

# UNIVERSIDAD DE SONORA

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

Efecto del almacenamiento en hielo de aletas, manto y tentáculos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) sobre la actividad de lisil oxidasa y su relación con la textura del músculo

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Para obtener el título de:

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

1942

Presenta:

Fimbres Romero Manuel de Jesus

Hermosillo, Sonora

Agosto de 2015

# 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



## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco principalmente a Dios por darme la fuerza y voluntad necesaria para superar todas esas dificultades que se presentaron durante este proyecto y sobre todo durante toda mi vida.

Agradezco también a mis padres por su apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida, a mi madre que siempre con su ejemplo me demostró día con día a no rendirme ante nada ni nadie y siempre a perseverar para ser una mejor persona.

Agradezco a mi asesor de tesis Dr. Wilfrido Torres Arreola por la oportunidad brindada al realizar este proyecto y por su valiosa guía y asesoramiento en el mismo.

A mis amigos, compañeros y maestros también doy sinceras gracias por ayudarme en mayor o menor medida a haber logrado este logro tan importante en mi vida.

## **DEDICATORIAS**

Principalmente a mi familia que me ha acompañado durante todo mi trayecto estudiantil y de vida y han sabido guiarme por un buen camino. A mi madre por ser el pilar más importante y por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional. A mi hermano no solo por estar siempre presente aportando tanto cosas buenas como malas que me han ayudado a salir adelante, sino también por todos esos buenos momentos que hemos pasado y seguiremos pasando. A mis amigos por todo ese gran apoyo moral y psicológico que me han brindado en el transcurso de mi vida.

# ÍNDICE

## Contenido

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	3
<b>DEDICATORIAS</b> .....	4
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	6
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	7
<b>RESUMEN</b> .....	8
<b>OBJETIVOS</b> .....	13
2.1 General .....	13
2.2 Objetivos Específicos .....	13
<b>ANTECEDENTES</b> .....	14
3.1 Generalidades de Calamar Gigante .....	14
3.2 Distribución y Pesca de Calamar Gigante .....	23
3.4 Generalidades del Colágeno .....	33
3.5 Generalidades de Lisil Oxidasa.....	38
3.7 Entrecruzamiento de Colágeno por Lisil Oxidasa .....	40
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	43
4.1 Materia Prima.....	43
4.2 Extracción Enzimática .....	43
4.3 Ensayos de Actividad .....	43
4.4 Electroforesis en Gel de SDS-Poliacrilamida .....	44
4.5 Cuantificación de Piridinolina .....	44
4.6 Determinación del Perfil de textura .....	45
4.7 Análisis Estadístico .....	46
<b>RESULTADOS</b> .....	47
5.1 Obtención de Tejido Conectivo .....	47
5.2 Actividad de Lisil Oxidasa .....	48
5.3 Perfil Electroforético .....	51
5.4 Concentración de Piridinolina.....	53
5.5 Perfil de Textura.....	54
<b>CONCLUSIONES</b> .....	56
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	58
<b>REFERENCIAS</b> .....	599

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Tejido conectivo extraído a partir 100 gramos de músculo fresco de calamar gigante.....	47
<b>Tabla 2.</b> Actividad de lisil oxidasa durante el almacenamiento en hielo del músculo de calamar gigante ( <i>Dosidicus gigas</i> ). .....	49
<b>Tabla 3.</b> Cuantificación de piridinolina durante el almacenamiento en hielo del músculo de calamar gigante ( <i>Dosidicus gigas</i> ). .....	54

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Morfología externa de <i>Dosidicus gigas</i> . .....	17
<b>Figura 2.</b> Anatomía Interna de <i>Dosidicus gigas</i> . .....	18
<b>Figura 3.</b> Ubicación geográfica de la distribución de <i>Dosidicus gigas</i> en América, el color azul denota la concentración de esta especie. ....	24
<b>Figura 4.</b> Zona de mayor concentración de <i>Dosidicus gigas</i> en el Golfo de California representado en color azul. ....	25
<b>Figura 5.</b> Migración de <i>Dosidicus gigas</i> del Océano Pacífico hacia el Golfo de California en las estaciones invierno-primavera. ....	26
<b>Figura 6.</b> Migración de <i>Dosidicus gigas</i> del Golfo de California hacia el Océano Pacífico en las estaciones verano-otoño. ....	27
<b>Figura 7.</b> Biosíntesis de colágeno. ....	37
<b>Figura 8.</b> Electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida del extracto crudo de LOX obtenido a partir de músculo fresco de aletas (A), manto (M) y tentáculos (T) de calamar gigante. STD: estándar de peso molecular. ....	52
<b>Figura 9.</b> Fuerza de corte requerida en las diferentes regiones anatómicas durante su almacenamiento en hielo. ....	56

