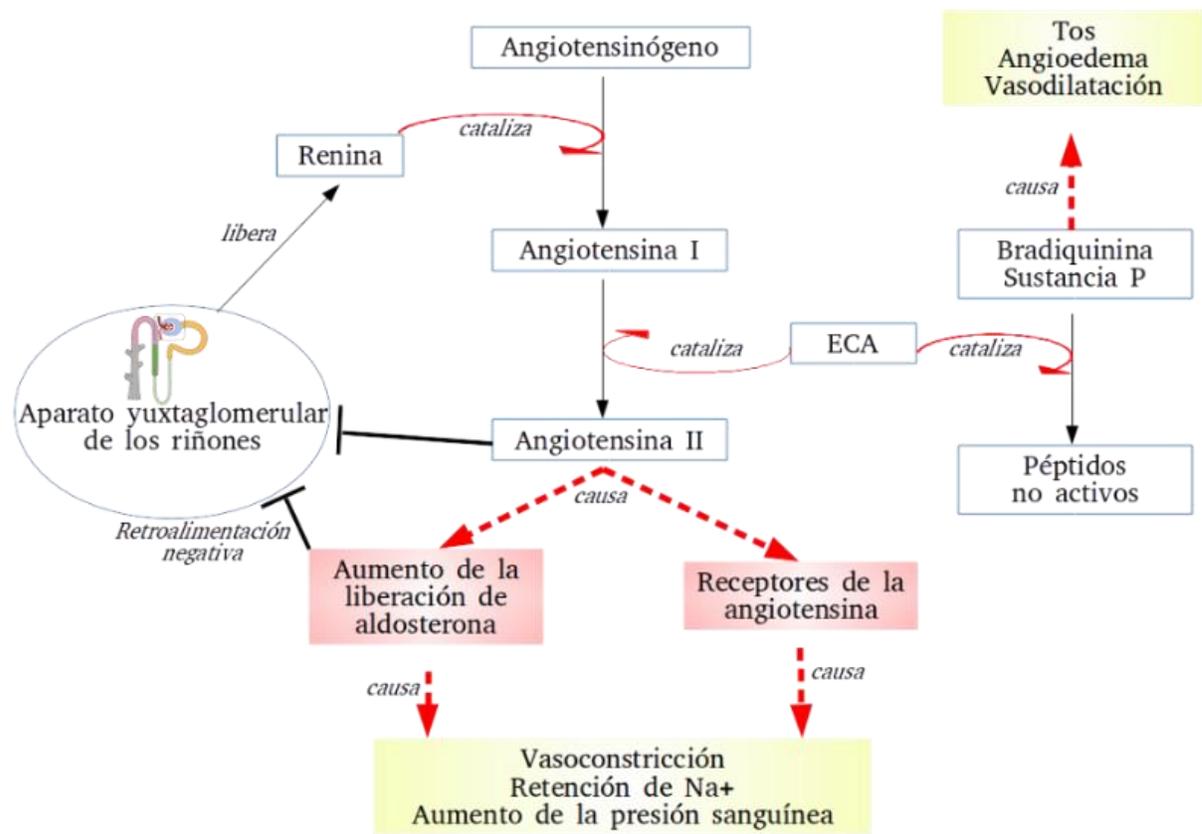
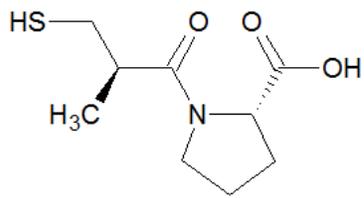


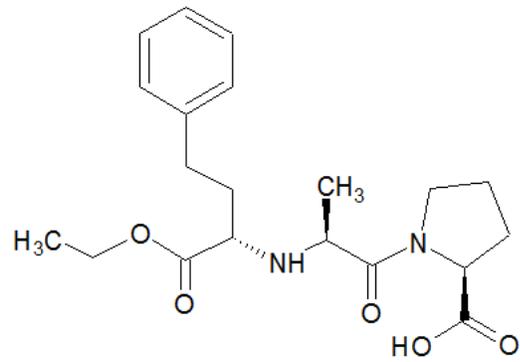
Figura 12. Esquema general del sistema renina-angiotensina-aldosterona. (MedicinABC, 2012)

Inhibidores de la ECA

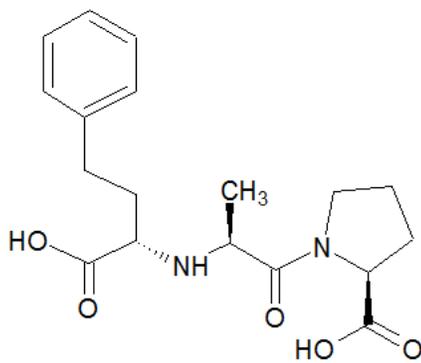
Un inhibidor de la ECA eficaz debe ser diseñado para ocupar sitios obligatorios de unión a la angiotensina I, con un alto grado de especificidad y afinidad intensificada. Existen fármacos comerciales como el captopril, enalapril, enalaprilato (forma activa de enalapril) y lisinopril (Figura 13) capaces de inhibir la ECA y por lo tanto disminuir los niveles de la presión arterial (Raia y col., 1990). Por otro lado, se han estudiado péptidos de origen natural que son capaces de inhibir la ECA, además de péptidos/proteínas modificados vía reacción de Maillard para otorgarles dicha inhibición (Guan-Hong y col., 2004; Hong y col., 2014).



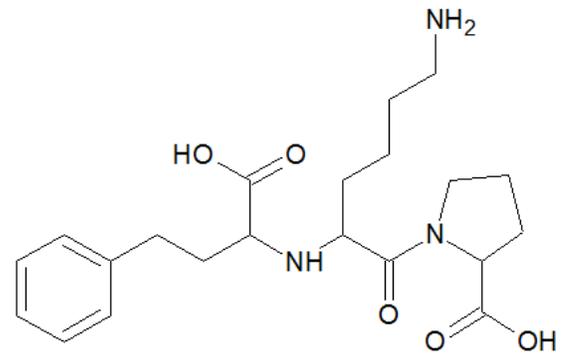
Captopril



Enalapril



Enalaprilato (forma activa de enalapril)



Lisinopril

Figura 13. Estructura química de fármacos comerciales inhibidores de ECA. (Raia y col., 1990).

METODOLOGÍA

El presente trabajo es parte de un proyecto que se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología y Trazabilidad Molecular de los Alimentos del Departamento de Biotecnología en Ciencias Alimentarias dentro del Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON).

Todos los reactivos que se utilizaron para la preparación de las muestras y desarrollo del análisis fueron adquiridos de Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Los tentáculos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) fueron obtenidos de un mercado local y de inmediato se procesaron para la extracción. Para la extracción y glicación de proteínas se utilizó Hidróxido de Sodio (NaOH), Ácido Acético (CH₃COOH), Pepsina, Dextrano 10 kDa producido por *Leuconostoc* spp. y Glucosa.

Para la cuantificación de proteínas se utilizó Azul de Coomassie G-250 (C₄₇H₄₉N₃NaO₇S₂), Albúmina de Suero Bovino (BSA), Etanol (C₂H₆O) y Ácido Fosfórico (H₃PO₄). Mientras para la electroforesis se utilizó: Acrilamida (C₃H₅NO), N,N'-bismetilenacrilamida (C₇H₁₀N₂O₂), TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina, C₆H₁₆N₂), Persulfato de Amonio ((NH₄)₂S₂O₈), Dodecil Sulfato de Sodio SDS (NaC₁₂H₂₅SO₄), Tris ((HOCH₂)₃CNH₂), Ácido Clorhídrico (HCl), Azul de Coomassie R-250 (C₄₇H₄₉N₃NaO₇S₂), Metanol (CH₄O), Ácido Acético (CH₃COOH), Glicina (C₂H₅NO₂), Glicerol (C₃H₈O₃), β-mercaptoetanol (C₂H₆OS), Azul de Bromofenol (C₁₉H₁₀Br₄O₅S). Para el porcentaje de glicación se utilizó o-ftalaldehído (C₈H₆O₂), β-mercaptoetanol (C₂H₆OS), Borato de Sodio (Na₂B₄O₇), Metanol (CH₄O), SDS (NaC₁₂H₂₅SO₄). Por último, para la inhibición de la ECA se utilizó ECA (0.1 U/mL), Enalapril (C₂₀H₂₈N₂O₅), Hippuril-Histidil-Leucina (C₂₁H₂₇N₅O₅), Borato de Sodio (Na₂B₄O₇), Cloruro de Sodio (NaCl), Ácido Clorhídrico (HCl), Acetato de Etilo (C₄H₈O₂) y Agua Ultrapura (MilliQ®).

Extracción de Proteínas del Tejido Conectivo de Calamar Gigante

La obtención de proteínas de tejido conectivo de calamar gigante se desarrolló de acuerdo con Ando M., y col. (2006) y Torres-Arreola y col. (2008). Todo el proceso de extracción de proteínas se llevó a cabo a una temperatura de entre 5 y 8 °C, donde 200 g de tentáculos de calamar gigante fueron troceados y lavados con agua desionizada fría, posteriormente homogenizados en NaOH 0.1 M y fueron colocados en reposo por 24 h. Después, al homogenizado anterior se le

realizó una centrifugación (en una centrifuga refrigerada Hermle/Labnet Z 383 K, a 4 °C) a 4500 rpm durante 40 min y se decantó el sobrenadante, el precipitado fue nuevamente centrifugado a 4500 rpm durante 40 min con agua desionizada (1:3 p/v), esto con la finalidad de remover las proteínas miofibrilares, proteínas sarcoplasmáticas, evitar efectos de proteasas endógenas y para eliminar el hidróxido de sodio remanente, por lo que se realizaron tres lavados consecutivos. Subsiguientemente se dejó en reposo 24 h con pepsina (10 mg/g de tejido conectivo en ácido acético 0.5 M) y se centrifugó a 4500 rpm durante 40 min y el precipitado final, fue considerado como proteínas insolubles y el sobrenadante como proteínas solubles en ácido y pepsina. Las proteínas procedentes de la extracción con pepsina se dializaron frente a ácido acético 0.05 M con una membrana de celulosa de 12-14 kDa y realizando cambios de agua desionizada cada 12 horas.

Cuantificación de Proteínas

La concentración de proteína del extracto proteico soluble en pepsina de tentáculo de calamar gigante se evaluó por el método de Bradford (1976) utilizando albúmina de suero bovino (1 mg/mL) como estándar y una solución de trabajo de Bradford (33 % de etanol al 95 %, 67 % de ácido fosfórico al 85 % y 0.12 % m/v azul de Coomassie G-250), y se analizó en un espectrofotómetro UV/VIS Multiskan GO, Thermo Scientific a una longitud de onda de 595 nm.

Glicación de Proteínas de Tejido Conectivo de Calamar Gigante Vía RM

Una vez cuantificada la concentración de proteínas de tejido conectivo de calamar gigante, se procedió a desarrollar la glicación vía RM, donde se utilizaron dos carbohidratos: Glucosa y Dextrano en condiciones controladas de pH (4.2), temperatura (50 °C) y tiempo de incubación (6 h). Se utilizó la metodología propuesta por Chen y col., (2013) con algunas modificaciones. Se adicionó el carbohidrato a la solución de proteínas de tejido conectivo de calamar y se homogenizaron con un agitador magnético a temperatura ambiente (25 °C) durante 1 h para disolver completamente la mezcla, seguido de una agitación suave durante 12 h a 4 °C para asegurar la completa hidratación de las macromoléculas, y posteriormente se depositaron en tubos de vidrio de 5 mL con la relación proteína:carbohidrato 1:3 (m/m), es decir por cada mg de proteína se utilizaron 3 mg de carbohidrato.

Por último, se calentaron en una estufa de precisión, a las condiciones antes mencionadas, con el fin de obtener productos con un grado de glicación. Pasado el tiempo de formación de la RM las muestras se llevaron a un baño de agua con hielo para detener la reacción. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

Caracterización Parcial de las Proteínas Glicosiladas vía RM

Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se utilizaron geles de poliacrilamida al 7.5 % (SDS-PAGE) siguiendo el método descrito por Laemmli (1970), en los cuales se inyectaron 10 μ L de muestra con en una cámara de electroforesis (Biorad Mini-PROTEAN Tetra System) conectada a una fuente de poder a 110 V durante 130 min. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie R-250 y desteñidos con una solución de metanol: agua: ácido acético (5:4:1, v/v/v). Las bandas proteicas separadas se identificaron por comparación con el estándar de marcador molecular de amplio rango Sigma S8445 (Miosina de corazón de puerco (200 kDa), β -galactosidasa de *E. coli* (116 kDa), Fosforilasa b de músculo de conejo (97 kDa), Albúmina de suero bovino (66 kDa), Glutámica deshidrogenasa de hígado bovino (55 kDa), Ovalbúmina de huevo de gallina (45 kDa), Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de músculo de ratón (36 kDa), Anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos (29 kDa), Tripsinógeno de páncreas bovino (24 kDa), Tripsina inhibidor de soya (20 kDa), α -lactalbúmina de leche bovina (14.2 kDa) y Aprotinina de pulmón bovino (6.5 kDa)). Las imágenes fueron obtenidas mediante un fotodocumentador (MiniBIS Pro, Bio-Imaging Systems).

Porcentaje de Glicación (OPA)

Una forma de medir la glicación de las proteínas vía RM es determinar si existen o no grupos aminos libres en las moléculas proteicas, en este ensayo espectrofotométrico el *o*-ftalaldehído reacciona con aminos primarias en conjunto con β -mercaptoetanol para producir un compuesto que genera fluorescencia, por lo que a mayor absorbancia es mayor la presencia de grupos aminos (Lee y Drescher, 1979), este método fue utilizado para medir dicho porcentaje de glicación

de los glicoconjugados. Se utilizó la metodología de Church y col., 1982, con algunas modificaciones. Se mezclaron 25 µL de los glicoconjugados con 0.5 mL de reactivo OPA (20 mg de *o*-ftalaldehído disuelto en 0.5 mL de metanol, 12.5 mL de buffer de borato de sodio 0.1 M pH 9.85, 1.25 mL de SDS al 20 % en volumen final de 25 mL), posteriormente se mezclaron a temperatura ambiente y se dejaron en reposo por 2 min, su absorbancia fue leída a 340 nm en un espectrofotómetro UV/VIS Multiskan GO, Thermo Scientific, utilizando una placa tipo ELISA NUNC F-bottom 96. Para medir el porcentaje de glicación de los glicoconjugados se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Glicación} = \frac{A_o - A_m}{A_o} \times 100$$

Donde A_o es la absorbancia del blanco (extracto proteico sin carbohidrato calentado a 50 °C durante 6 h) y A_m es la absorbancia de la muestra.

Espectroscopia de Infrarrojo Utilizando Transformada de Fourier (FT-IR)

El extracto proteico, así como los glicoconjugados fueron liofilizados para este estudio. Se utilizó la metodología de Gómez-Guillén y col., (2010). Para dicho análisis, se utilizó un espectroscopio (NICOLET iS50 FT-IR de Thermo Scientific) equipado con ATR. Las muestras fueron leídas a temperatura ambiente y aproximadamente 25 mg de cada liofilizado fueron colocados en una superficie de cristal ATR y se presionaron con émbolo de punta plana. Los espectros se registraron en un rango espectral de 4000 a 500 cm^{-1} y con una resolución espectral de 4 cm^{-1} y con un total de 64 escaneos.

Evaluación de las Etapas Intermedias y Finales de la RM

La formación de los compuestos AGEs y poliméricos pardos, característicos de las etapas intermedias y finales de la RM, se evaluó al medir su absorbancia a 294 nm y 420 nm respectivamente, usando un espectrofotómetro UV/VIS Multiskan GO, Thermo Scientific siguiendo la metodología de Corzo M. y col., 2008.

Espectro UV-Visible

Se realizó un barrido espectral de 200 a 600 nm a todas las muestras (extracto proteico, glicoconjugados de dextrano y glucosa, así como sus tiempos 0) utilizando un espectrofotómetro UV/VIS Multiskan GO, Thermo Scientific

Actividad Inhibidora de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA)

La actividad inhibidora de la ECA a partir de los glicoconjugados se determinó espectrofotométricamente siguiendo la metodología de Cushman y Cheung (1971), y modificado de González-Córdova y col., (2011). Se preparó una disolución de buffer sustrato que contenía 5 mM de Hipuril-L-Histidina-L-Leucina (Hip-His-Leu), en tampón de borato de sodio 100 mM y cloruro de sodio 300 mM, ajustado a pH 8 a 37 °C. La ECA fue de 0.1 U/mL (Sigma-Aldrich). Se prepararon cuatro tubos cónicos eppendorf con las siguientes características: A = 10 µL de buffer sustrato + 4 µL de agua desionizada + 2 µL de ECA; B = 10 µL de buffer sustrato + 2 µL de agua desionizada + 4 µL del inhibidor (glicoconjugados); C = 10 µL de buffer sustrato + 4 µL del inhibidor (glicoconjugados) + 2 µL de ECA; D = 10 µL de buffer sustrato + 6 µL de agua desionizada. Todas las muestras fueron incubadas a 37 °C (en una incubadora Hera Therm de Thermo Scientific) durante 35 minutos. La reacción fue detenida añadiendo 25 µL de HCl 1 M y formar ácido hipúrico. Después, acetato de etilo (100 µL) fue añadido a cada muestra para la extracción de ácido hipúrico (producto de la reacción enzimática). Las muestras fueron agitadas vigorosamente durante 20 s y centrifugados a 1300 x g por 10 minutos. Posteriormente, una alícuota de 75 µL fueron tomados de la fase orgánica (sobrenadante) y fueron evaporados en un termoblock (Thomas Scientific) a 75 °C por 15 min. El precipitado fue suspendido en 100 µL de agua desionizada y agitado vigorosamente. Por último, se colocaron 2 µL de cada muestra en una placa µDrop Plate Thermo Scientific y la absorbancia fue medida a 228 nm en un espectrofotómetro UV/VIS Multiskan GO, Thermo Scientific.

La inhibición de la ECA fue calculada de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad inhibidora de la ECA (\%)} = \left[1 - \frac{C - B}{A - D} \right] \times 100$$

Se realizaron diluciones de los glicoconjugados, así como del extracto proteico calentado y sin calentar, y de los tiempos 0 para inhibir la enzima convertidora de angiotensina. Se utilizaron dos concentraciones: 0.1 mg/mL y 0.05 mg/mL Para validar la metodología modificada se utilizó un control positivo comercial llamado enalapril (inhibidor de la enzima), el cual fue hidrolizado a enalaprilato para tener mayor sensibilidad.

Para la hidrólisis del enalapril a enalaprilato, se utilizó la metodología propuesta por Vermeirssen y col., (2002) con algunas modificaciones. Se añadieron 400 μ L de NaOH 1 M a 1 mL de una solución de enalapril 10^{-3} M y se homigenizaron en agitación constante durante toda la noche a temperatura ambiente. Después, el pH fue ajustado a 8 con HCl 1 M y la solución fue aforada a 2 mL con agua desionizada. Asumiendo que la hidrólisis fue completada, la concentración de enalaprilato fue de 5×10^{-4} M. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas para el análisis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización Parcial de las Proteínas Glicosiladas vía RM

Cuantificación de Proteínas

La concentración de proteínas obtenida de la extracción de tentáculos de calamar gigante fue aproximadamente 0.3 mg/mL de acuerdo con el método de Bradford (1976) utilizando una curva de calibración de albúmina de suero bovino (0 – 0.5 mg/mL) que se muestra en la figura 14.

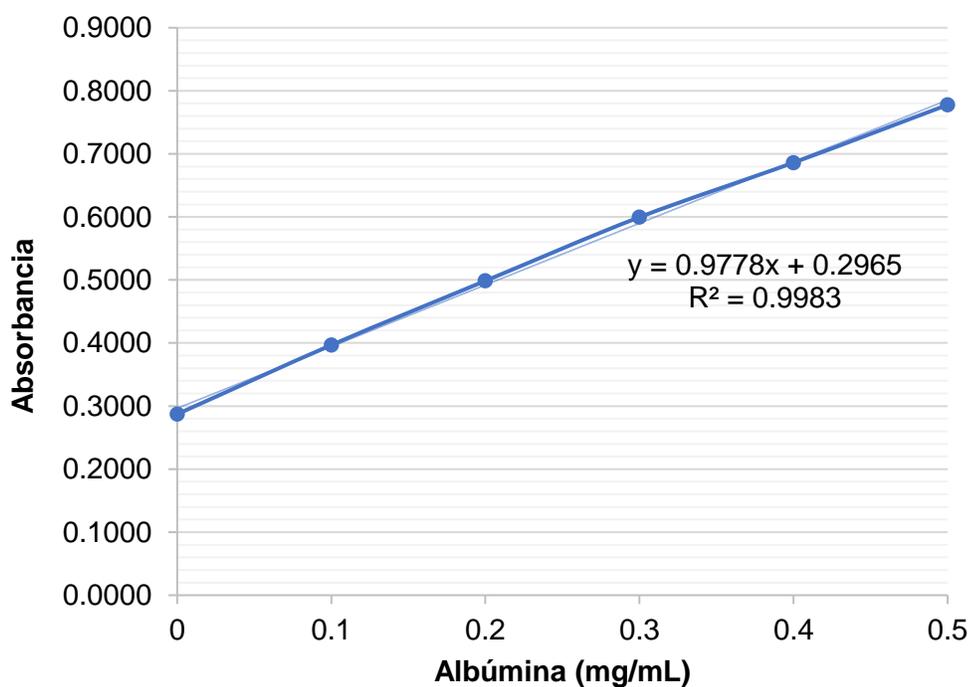


Figura 14. Curva de calibración de albúmina de suero bovino.

Dichas proteínas, en base a la extracción se consideraron como solubles en pepsina. La concentración fue de aproximadamente 0.3 mg/mL así que cada glicoconjugado de dextrano y glucosa contienen una concentración de 0.9 mg/mL de carbohidrato.