## RESUMEN

El calamar gigante (*Dosidicus gigas*) es una especie muy abundante en el océano pacífico mexicano, el cual es explotado como un importante recurso marítimo, principalmente en el Golfo de California. *D. gigas* es exportado en su mayoría al mercado asiático como producto fresco-congelado. Durante su manejo pos captura, las fibras de colágeno juegan un papel muy importante ya que son las responsables de la unión entre varias células. Esto gracias a la acción de una enzima llamada lisil oxidasa (LOX), que se encarga de estabilizar dichas fibras mediante un mecanismo de entrecruzamiento covalente, produciendo una molécula de piridinolina (Pyr). Por lo anterior, en este presente estudio se determinó el efecto del almacenamiento en hielo de aletas, manto y tentáculos de calamar gigante sobre la actividad de LOX y contenido de Pyr, y la relación que tienen éstos con la textura de músculo. Para dichos estudios especímenes de *D. gigas* adulto, fueron capturados en Bahía de Kino Sonora. Una vez eviscerados los organismos, se dividieron en sus tres regiones anatómicas, para después extraer e identificar la presencia de la enzima mediante ensayos de actividad específica y electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, la cual permanece activa en las tres regiones anatómicas durante el almacenamiento en hielo. También se determinó la concentración de Pyr en el tejido conectivo después de 20 días de almacenamiento, siendo mayor para aletas en comparación con tentáculos y manto. (526.6, 351 y 474.2 pmol/100 mg, respectivamente). Finalmente la resistencia al corte de las tres regiones anatómicas mostró un aumento a medida

que aumentó el tiempo de almacenamiento en hielo, alcanzando un pico máximo después de 10 días.

En este estudio se logró identificar la presencia de LOX en músculo de aletas, manto y tentáculos de calamar gigante, la cual permanece activa durante su almacenamiento en hielo. Además, se encontró una relación entre dicha actividad y la presencia de Pyr con la textura de su músculo, el cual tiende a ser más duro después del almacenamiento en hielo.

## INTRODUCCIÓN

El calamar gigante (*Dosidicus gigas*) es un molusco cefalópodo de gran tamaño que se distribuye en el Océano Pacífico Occidental desde las costas de California en Estados Unidos hasta Chile. En México, se captura principalmente en las costas del Mar de Cortés, siendo los mayores productores los estados de Sonora y Baja California Sur, donde representa el 95 % sobre el total de las especies de calamar capturadas (Klett y col., 1996; De la Cruz y col., 2007). Lo que le ha valido para situarse como una de las principales pesquerías artesanales de México, compitiendo en captura con pesquerías industrializadas y de mayor tradición como la sardina y el camarón.

Sin embargo, su consumo a nivel nacional es muy bajo, debido a una falta de costumbre y al desconocimiento de sus características nutricionales y formas de preparación, siendo comercializado principalmente hacia el mercado asiático, a donde se exporta como materia prima con poco valor agregado y a bajo precio.

Actualmente existe potencial en el mercado nacional para fomentar su consumo, el cual se está introduciendo paulatinamente como sustituto de otras especies marinas, entre las que destaca el pulpo y el abulón (Luna-Raya y col., 2006).

Una de las particularidades de este organismo es el comportamiento que presenta su músculo durante su almacenamiento en hielo, ya que tiende a ser relativamente más duro y es menos frágil al compararlo con otros organismos marinos (Ramirez-Olivas y col. 2004). Este comportamiento se ha asumido que se debe a las características estructurales que se presentan en su tejido conectivo. Uno de los principales constituyentes dentro del músculo de calamar, el cual juega un papel muy importante en cualquier tejido animal, ya que es el encargado de la

unión entre varias células, de ahí que exista una estrecha relación entre su comportamiento y la firmeza del músculo (Ando y col., 2001; Torres-Arreola y col., 2008).

Recientemente se han realizado estudios sobre las características del tejido conectivo del manto, aletas y tentáculos, encontrando marcadas diferencias en el arreglo estructural y características fisicoquímicas. Estas diferencias se han relacionado con el contenido de colágeno que está presente en cada región, así como al grado de agregación (Torres-Arreola y col., 2008).