Porcentaje de Glicación (OPA)

El porcentaje de glicación para los glicoconjugados producidos utilizando dextrano y glucosa fue de 17.19 y 13.06, respectivamente. Dichos porcentajes se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Porcentaje de glicación de los glicoconjugados de dextrano y glucosa

Muestra	Porcentaje de Glicación
Glicoconjugado de Dextrano	17.20 ± 0.95 (5.54) ^a
Glicoconjugado de Glucosa	13.06 ± 0.40 (3.06) ^b

Cifras con letras diferentes en cada tratamiento muestran diferencias estadísticamente significativas (Duncan, $p \leq 0.05$) ($n = 3$). Porcentaje de glicación ± SD (CV).

Se obtuvo mayor porcentaje de glicación utilizando como carbohidrato dextrano en lugar de glucosa y esto se puede atribuir a que el glicoconjugado de dextrano forma menor cantidad de productos intermedios y la reacción es más lenta que con glucosa (Corzo Marta, 2010). Los porcentajes de glicación son menores al 20 % por lo que se le puede atribuir a que el reactivo OPA no reacciona con aminas secundarias como las que están presentes en los aminoácidos prolina e hidroxiprolina (Lee y Drescher, 1979), y dichos aminoácidos forman parte de las cadenas de colágeno, las cuales pudieran estar presentes en el extracto proteico con el cual se realizó este análisis (Ezquerro-Brauer y col., 2012; Torres-Arreola y col., 2008). De acuerdo con estudios realizados por Xiaoyun y col., 2005, encontraron un porcentaje de glicación de alrededor del 13 % utilizando caseína con dextrano 1:8 a 60 °C y 6 h. Por otro lado, Corzo Marta, 2010, reportó un porcentaje de glicación del 15 % utilizando β -lactoglobulina con galactosa y tagatosa calentada a 50 °C durante 24 h. Además, Sun y col., 2006, reportaron 40 % de glicación utilizando ovoalbúmina con glucosa 1:1 a 55 °C durante 2 días; Chunlin y col., 2014, glicaron ϵ -polilisina con dextrano 1:15 a 110 °C por 60 min y obtuvieron un porcentaje de glicación del 10.5 %. Sin embargo, se debe enfatizar que los autores mencionados trabajaron con proteínas y carbohidratos de distinta naturaleza, pero obtuvieron algunos resultados similares a las condiciones utilizadas en este estudio.

Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Los glicoconjugados formados a partir de dextrano y glucosa, así como el extracto proteico soluble en pepsina se visualizan en la figura 15, en un gel de poliacrilamida al 7.5 %. Los glicoconjugados presentan dos bandas entre los 45 y 55 kDa. A diferencia del extracto proteico que presenta tres bandas entre los 116 y 200 kDa, y una banda mayor a 200 kDa, además de una banda de aproximadamente a los 116 kDa, dos bandas debajo de los 66 kDa, dos bandas por encima de los 55 kDa y debajo de los 66 kDa, y dos bandas por debajo de los 45 kDa y superiores a los 36 kDa (como se visualiza en las flechas de la figura 15).

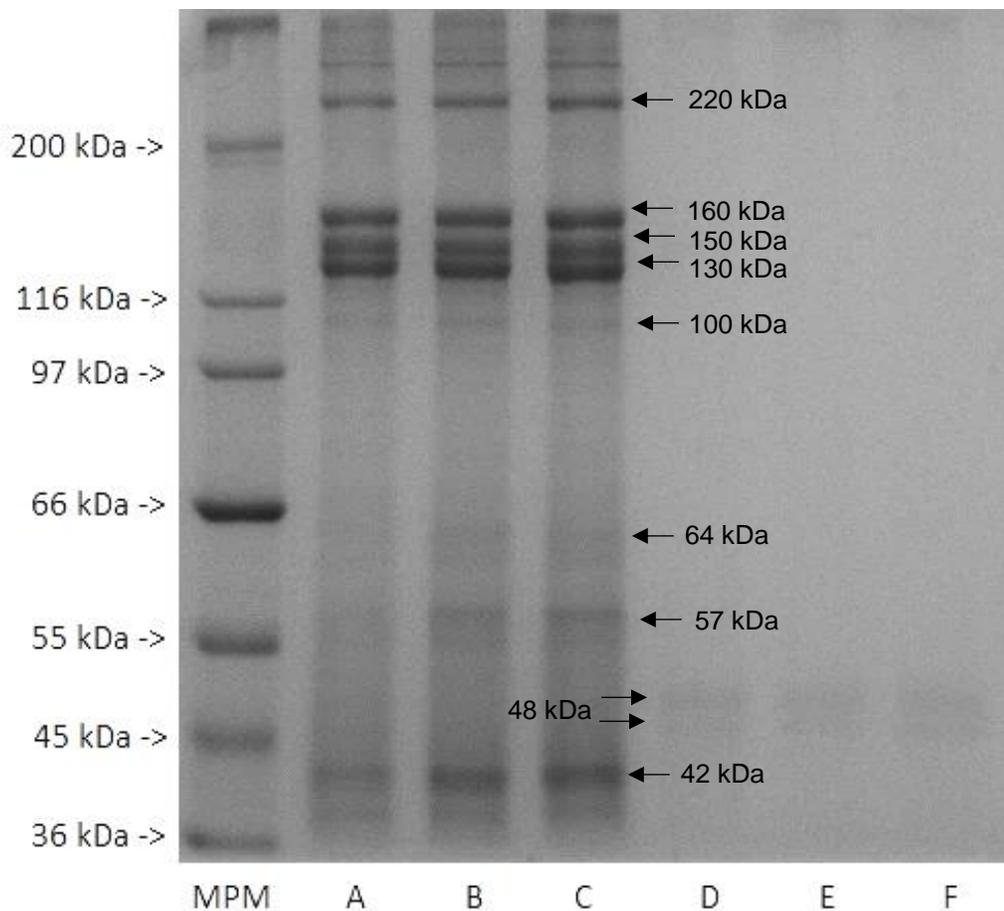


Figura 15. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7.5 % de los glicoconjugados, tiempos 0 y extracto proteico. MPM: marcador de peso molecular, A: Extracto proteico, B: Extracto proteico con dextrano sin calentar, C: Extracto proteico con glucosa sin calentar; D: Extracto proteico calentado 6 h; E: Glicoconjugados de dextrano; F: Glicoconjugados de glucosa.

Es reportado por diversos autores que el colágeno está constituido por tres cadenas polipeptídicas (α) cercanas a los 100 kDa (Badii y Howell, 2003; Ezquerro-Brauer y col., 2012), sin embargo, el colágeno soluble en pepsina extraído de tentáculos de calamar gigante muestra tres bandas entre los 116-200 kDa y además, una banda superior a los 200 kDa (Figura 15, carriles A, B y C), lo cual concuerda con lo obtenido por Torres-Arreola y col., 2008, donde encontraron el mismo patrón de bandas y en la misma zona anatómica. Reportaron que la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes con SDS, que dos de estas cadenas α pueden estar unidas entre sí por medio de entrecruzamientos intramoleculares para formar lo que se conoce como una cadena β . Por otra parte, el uso de pepsina radica principalmente en la habilidad de degradar aquellas porciones de moléculas de colágeno a partir de las cuales se originan los entrecruzamientos, por lo que se obtuvo una fracción de colágeno soluble en pepsina que es superior en peso molecular a otros tipos de colágeno (Torres-Arreola y col., 2008). Del mismo modo, Fu y col., 2013, encontraron dos cadenas α y una cadena β en colágeno soluble en pepsina de *D. gigas* con pesos moleculares de entre 97 kDa y 200 kDa. Por otra parte, las bandas cercanas a los 97 kDa se le puede atribuir a paramiosina (Dublán-García, 2006), las bandas por encima de los 55 kDa se les puede atribuir a elastina (Osuna-amarillas y col., 2015), por último, la banda superior a 36 kDa e inferior a 45 kDa puede corresponder a tropomiosina (Nakamura y col., 2005). El colágeno, así como elastina son proteínas del tejido conectivo, sin embargo, la atribución a las otras proteínas, las cuales son miofibrilares y sarcoplasmáticas es debido a una infiltración de ellas durante la extracción. Todavía cabe señalar que en los carriles D, E y F, de la figura 15, corresponde al extracto proteico calentado y a los glicoconjugados producidos con dextrano y glucosa, respectivamente, es evidente que no se visualizan las mismas bandas comparadas con los carriles A, B y C, a excepción de dos bandas superiores a los 45 kDa, por lo que se pudiera deber a que dichas proteínas sufrieron una hidrólisis y por ello, no presentan el mismo patrón de bandas (véase carril D de la figura 15). En los carriles D, E y F, de la figura 15, las bandas que pudieran corresponder a colágeno, elastina y tropomiosina no se visualizan en comparación con el carril A (extracto proteico, figura 15), por lo que solamente se observan dos bandas cercanas a los 45 kDa, de las cuales una de ellas pudiera considerar tropomiosina. También se debe mencionar de la razón que en los carriles D, E y F no se visualicen las bandas proteicas es que pudiera ser debido a un problema de tinción y resolución. Se ha mencionado en la literatura que el colorante de tinción para proteínas Azul de Coomassie R-250, no tiñe totalmente las proteínas que fueron glicosiladas, de manera que se recomienda utilizar una tinción que utilice ácido peryódico de Schiff que oxida los carbohidratos unidos a las proteínas a grupos aldehídos, los cuales se detectan a través de la formación de

enlaces basados en Schiff con un reactivo que produce bandas magentas (Ray y col., 2013; Pierce Glycoprotein Staining Kit, Thermo Scientific). Sin embargo, las bandas de los glicoconjugados aproximadamente a los 45 kDa que si se lograron teñir, presentan un ligero aumento con respecto a al extracto proteico calentado, lo que quiere decir que aumentó muy poco el peso molecular y eso es confirmado con el porcentaje de glicación reportado.

Espectroscopia de Infrarrojo Utilizando Transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros típicos de FTIR del extracto proteico soluble en pepsina de *D. gigas*, así como de los glicoconjugados de dextrano y glucosa, se muestran en las figuras 16, 17 y 18 respectivamente. La comparación de espectros típicos de FTIR entre proteínas solubles en pepsina de *D. gigas* y sus glicoconjugados, se muestran en la figura 19.

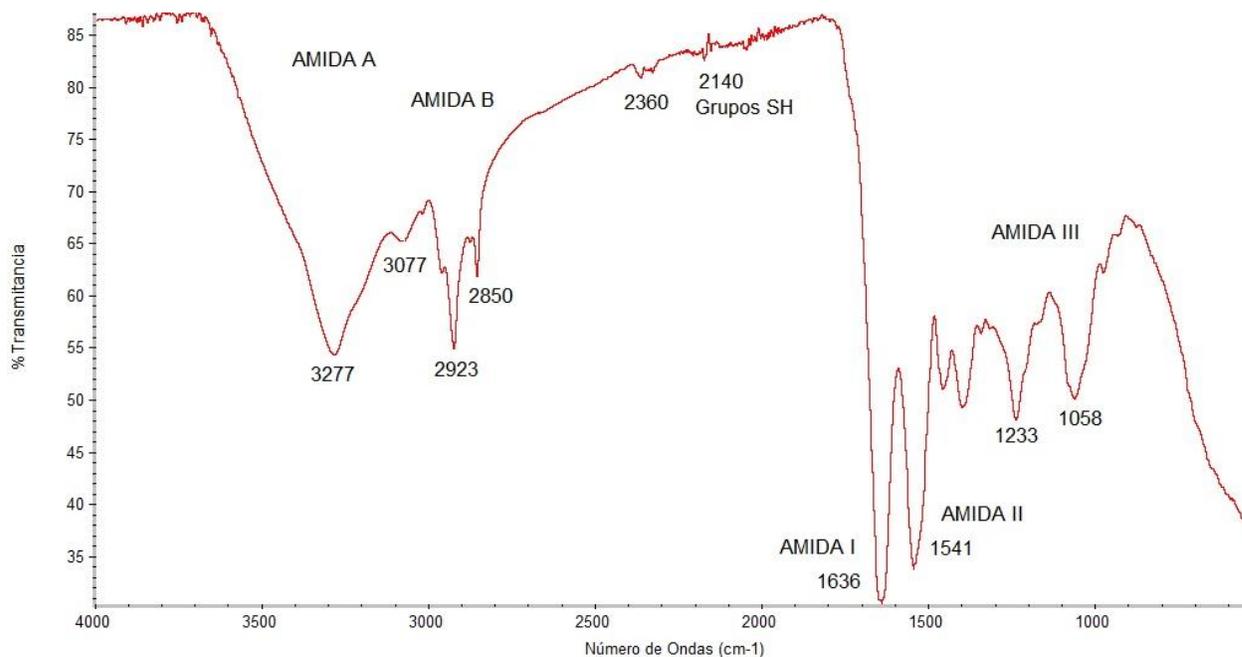


Figura 16. Espectro típico de FTIR de proteínas solubles en pepsina de *D. gigas*.

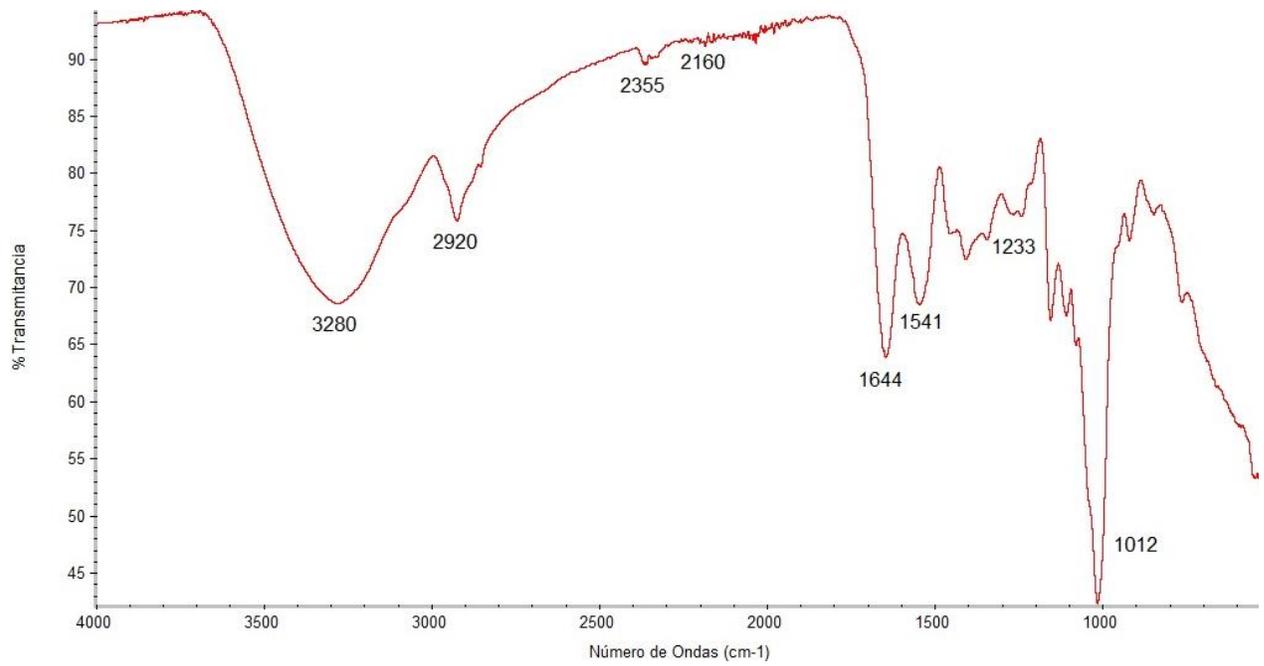


Figura 17. Espectro típico de FTIR del glicoconjugado de dextrano.

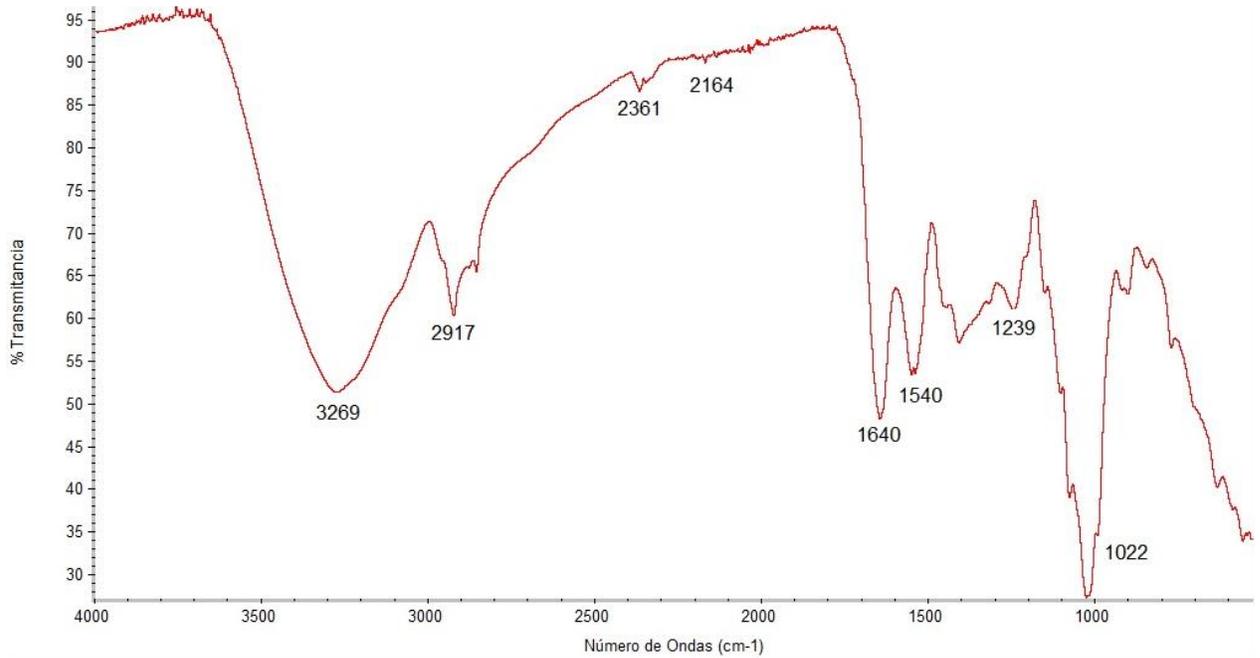


Figura 18. Espectro típico de FTIR del glicoconjugado de glucosa.

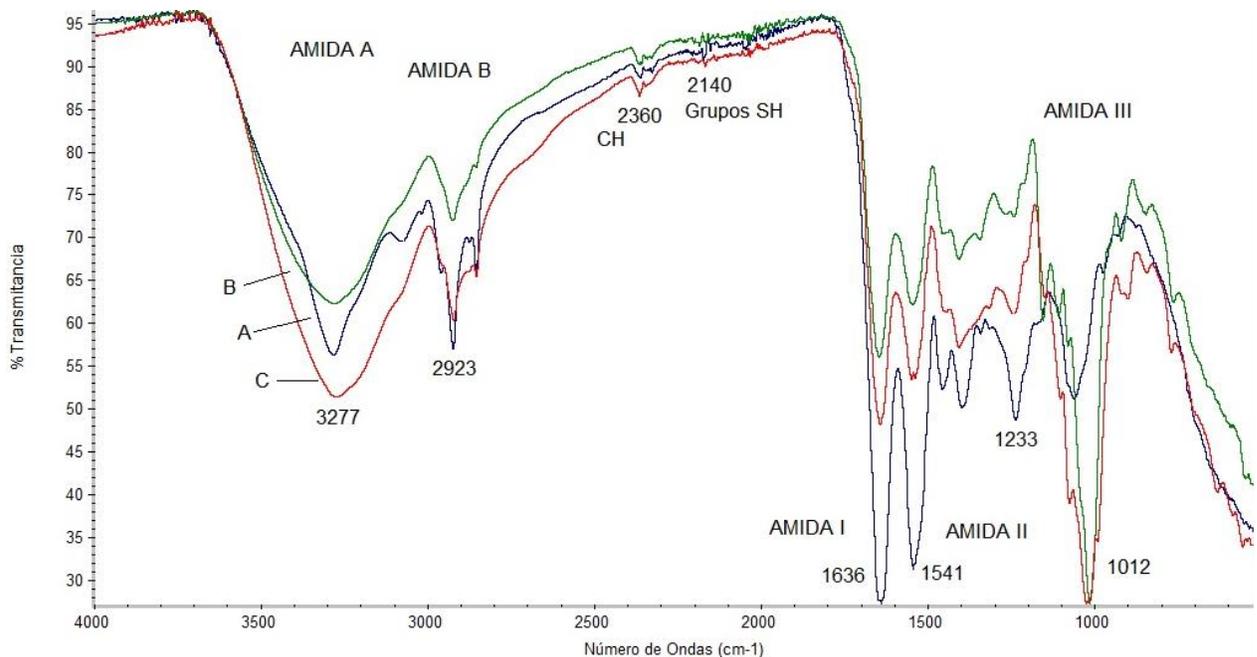


Figura 19. Comparación de espectros típicos de FTIR entre proteínas solubles en pepsina de *D. gigas* y sus glicoconjugados. Proteínas solubles en pepsina de *D. gigas* (A), glicoconjugado de dextrano (B) y glicoconjugado de glucosa (C).