En este sentido, se sabe que la estabilidad del colágeno en las diferentes regiones anatómicas de un organismo o entre diferentes organismos se puede deber a una enzima llamada lisil oxidasa (LOX; EC 1.4.3.13) que en mayor o menor medida le confiere estabilidad, lo anterior por medio de una agregación del tejido conectivo, efecto de un entrecruzamiento en las fibras de colágeno (Kagan y col., 1986).

La enzima LOX básicamente se encarga de catalizar la deaminación oxidativa de lisinas e hidroxilisinas presentes en las moléculas de colágeno activando con esto una serie de reacciones espontáneas para la formación de una molécula llamada piridinolina, capaz de entrecruzar hasta tres moléculas de colágeno por medio de enlaces covalentes (Kagan y col., 1986; Smith-Mungo & Kagan., 1998). La mayoría de los estudios realizados acerca de la relación entre actividad de LOX y el comportamiento de las fibras de colágeno se han realizado en tejido conectivo de organismos terrestres, siendo escasa la información generada a partir de animales de origen marino (Consuegra & Johnston, 2006). Recientemente se purificó y se caracterizó parcialmente la enzima LOX del

músculo de tentáculos de calamar gigante (Torres-Arreola y col., 2011 y 2012), la cual está estrechamente relacionada con las características estructurales de las fibras de colágeno. Sin embargo, aún no se ha establecido la relación existente entre la actividad de la LOX y la presencia de Pyr con la textura del músculo en cada región anatómica del calamar gigante durante su manejo en frío.

Por lo antes expuesto, en este estudio, se propone evaluar la relación entre actividad de la LOX, la presencia de Pyr y los cambios en la textura del músculo de aletas, manto y tentáculos de calamar gigante durante su almacenamiento en hielo. Esto permitirá entender mejor la función que desempeña el tejido conectivo y la LOX durante el manejo en frío de la especie.

## **OBJETIVOS**

### **2.1 General**

Evaluar el efecto del almacenamiento en hielo de aletas, manto y tentáculos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) sobre la actividad de lisil oxidasa y relacionarla con la textura del músculo

### **2.2 Objetivos Específicos**

Extraer e identificar la LOX a partir de aleta, manto y tentáculos de calamar gigante (*D. gigas*) almacenado 20 días en hielo.

Cuantificar el contenido de piridinolina en aletas, manto y tentáculos de calamar gigante (*D. gigas*) durante su almacenamiento en hielo.

Monitorear la resistencia al corte como índice de textura en aletas, manto y tentáculos de calamar gigante (*D. gigas*) almacenado en hielo.

## ANTECEDENTES

### 3.1 Generalidades de Calamar Gigante

El término molusco, derivado del latín “mollus”, significa suave debido a lo blando del cuerpo del animal, el cual está protegido solamente por una hoja de tejido llamado manto. Dentro de los moluscos se incluyen los gasterópodos, los bivalvos y los cefalópodos, siendo estos últimos la clase más organizada que agrupa organismo tales como el pulpo y el calamar, denominándose de esa manera debido que tienen unidos los pies a la cabeza (“cephale” que significa cabeza y “podos” que significa pies).

El calamar es considerado como el invertebrado más veloz que existe en el océano. En México el calamar más importante en pesquería es el calamar gigante (*Dosidicus gigas*) ya que es el más abundante (Uriarte-Montoya, 2007). Su clasificación taxonómica se muestra a continuación:

*Reino: Animal*

*Suborden: Oegopsina*

*Phylum: Mollusca*

*Familia: Ommastrephidea*

*Clase: Cephalopoda*

*Subfamilia: Ommastrephinae*

*Subclase: Coleoidea*

*Género: Dosidicus*

*Superorden: Decapodiforme*

*Especie: Dosidicus gigas*

*Orden: Teuthida*

El calamar gigante descrito originalmente por D´Orbigny en 1835 también es conocido como el calamar del pacífico, calamar jumbo, calamar de Humboldt, pota y potón. Posee una morfología con cuerpo en forma cilíndrica comúnmente

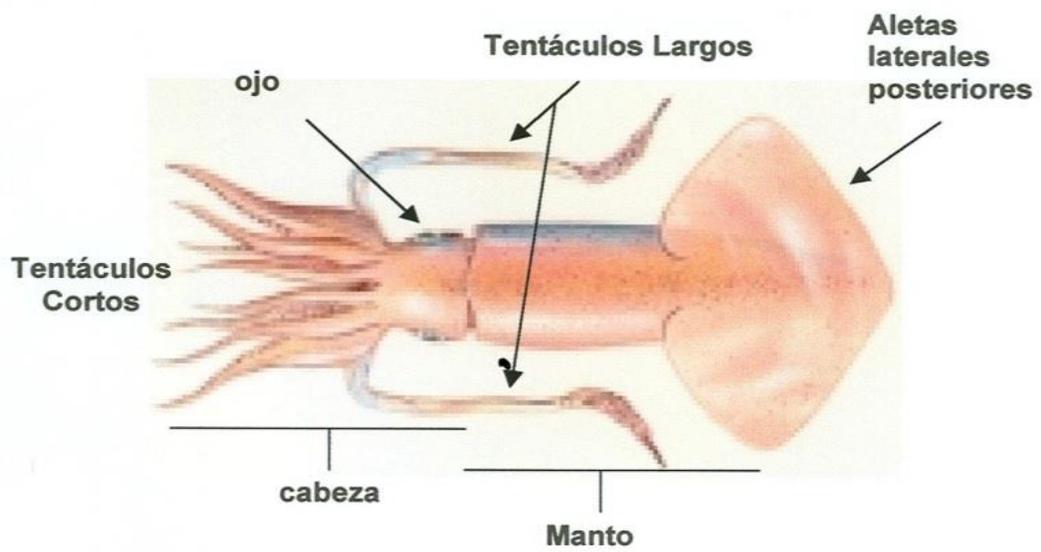
denominado como manto, el cual envuelve sus órganos internos. El manto de los machos es más duro y grueso respecto al de las hembras; sin embargo hay que recalcar que este tipo de dimorfismo es poco aparente (Nesis, 1970). El radio del manto se reduce poco a poco, cada vez más en la región de inserción de las aletas y terminando como punta cónica. El borde de la base del manto en su porción ventral está ligeramente vuelto hacia fuera y hacia arriba, entre los cartílagos de unión de manto con el sifón. Contiene una estructura interna cartilaginosa comúnmente llamada “pluma” la cual da soporte a los músculos del cuerpo del calamar, está compuesta principalmente de quitina y generalmente se extiende de lleno a lo largo del manto (Young, 2009).

Posee además un extremo de dos aletas laterales muy amplias de forma romboidal que utiliza de manera complementaria con el sifón. El sifón es una cavidad ventral que desemboca hacia la parte del lateral en forma de embudo recubierto por el manto, cuando el agua penetra la cavidad y, al ser expulsada a presión mediante este órgano, dota al animal de un sistema de locomoción por propulsión a chorro para desplazarse a gran velocidad. Continuando con la descripción anatómica de calamar en el extremo opuesto se localiza la cabeza, boca, tentáculos y brazos (Ehrhardt y col., 1982). La boca de esta especie presenta un par de dientes que asemeja el pico de un perico y alrededor de ella se encuentran ocho tentáculos con ventosas y dos brazos contráctiles que utiliza para atrapar a sus presas. La característica más notable es tal vez la prolongación de los extremos distales de los brazos en filamentos largos y delgados contiendo entre cien y doscientas pares de ventosas diminutas muy agrupadas (Markaida, 2001).

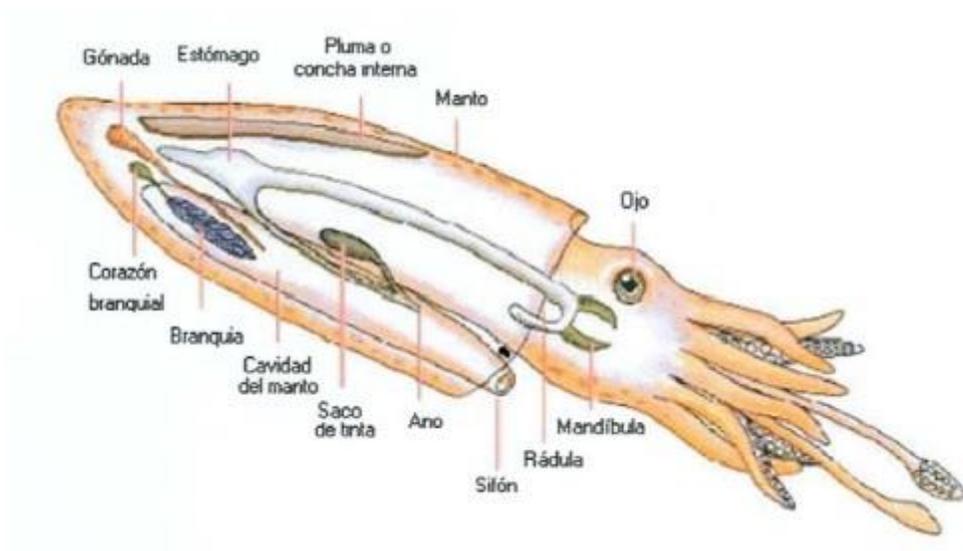
Otra característica distintiva de esta especie es la foveola, que es una hendidura que cede espacio al sifón en la porción posterior de la cabeza; tiene siete surcos longitudinales en promedio, así como cuatro a cinco pliegues secundarios a ambos lados.