El extracto proteico, así como los glicoconjugados presentan una banda de entre 3280 – 3269 cm^{-1} (amida A), que es característico del estiramiento de las vibraciones de grupos OH y NH, como lo reportaron Gómez-Guillén y col., 2010. La amida B mostró dos bandas entre 2923 – 2917 y 2850 cm^{-1} , los cuales son atribuidos al estiramiento CH_2 del esqueleto de las proteínas (Arrondo & Goñi, 1999). Ambas muestras mencionadas presentan dos bandas de 2361 – 2355 cm^{-1} y 2164 – 2140 cm^{-1} , que son atribuidos al estiramiento CH y grupos SH en las moléculas proteicas, respectivamente (Tolano-Villaverde, y col., 2016). La vibración de la amida I, se visualiza entre 1640 – 1636 cm^{-1} , la cual se atribuye al enlace carbonilo $\text{C}=\text{O}$ de las amidas provenientes de proteínas. La vibración de la amida II, se visualiza entre 1540 – 1541 cm^{-1} , dicho estiramiento se debe al enlace N-H y C-H del enlace amida de las proteínas (Moreno y col., 2012). Por último, el enlace llamada amida III se visualiza entre 1239 – 1233 cm^{-1} , es atribuido a un sistema complejo residuales de CH_2 de los aminoácidos glicina y prolina del colágeno (Uriarte-Montoya y col., 2011). El espectro del extracto proteico coincide con el reportado por Fu y col., 2013, el cual también es de proteínas solubles en pepsina.

Entre el extracto proteico y los glicoconjugados (véase figura 19) se visualiza una diferencia significativa en la amida A (3269 – 3280), dichas bandas en los glicoconjugados se ensanchan en comparación con el extracto proteico y esto es debido a una mayor presencia de enlaces OH proveniente de los carbohidratos y las interacciones de enlaces de hidrógeno que estos confieren. Por otra parte, también hay diferencia en la banda de 1058 – 1022 cm^{-1} , el cual es atribuido a los enlaces C-O y C-O-C de los carbohidratos (Ramírez-Guerra y col., 2015), por lo cual esa banda se visualiza de mayor tamaño en los glicoconjugados que en el extracto proteico, debido a los carbohidratos dextrano y glucosa. Por último, el enlace amida I (1636 – 1644 cm^{-1}) presenta menos absorción en los glicoconjugados comparado con el extracto proteico, esto es debido a la primera etapa de la RM, donde se condensa el grupo carbonilo con aminas primarias (Hong y col., 2014).

Medición de Etapas Intermedias y Finales de la RM

Para la medición de etapas intermedias y finales de la RM, las absorbancias a 294 y 420 nm de los glicoconjugados, de los tiempos 0 (extracto proteico con carbohidrato sin calentar) y del extracto proteico se muestran en las figuras 20 y 21, respectivamente.

En la figura 20, se muestra que el extracto proteico presenta mayor absorbancia a 294 nm que el resto de los sistemas tratados. Dicha absorbancia va decreciendo, obteniéndose menor absorbancia con el glicoconjugado de glucosa. A esta longitud de onda presenta mayor absorbancia los productos intermedios de la RM (Shuping Wu y col., 2013), por lo que el glicoconjugado de glucosa presentó menos productos intermedios comparado con el glicoconjugado de dextrano.

En la figura 21, se muestra que los glicoconjugados de dextrano y glucosa presentan mayor absorbancia a 420 nm comparado con el extracto proteico y los tiempos 0. A esta longitud de onda, se miden compuestos poliméricos pardos característicos de las etapas finales de la RM, por lo cual los glicoconjugados presentaron dichos compuestos (Corzo Marta, 2010).

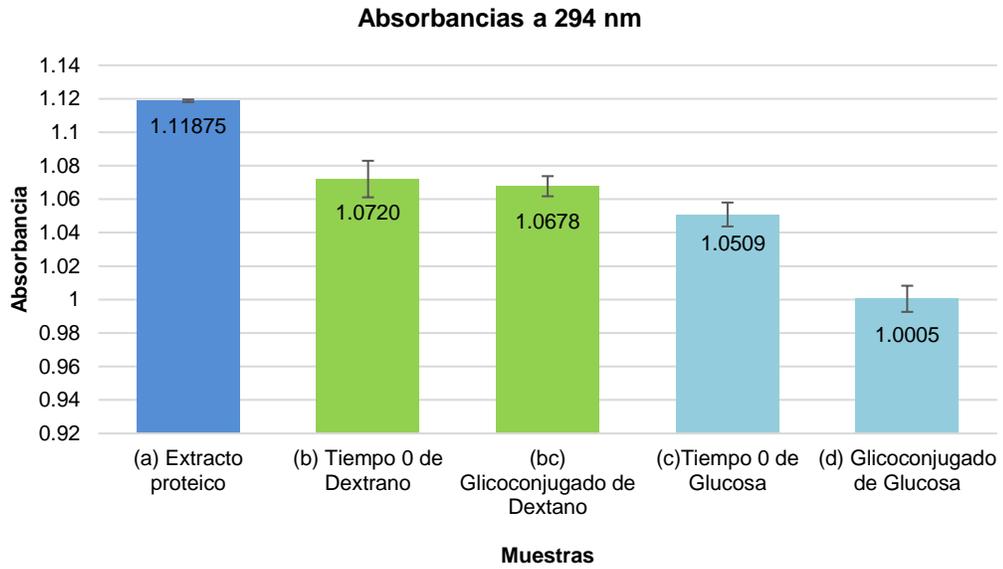


Figura 20. Medición de etapas intermedias de la RM.

Letras diferentes en cada tratamiento muestra diferencias estadísticamente significativas (Duncan, $p \leq 0.05$) ($n = 3$).

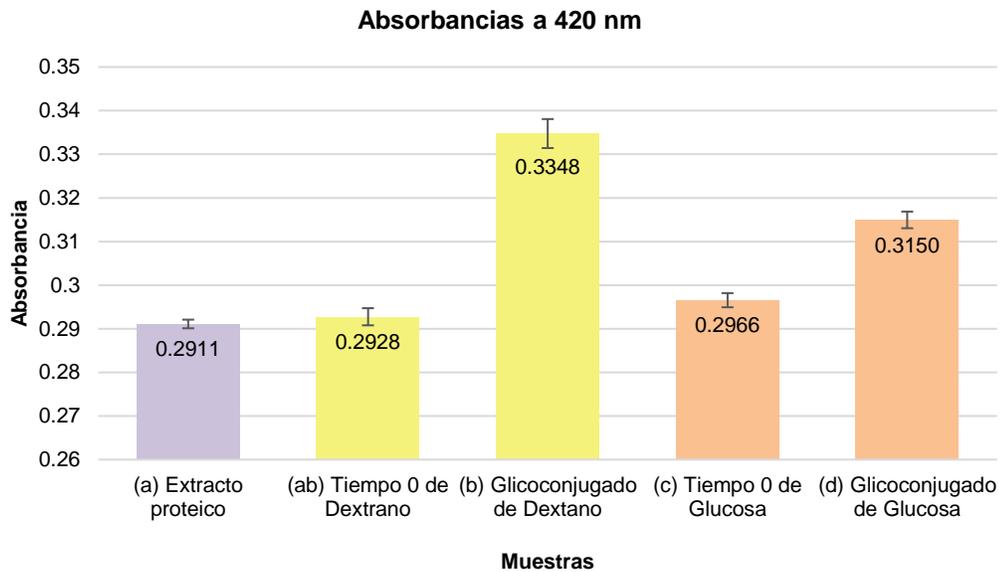


Figura 21. Medición de etapas finales de la RM.

Letras diferentes en cada tratamiento muestra diferencias estadísticamente significativas (Duncan, $p \leq 0.05$) ($n = 3$).

Espectro UV-Visible

El barrido espectral de las muestras se visualiza en la figura 22.

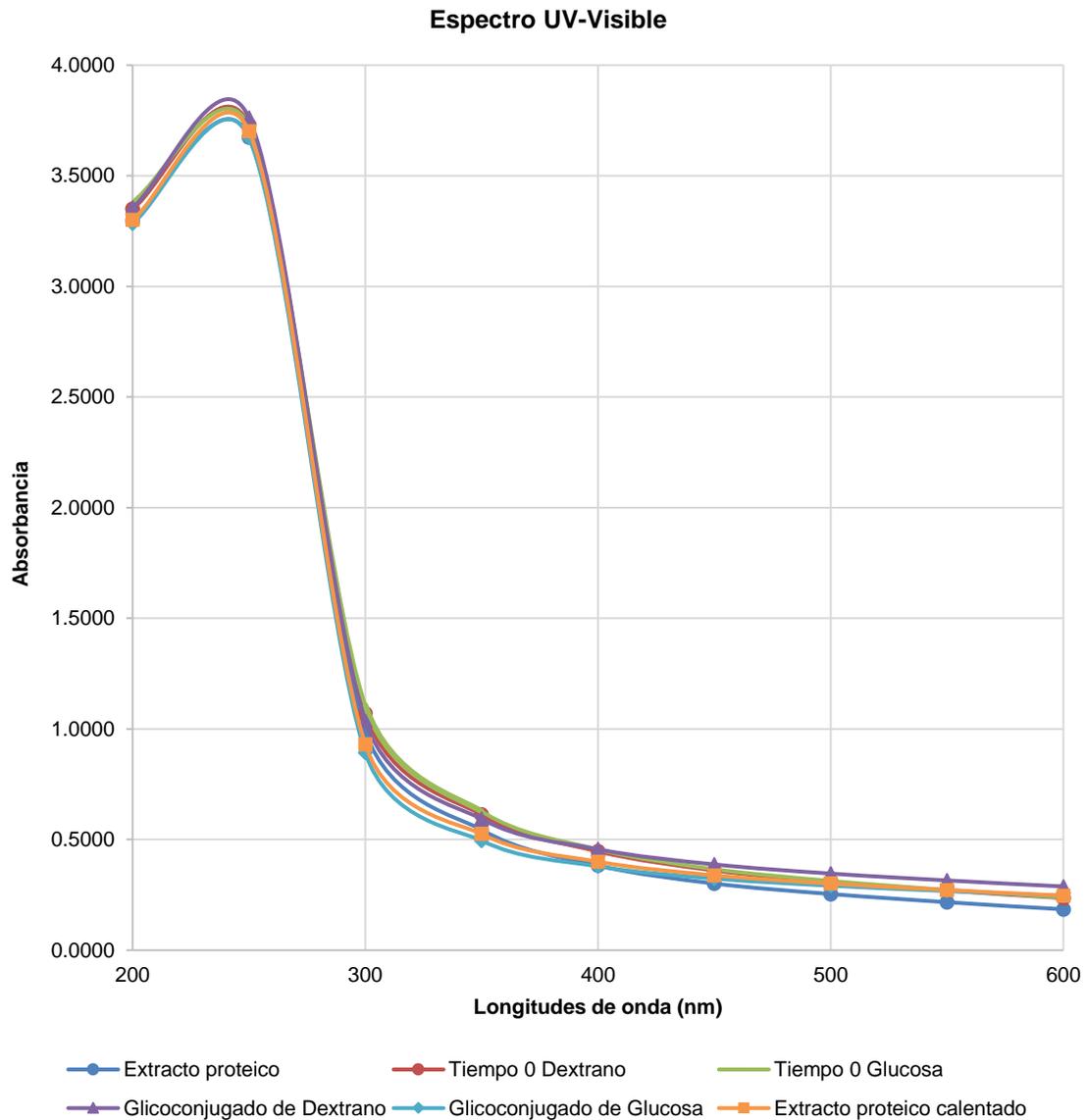


Figura 22. Espectro UV-Visible de las diferentes muestras en un intervalo de 200 – 600 nm.

El extracto proteico muestra menor absorbancia a partir de 400 nm y el glicoconjugado de dextrano presenta mayor absorbancia a partir de 350 nm. Las demás muestras presentan mayor absorbancia que el extracto proteico debido a que están homogenizadas con los carbohidratos.

Actividad Antihipertensiva *in vitro*

Con el fin de validar la sensibilidad de la metodología se realizó una curva de calibración de enalaprilato utilizando concentraciones conocidas de enalaprilto con su respectivo porcentaje de inhibición, como se muestra en la figura 23. Debido a que las concentraciones de enalaprilato son muy pequeñas (5×10^{-4} – 5×10^{-13} M) se utilizó el logaritmo de la concentración en contra del porcentaje de inhibición. La concentración de enalaprilato en este ensayo que inhibe el 50 % de la actividad enzimática (IC_{50}) de la ECA es de 7.8×10^{-10} M. Por otro lado, Vermeirssen y col., 2002, encontraron una IC_{50} de enalaprilato de 4.96×10^{-9} M, que es mayor comparada con la obtenida en este ensayo. Según reportado en la literatura, el intervalo de la IC_{50} del enalaprilato es de 1×10^{-10} – 6×10^{-9} M (Allan y col., 1987; Hiwada y col., 1990; Weisser 1991). Aunado a lo anterior, la IC_{50} calculada en este ensayo se encuentra en el rango de IC_{50} encontrado por otros investigadores, sin embargo, la finalidad de utilizar enalaprilato como un control positivo fue como lo mencionado anteriormente, validar la sensibilidad de la metodología.

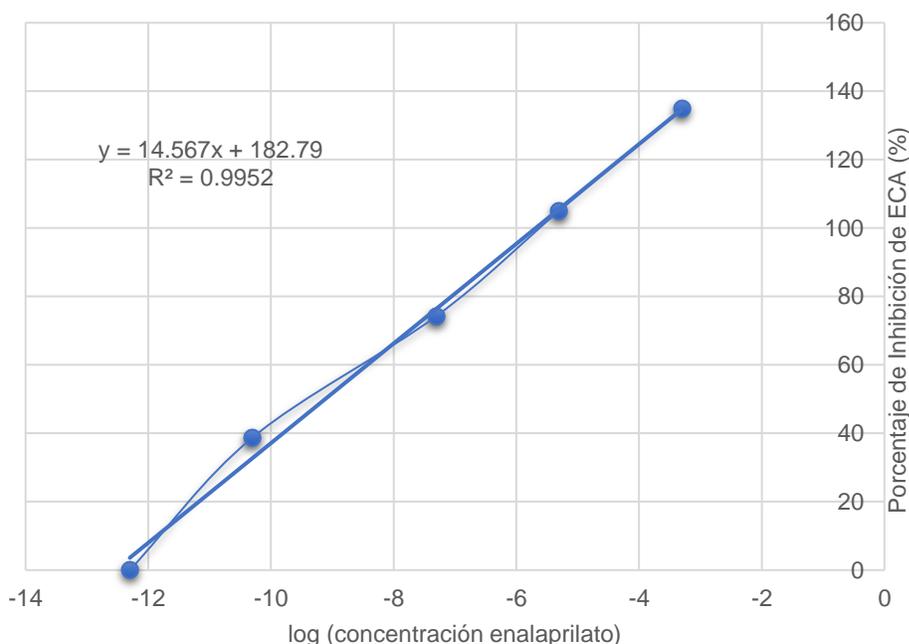


Figura 23. Curva de calibración del logaritmo de la concentración de enalaprilato en contra del porcentaje de inhibición.

Inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA)

Los porcentajes de inhibición de la ECA de las muestras utilizadas a concentraciones de 0.1 mg/mL y 0.05 mg/mL se visualizan en la tabla 2.

Tabla 2. Porcentajes de inhibición de la ECA

Muestra	Concentración	
	0.1 mg/mL	0.05 mg/mL
Extracto Proteico	111.25 ± 7.8 (7.01) ^a	87.35 ± 3.77 (4.32) ^a
Extracto Proteico Calentado	122.22 ± 11.07 (9.06) ^{ab}	61.08 ± 3.97 (5.92) ^b
Glicoconjugado de Dextrano	139.30 ± 5.37 (3.85) ^c	77.91 ± 4.23 (5.42) ^a
Tiempo 0 de Dextrano	112.08 ± 3.55 (3.17) ^a	101.01 ± 7.74 (7.66) ^c
Glicoconjugado de Glucosa	134.55 ± 11.50 (8.54) ^{bc}	109.58 ± 3.81 (3.48) ^c
Tiempo 0 de Glucosa	109.58 ± 6.29 (5.74) ^a	105.83 ± 3.81 (3.60) ^c

Cifras con letras diferentes en cada columna muestran diferencias estadísticamente significativas (Duncan, $p \leq 0.05$) (n = 3). Porcentaje de inhibición de la ECA ± SD (CV).

Todas las muestras a una concentración de 0.1 mg/mL que fueron evaluadas presentaron una inhibición de la ECA mayor al 100 % (tabla 2). Las muestras a concentración de 0.05 mg/mL como lo son los tiempos 0 de dextrano y glucosa, y el glicoconjugado de glucosa, inhibieron la ECA al 100 % (tabla 2). Sin embargo, el extracto proteico crudo y calentado, así como el glicoconjugado de dextrano inhibieron la ECA en un 87.35 %, 61.08 % y 77.91 %, respectivamente. La inhibición de la ECA del extracto proteico y calentado se le puede atribuir a las proteínas de menor peso molecular (figura 15), las cuales podrían tener residuos en sus cadenas polipeptídicas que inhiban el sitio activo de la enzima, o bien, la unión enzima-sustrato. Por otro lado, la reacción de Maillard le confirió al extracto proteico (0.05 mg/mL) mayor capacidad de inhibir la ECA para el glicoconjugado de glucosa, pero para el glicoconjugado de dextrano no fue así. Esto se puede atribuir a que el glicoconjugado de glucosa tiene mayor cantidad de productos intermedios (PRM/AGEs), y en comparación del glicoconjugado de dextrano que debido al impedimento estérico impide un mayor avance de la RM (Corzo Marta, 2010), por lo que el glicoconjugado de glucosa presenta productos intermedios los cuales al ser de bajo peso

molecular pudieran inhibir el sitio activo de la ECA, por otro lado, el glicoconjugado de dextrano se le puede atribuir la inhibición al impedimento estérico, es decir al ser muy grande las moléculas no dejarían actuar debidamente a la enzima *in vitro*.

En base a la literatura, Lin y col., 2012, reportan una concentración con la cual inhiben el 50 % de la actividad enzimática (IC_{50}) de 0.39 mg/mL con hidrolizados de colágeno de calamar gigante; Alemán y col., 2011, reportaron una IC_{50} entre 0.3 – 1 mg/mL en distintos hidrolizados de colágeno de calamar; Saiga y col., 2008 reportaron una IC_{50} de 0.28 mg/mL en hidrolizados de colágeno de pollo. Estas concentraciones son mayores a las utilizadas en este análisis (0.1 y 0.05 mg/mL), sin embargo, los autores mencionados utilizaron péptidos de una hidrólisis proteica, lo que significa que necesitan más concentración de los mismos para inhibir la ECA en un mayor porcentaje. Por otro lado, Hong y col., 2014, utilizaron hidrolizados de caseína con xilosa 1:1 a 110 °C por 30 min y encontraron una IC_{50} de 0.3 mg/mL; Jiang y col., 2013, utilizaron péptidos de caseína con galactosa 1:1 a 95 °C por 1 h y a una concentración de 30 mg/mL se inhibió el 50 % de la ECA.

Sin embargo, los estudios fueron realizados con hidrolizados proteicos, los cuales se necesitan mayores concentraciones para inhibir la ECA comparadas con las utilizadas en este estudio. Al mismo tiempo, Hwang y col., 2012 menciona que el mecanismo de acción para la actividad inhibidora de ECA de los productos formados en la interacción grupo amino-carbohidrato en la RM es desconocido. Esto probablemente se debe a que la ECA depende del Zn^{2+} , y parte de la actividad inhibidora podría estar relacionada con la quelación de metales por lo que, se necesitarán más estudios para entender el mecanismo de la inhibición de la ECA en la glicosilación de proteínas.

CONCLUSIONES

Se visualizaron proteínas de tejido conectivo de calamar mediante SDS-PAGE en el rango del peso molecular reportado para proteínas como colágeno, paramiosina, elastina y tropomiosina,

Se presentó un incremento en el peso molecular relacionado al grado de glicación en la zona de peso molecular correspondiente a tropomiosina, sin embargo, en las otras fracciones proteicas no se observó dicho incremento, debiéndose probablemente al tipo tinción con Azul de Coomassie.

Se observaron disminuciones en las vibraciones de los enlaces amida A, B, I, II y III, de los glicoconjugados con respecto al extracto proteico, lo cual indica que existe una glicosilación.

Se logró inhibir la actividad de la enzima convertidora de angiotensina a más del 100 % con los glicoconjugados de dextrano y glucosa a una concentración de 0.1 mg/mL y menores al 100 % con el glicoconjugado de dextrano a 0.05 mg/mL. Por lo que la reacción de Maillard les confirió a estas proteínas un mayor porcentaje de inhibición de la ECA.

Se lograron caracterizar parcialmente las proteínas del tejido conectivo *Dosidicus gigas* glicosiladas vía reacción de Maillard en cuanto al peso molecular, el porcentaje de glicación y algunos grupos funcionales que las constituyen, para ser consideradas en otros estudios con fines de aplicación en cuanto a la bioactividad o como ingredientes alimentarios.

RECOMENDACIONES

Sugiero futuros estudios sobre la inhibición de la ECA de manera *in vivo*. Si bien, las proteínas del tejido conectivo de calamar gigante glicosiladas vía reacción de Maillard utilizadas en este estudio lograron inhibir la ECA *in vitro*, un estudio *in vivo* demostraría con mayor jerarquía el uso de estas proteínas glicosiladas vía RM en el tratamiento de la hipertensión arterial. Así mismo, realizar ensayos de digestión *in vitro* a estas proteínas, o bien, utilizar péptidos de este origen glicosilados vía RM *in vitro* e *in vivo*.

Utilizar una metodología específica para la identificación de proteínas glicosiladas, como lo es el kit Glycoprotein Staining de Thermo Scientific, el cual diferencia a las proteínas glicosiladas de las no glicosiladas en geles de poliacrilamida.

Además, implementación de otras técnicas para la caracterización de estas proteínas glicosiladas como es la espectrometría de masas, difracción de rayos X, dicroísmo circular, entre otras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alemán A., Pérez-Santín E., Bordenave-Juchereau S., Arnaudin I., Gómez-Guillén M.C. and Montero P. (2011). Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *Food Research International* 44, 1044–1051.

Aleman, A., M. C. Gomez-Guillen, and P. Montero (2013). Identification of ace-inhibitory peptides from squid skin collagen after in vitro gastrointestinal digestion: *Food Research International*, v. 54, p. 790-795.

Aleixandre, A., Miguel, M., & Muguerza, B. (2008). Péptidos antihipertensivos derivados de proteínas de leche y huevo. *Nutrición Hospitalaria*, 23(4), 313–318.

Allan G, Cambridge D, Hardy GW, Follenfant MJ (1987). BWA575C, a chemically novel agent with angiotensin converting enzyme inhibitor and beta-adrenoceptor-blocking properties. *Br J Pharmacol*;90:609–15.

Amadori, M. (1929). The condensation product of glucose and p-anisidine. *Atti della Accademia Nazionale dei Lincei*. 9, 226–230.

Ames, J. M. (2008). Determination of N-e-(carboxymethyl) lysine in foods and related systems. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1126, 20-24.

Ando M, Nakagishi Y, Yoshida K, Nakao M, Nakagawa, Makinodan Y, Tsukamasa & Kawasaki Y (2006). Pyridinoline concentrations in muscular and skin collagen of fish and relationship between collagen solubility and pyridinoline concentration in fish muscular collagen. *Fisheries Scienc*,; 72: 1104–1108.

Arias Moscoso Joe Luis (2009). Estudio de biopelículas de compositos de quitosano de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) y quitosana. Universidad de Sonora, División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Arrondo, J.L.R. & Goñi, F.M. (1999). Structure and dynamics of membrane proteins as studied by infrared spectroscopy. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 72, 367–405.

Aruoma, O. I. (1998). Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75, 199–212.

Bächinger Hans Peter y Engel Jürgen (2005). *Structure, Stability and Folding of the Collagen Triple Helix*. *Top Curr Chem* 247: 7–33 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Badii, F.; Howell, N. (2003). Elucidation of the effect of formaldehyde and lipids on frozen stored cod collagen by FT-Raman spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51 1440-1446.

Badui Dergal Salvador (2006). *Química de los alimentos*, cuarta edición, Pearson, pp 61-70.

Baisier, W. M., y Labuza, T. P. (1992) Maillard browning kinetics in a liquid model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 707-713.

Benjakul Soottawat, Lertittikul Wittayachai, Bauer Friedrich (2005). Antioxidant activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein–sugar model system. *Food Chemistry* 93, 189–196.

Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72: 248-254.

Brown, C. y Kiesel, J. (2003). Squid Dissection: From Pen to Ink. *Science Activities*, 40:16-22.

Buonocore, G., Perrone, S., & Tataranno, M. L. (2010). Oxygen toxicity: Chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 15, 186–190.

Caballero B., Finglas P.M. y Toldrá F. (2016). *Encyclopedia of Food and Health*, ELSEVIER ISBN 978-0-12-384947-2.

Cämmerer, B., Jalyschko, W., y Kroh, L. W. (2002). Intact carbohydrate structures as part of the melanoidin skeleton. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (7), 2083-2087.

Chen H., Wang P., Wu, F., Xu J., Tian Y., Yang N., Cissouma A., Jin Z., Xu X. (2013). Preparation of phosvitin-dextran conjugates under high temperature in a liquid system. *International Journal of Biological Macromolecules* 55:258– 263.

Chunlin L., Fuguo L., Ying G., Yingying W., Honggao X., Fang Y. and Yanxiang G. (2014). Investigation into the Maillard reaction between ϵ -polylysine and dextran in subcritical water and evaluation of the functional properties of the conjugates. *LWT - Food Science and Technology* 57, 612-617.

Church F., Swaisgood H., Porter D., Catignani G. (1982). Spectrophotometric assay using o-Phtaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins.

Chuyen, N. V. (1998) Maillard reaction and food processing – application aspects. *Process-Induced, Chemical Changes in Food*. 434, 213-235.

Cortés-Rodicio J. y Jarabo-Lallana S. (2006). Espectroscopia de Transformada de Fourier. Departamento de Física Aplicada.

Corzo-Martínez M., Moreno F. Villamiel, M. (2008) Structural characterization of bovine β lactoglobulin-galactose/ tagatose maillard complexes by electrophoretic, chromatographic, and spectroscopic methods. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 4244-4252.

Corzo Martínez Marta (2010). Caracterización, funcionalidad tecnológica y bioactividad de proteínas lácteas glicosiladas vía reacción de Maillard, Universidad autónoma de Madrid, Departamento de química física aplicada, tesis doctoral.

Cushman, D.W., & Cheung, H.S. (1971). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemistry and Pharmacology*, 20, 1637–1648.

De la Cruz, G.F., Urciaga, G.J., Salinas, Z.C., Cisneros, M.M., Beltrán, M.L. (2007). Análisis socioeconómico de las pesquerías de camarón y calamar gigante en el Noroeste de México. *Interciencia* 32, 144 –150.

Dihort-Garcia, G., V. M. Ocano-Higuera, J. M. Ezquerro-Brauer, M. E. Lugo-Sanchez, R. Pacheco-Aguilar, S. M. Barrales-Heredia, and E. Marquez-Rios (2011). Production and functional evaluation of a protein concentrate from giant squid (*Dosidicus gigas*) obtained by alkaline dissolution: *Cyta-Journal of Food*, v. 9, p. 171-179.

Dublán García Octavio (2006). Evaluación de los cambios estructurales y fisicoquímicos del manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) durante el almacenamiento en refrigeración o congelación. Universidad Autónoma Metropolitana. División de Ciencias Biológicas y de la Salud, tesis doctoral.

El-Dorry H. A., Pickett C. B., MacGregor J. S., and Soffer R. L. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 4295.

Ehrhardt N. M., Solís N.A., Jaquemin P.S., Ortiz C.J., Ulloa R.P., González D.G. y García (1986). Análisis de la biología y condiciones del stock del calamar gigante *Dosidicus gigas* en el Golfo de California, México, durante 1980. *Ciencia Pesquera*. 5:63-76.

Eyre David R. y Wu Jiann-Jiu (2005). Collagen Cross-Links. *Top Curr Chem* (2005) 247: 207–229 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Ezquerro Brauer, Josafat Marina, Norman Haard F., Rosalina Ramírez Olivas, Hermenegildo Olivas Burrola y Carlos J. Velásquez Sánchez (2002), "Influence of Harvest Season on the Proteolytic Activity of Hepatopancreas and Mantle Tissues from Jumbo Squid (*Dosidicus gigas*)", *Journal of Food Biochemistry*, Connecticut, 26: 459-475.

Ezquerro-Brauer J.F., Uriarte-Montoya M.H., Arias-Moscoso J.L. and Plascencia-Jatomea M. (2012). By-Products From Jumbo Squid (*Dosidicus gigas*): A New Source of Collagen Bio-Plasticizer?, *Recent Advances in Plasticizers*, Dr. Mohammad Luqman (Ed.), ISBN: 978-953-51-0363-9, InTech.

Friedman M. (1996). Food browning and its prevention: an overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 631-653.

Fortoul Van Der Goes Teresa I. (2013). Histología y biología celular, segunda edición, Mc Graw Hill, pp 98-107.

Fox Stuart Ira (2011). Fisiología humana, doceava edición, McGraw Hill, pp 599-605.

Fu W., Wang Y., Zheng B., Liao M & Zhang W. (2013). Isolation and Characterization of Pepsin-Soluble Collagen from the Skin of Peru Squid (*Dosidicus gigas*). Journal of Aquatic Food Product Technology, 22:270–280.

García Pérez Hilda Marilín (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. Laboratorios Beterá, UNIV DIAG;1(2):31-41.

Gómez-Guillén MC., López-Caballero ME., Alemán A., López de Lacey A., Giménez, B. and Montero, P. (2010). Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin. Sea By-Products as Real Material: New Ways of Application: 89-115 ISBN: 978-81-7895-485-1 Editor: Estelle Le Bihan.

González-Córdova A. F., Torres-Llanaez M. J., Rodríguez-Figueroa J. C., Espinosa-de-los-Monteros J. J., Garcia H. S. & Vallejo-Córdoba B. (2011). Actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina en leches fermentadas con cepas de *Lactobacillus*. CyTA – Journal of Food Vol. 9, No. 2, 146–15.

Guan-Hong Li, Guo-Wei Le, Yong-Hui Shi and Sundar Shrestha (2004). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological. Nutrition Research 24, pp 469–486.

He, H. L., Liu, D., & Ma, C. B. (2013). Review on the angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitor peptides from marine proteins. Applied Biochemistry and Biotechnology, 169, 738–749.

Henle T. (2005). Protein-bound advanced glycation endproducts (AGEs) as bioactive amino acid derivatives in foods. Amino Acids, 29: 313–322.

Heyns, K., Meinecke, K. H. (1956). The formation and preparation of D-glucosamine from fructose and ammonia. Chemische Berichte 86, 1453-1562.

Hiwada K, Inoue Y, Kokubu T. (1990). Effect of SQ29,852, a new angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor with a phosphonic acid group, on the activity of angiotensin converting enzyme from human kidney. *Gen Pharmacol*; 21:555–8.

Hodge, J. E. (1953). Chemistry and browning reactions in model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1, 928-943.

Hofmann, T. (1998) Studies on the relationship between molecular weight and the color potency of fractions obtained by thermal treatment of glucose amino acid and glucose/protein solutions by using ultracentrifugation and color dilution techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (10), 3891-3895.

Hong Xu, Meng Jun and Rong-Rong Lu (2014). Improvement of ACE inhibitory activity of casein hydrolysate by Maillard reaction with xylose. *J Sci Food Agric*; 95: 66–71.

In Guk Hwang a, Hyun Young Kim a, Koan Sik Woo b, Junsoo Lee a, Heon Sang Jeong a, (2011). Biological activities of Maillard reaction products (MRPs) in a sugar–amino acid model system. *Food Chemistry* 126, 221–227.

Jiang Z., Wang L., Wua W. and Wang Y. (2013). Biological activities and physicochemical properties of Maillard reaction products in sugar–bovine casein peptide model systems. *Food Chemistry* 141, 3837–3845.

Kato, A., Sasaki, Y., Furuta, R., y Kobayashi, K. (1990). Functional protein-polysaccharide conjugate prepared by controlled dry-heating of ovalbumin-dextran mixtures. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54, 107–112.

Laemmli, U. K (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. 227, 680-685.

Le, J.M. (1992). The Maillard reaction. En: B. J. F. Hudson (Ed.), *Biochemistry of Food Proteins*, Elsevier Science Publishers, London, pp 99–153.

Ledl, F. y Schleicher, E. (1990). New aspects of the maillard reaction in foods and in the humanbody. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 29 (6), 565-594.

Lee K. S. and Drescher D. G. (1979). Derivation of Cysteine and Cystine for Fluorescence Amino Acid Analysis with the o-Phtaldialdehyde/2-Mercaptoethanol Reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 254, No. 14, Issue of July 25, pp. 6248-6251.

Lin Lin, Shun Lv and Bafang Li (2012). Angiotensin-I-converting enzyme (ACE)-inhibitory and antihypertensive properties of squid skin gelatin hydrolysates. *Food Chemistry* 131, 225–230.

López-Enriquez R.L., Ocano-Higuera V.M., Torres-Arreola W., Ezquerra-Brauer J.M., and Márquez-Ríos E. (2015). Chemical and Functional Characterization of Sarcoplasmic Proteins from Giant Squid (*Dosidicus gigas*) Mantle. *Hindawi Publishing Corporation Journal of Chemistry* Volume 2015, Article ID 538721, 10 pages.

Luna, R.M., Urciaga, G.J., Salinas, Z.C., Cisneros, M.M., & Beltrán, M.L. (2006). Diagnóstico del consumo del calamar gigante en México y en Sonora. *Economía, Sociedad y Territorio*, 6(22), 535–560.

Maillard LC. (1912). Action des acides amines sur les sucres; formation de melanoides par voie méthodique. *C R Acad Sci*. 154:66–68.

Marquez-Rios, E., Moran-Palacio, E.F., Lugo-Sanchez, M.E., Ocaño-Higuera, V.M., & Pacheco-Aguilar, R. (2007). Postmortem biochemical behavior of giant squid (*Dosidicus gigas*) mantle muscle stored in ice and its relation with quality parameters. *Journal of Food Science*, 72(7), 356–362.

Moreno H.M., Montero M.P., Gómez-Guillén M.C., Fernández-Martín F., Mørkøre T., and Borderías J. (2012). Collagen characteristics of farmed Atlantic salmon with firm and soft fillet texture. *Food Chemistry* 134, 678–685.

Muntané Relat L. (2010). Introducción a la investigación básica. *Sociedad Andaluza de Patología Digestiva*. Disponible en: <https://www.sapd.es/revista/2010/33/3/03>

Muyonga, J. H., Cole, G. B., and Duodu, K. G. (2004). Characterization of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chem.* 85: 81–89.

Nakamura Atsushi, Watanabe Kazuhiko, Ojima Takao, Dong Hyun Ahn & Saeki Hiroki And (2005). Effect of Maillard Reaction on Allergenicity of Scallop Tropomyosin. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 7559–7564

Nelson David L. y Cox Michael M. (2009). LEHNINGER Principios de Bioquímica, quinta edición, Ediciones Omega S.A. Barcelona, ISBN: 978-84-282-1486-5, pp 84-134.

Nesis, K.N. (1983). *Dosidicus gigas*. in: Boyle P.R. (Ed.). *Cephalopod Life Cycles. Vol. I, Species Accounts.* Academic Press. London. 475 pp.

Nigmatullin, C.M, Nesis, K.N. y Arkhipkin, A.I. (2001). A review of the biology of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Fisheries Research* 54:9-19.

Nursten Harry (2005). *The Maillard Reaction Chemistry, Biochemistry and Implications.* The Royal Society of Chemistry. The University of Reading, Reading, UK. ISBN: ISBN 0-85404-964-9.

Mondaca-Navarro Blanca A.; Ávila-Villa Luz A.; González-Córdova Aaron F.; López-Cervantes Jaime; Sánchez-Machado Dalia I.; Campas-Baypolia Olga C.; Rodríguez-Ramírez Roberto (2017). Antioxidant and chelating capacity of Maillard reaction products in amino acidsugar model systems: applications for food processing.

Murray, B.A., & FitzGerald, R. J. (2007). Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: Biochemistry, bioactivity and production. *Current Pharmaceutical Design*, 13, 773–791.

Murrieta-Martínez C.L.; Ocaño-Higuera V.M.; Suárez-Jiménez G.M.; Márquez-Ríos E. (2016) Squid Protein Characteristics and Their Potential Industrial Applications. *Interciencia*, vol. 41, núm. 8, pp. 520-525 Asociación Interciencia Caracas, Venezuela.

Nacka, F., Chobert, J. M., Burova, T., Léonil, J., y Haertlé, T. (1998). Induction of new physicochemical and functional properties by the glycosylation of whey proteins. *Journal of Protein Chemistry*, 17, 495–503.

Oliver, C. M., Melton, L. D., y Stanley, R.A (2006). Creating proteins with novel functionality via the Maillard reaction: a review. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 337-350.

Osuna-Amarillas P.S.; Márquez-Ríos E.; Rouzaud-Sandez O.; Suárez-Jiménez G.M.; Cota-Arriola C.; Ocaño-Higuera V.M.; Arvízu-Flores A.A. & Torres-Arreola W. (2015). Physicochemical Changes of Connective Tissue Proteins in Jumbo (*Dosidicus gigas*) Muscle During Ice Storage. *Journal of Food Processing and Preservation* ISSN 1745-4549.

Paniagua Ricardo (2007). *Citología e histología vegetal y animal*, 4ta edición, Mc GrawHill, pp 589 – 598.

Pérez-Chabela M. de L.; Soriano-Santos J.; Ponce-Alquicira E.y Díaz-Tenorio L.M. (2015). Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS como herramienta en el estudio de las proteínas miofibrilares. Una revisión. *NACAMEH* Vol. 9, No. 2, pp. 77-96.

Raia J.J. Jr., Barone J.A., Byerly W.G. and Lacy C.R. (1990). Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors: A Comparative Review. *DICP, The Annals of Pharmacotherapy* • Volume 24.

Ramírez-Guerra H.E., Mazorra-Manzano M.A., Ezquerro-Brauer J.M., Carvajal-Millán E., Pacheco-Aguilar R., Lugo-Sánchez M.E. and Ramírez-Suárez J.C. (2015). Hydroxylysyl-pyridinoline occurrence and chemical characteristics of collagen present in jumbo squid (*Dosidicus gigas*) tissues. *Journal of Food Composition and Analysis* 44,10–17.

Ray P., Sullenger B. A. and White R. R. (2013). Further Characterization of the Target of a Potential Aptamer Biomarker for Pancreatic Cancer: Cyclophilin B and Its Posttranslational Modifications. *NUCLEIC ACID THERAPEUTICS* Volume 23, Number 6, Mary Ann Liebert, Inc.

Rocha F., Guerra A. y González A.F. (2001). A review of reproductive strategies in cephalopods. *Biol. Rev.* 76:291-304

Ryu, S. Y., Roh, H. J., Noh, B. S., Kim, S. Y., Oh, D. K., Lee, W. R., y Kim, S. S. (2003). Effects of temperature and pH on the non-enzymatic browning reaction of tagatose-glycine model system. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 12 (6), 675-679.

SAGARPA (2014). Acuerdo por el que se da a conocer el plan de manejo pesquero de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

Saiga A., Iwai K., Hayakawa T., Takahata Y., Kitamura S., Nishimura T and Morimatsu F. (2008). Angiotensin I-Converting Enzyme-Inhibitory Peptides Obtained from Chicken Collagen Hydrolysate. *J. Agric. Food Chem*, 56, 9586–9591.

Salinas, Z.; Sánchez, H.; Aragón, N.; Sánchez, V.; Soria, M.;Escoto, G.; Moctezuma, C.; Camarillo, C.; Mejía, R.;Bazzino, F. (2005). Programa Maestro de la pesquería de Calamar gigante. Comité Sistema Producto de la pesquería de calamar gigante en el Estado de Sonora.

Schetinnikov A. S. (1989). Food spectrum of the squid *Dosidicus gigas* (Oegopsida) in the ontogenesis. *Zool. Zh.* 68: 28–39

Scow, T.D., Smith, G.E., & Shaughnessy, F.A. (2003). Combination of therapy with ACE inhibitors and angiotensin-receptor blockers in heart failure. *Clinical Pharmacology*, 68, 1795–1798.

Shahidi, F. (2006). Maximising the value of marine by-products, pp 532. En Woodhead Publishing, Cambridge, UK.

Shuping Wu, Jiao Hu, Liuting Wei, Yumin Du, Xiaowen Shi, Lina Zhang (2013). Antioxidant and antimicrobial activity of Maillard reaction products from xylan with chitosan/chitooligomer/glucosamine hydrochloride/taurine model systems. *Food Chemistry* 148,196–203.

Sun, Y., Hayakawa, S., Chuamanochan, M., Fujimoto, M., Innun, A., e Izumori, K. (2006). Antioxidant effects of Maillard reaction products obtained from ovalbumin and different Daldohexoses. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 70 (3), 598-605.

Tolano-Villaverde I.J., Ezquerra-Brauer J.M., Ocaño-Higuera V.M., Torres-Arreola W., Ramirez-Wong B., Herrera-Urbina R. & Marquez-Rios E. (2016). Effect of pH and chitosan concentration on gelation of protein concentrate from giant squid mantle (*Dosidicus gigas*). 1360 International Journal of Food Science and Technology, 51, 1360–1368

Toldrá F. y Sentandreu M. A. (2006). A fluorescence-based protocol for quantifying angiotensin-converting enzyme activity.

Torres-Arreola, W., R. Pacheco-Aguilar, R. R. Sotelo-Mundo, O. Rouzaud-Sandez, and J. M. Ezquerra-Brauer (2008). CARACTERIZACIÓN PARCIAL DEL COLÁGENO EXTRAÍDO A PARTIR DEL MANTO, ALETA Y TENTÁCULOS DE CALAMAR GIGANTE (*Dosidicus gigas*): Ciencia Y Tecnología Alimentaria, v. 6, p. 101-108.

Tressl, R., Wondrak, G. T., Garbe, L. A., Kruger, R. P., y Rewicki, D. (1998) Pentoses and hexoses as sources of new melanoidin-like Maillard polymers. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46 (5), 1765-1776.

Ultra alto vacío en español (UHV) (2015). Espectrometría infrarroja. Disponible en: http://www.uhv.es/sites/pecas/doc/poster_infrarojo.pdf

Uriarte-Montoya M.H., Santacruz-Ortega H., Cinco-Moroyoqui F.J., Rouzaud-Sández O., Plascencia-Jatomea M. and Ezquerra-Brauer J.M. (2011). Giant squid skin gelatin: Chemical composition and biophysical characterization. Food Research International 44, 3243–3249.

Van Nguyen, C. (2006). Toxicity of the AGEs generated from the Maillard reaction: on the relationship of food-AGEs and biological-AGEs. Molecular Nutrition and Food Research, 50 (12), 1140-1149.

Vermeirssen, V., Camp, J. V., & Verstraete, W. (2004). Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. British Journal of Nutrition.

Wade L.G. Jr. (2012). Química orgánica, Volumen 1, séptima edición, pearson, pp 516-517.

Weber, K., Osborn M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry* 244: 4406-4412.

Weisser K, Schloos J. (1991). The role of enzyme and substrate concentration in the evaluation of serum angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition by enalaprilat *in vitro*. *Biochem Pharmacol*; 42:1729–37.

Wyvrat M.J. and Patchett A.A. (1985). Recent Developments in the Design of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors. *Medicinal Research Reviews*, Vol. 5, No. 4, 483-531.

Xiaoyun P., Minfang M., Bin H., Ping Y. and Ming J. (2005). Micellization of Casein-graft- Dextran Copolymer Prepared through Maillard Reaction. *Biopolymers*, Vol. 81, 29-38. Wiley, Periodicals, Inc.sun.

Yeboah, F. K., y Yaylayan, V. A. (2001). Analysis of glycated proteins by mass spectrometric techniques: qualitative and quantitative aspects. *Food/Nahrung*, 45 (3), 164-171.