El cartílago de unión del manto con la cabeza presenta una bifurcación en forma de "T" invertida característica de la familia *Ommastrephidae* a la cual pertenece este organismo. La cabeza generalmente es más ancha en su porción posterior, en ella sobresalen dos grandes ojos lobulosos muy conspicuos con proyección anterior y párpados laterales (Ehrhardt y col., 1986). La piel del calamar está conformada por cuatro capas, las dos primeras del lado externo contienen entre ellas las células pigmentosas de los cromatóforos, mientras que las capas tres y cuatro están compuestas por tejidos conectivos en forma de filamentos delgados (Maza-Ramírez, 2001). Los calamares se caracterizan por tener ciclos de vida cortos, que pueden oscilar entre seis y nueve meses de edad. Sin embargo, hay reportes que establecen que la mayoría de las especies viven de uno a dos años. Este ciclo de vida dependerá de la temperatura del agua en la que se desarrolle el calamar gigante (Domingues y col., 2002).

En las Figuras 1 y 2 se puede apreciar gráficamente la morfología interna y externa del calamar gigante (*D. gigas*)



**Figura 1.** Morfología externa de *Dosidicus gigas*.  
Fuente: FAO, 2003



**Figura 2.** Anatomía Interna de *Dosidicus gigas*.  
Fuente: Encarta® (1998).

Los calamares son organismo depredadores activos, poseen un papel determinante en las estructuras tróficas en los océanos, y son también un importante recurso pesquero. Todos los cefalópodos son carnívoros desde las primeras fases de vida hasta el final de su ciclo de vida (Villanueva y col., 2003).

Aunado a sus ciclos cortos de vida se tiene que la tasa de mortalidad es alta. Lo anterior pudiera ser explicado por el hecho de que es una especie que, como la mayoría de los cefalópodos, se encuentra a niveles tróficos intermedios sufriendo por lo tanto altas tasas de depredación, especialmente durante los estadios de vida juvenil existiendo incluso un pronunciado canibalismo en estos organismos (Ehrhardt y col., 1983). En trabajos llevados a cabo en el golfo de california se ha observado que el canibalismo es más frecuente en calamares de gran tamaño, principalmente hembras.

En el Golfo de California se han reportado niveles altos de canibalismo de la especie *Dosidicus gigas*, hasta un 30% de su dieta, y se han atribuido a la escasez de presas (Ehrhardt, 1991). Sin embargo esta conclusión se ha obtenido a partir de muestras tomadas de los barcos pesqueros, y esto significa que la pesca podría estar influyendo en el comportamiento de alimentación de los animales. Lo mismo ocurre en otras áreas, tales como Chile, donde el canibalismo presenta valores de 96 a 99% (Cubillos y col, 2004; Ulloa y col, 2006), En ambos estudios, se tomaron muestras durante la pesca de calamar, sin embargo, no consideran que el estrés causado por esta actividad, lo que podría ser la razón de sus altos valores de canibalismo. Por otro lado Rosas-Luis en 2007 informaron que el canibalismo no es una parte importante del espectro trófico en muestras tomadas de dos cruceros de investigación en las áreas que no son zonas

pesqueras de la costa oeste de la península de Baja California. Las diferencias obtenidas entre los dos tipos de áreas señalan que el canibalismo se ha sobreestimado como un comportamiento natural en esta especie y también indican que las actividades de pesca están influyendo en los resultados.

El calamar gigante presenta dimorfismo sexual; las hembras son más grandes que los machos, sin embargo en comparación con otras especies de gran tamaño de la misma familia, esta diferencia es insignificante (Nigmatullin y col., 1991). Como el canibalismo es el resultado del dominio presentado por especímenes de gran tamaño sobre otros más pequeños, se esperaría que las hembras presentarían este comportamiento con más frecuencia que los machos. Los resultados obtenidos por Ibarra-García y colaboradores mostraron que las hembras tenían un mayor porcentaje de canibalismo en el estómago, a pesar de que el tamaño era igual para hembras y machos, esto posiblemente a que las hembras eran más voraz en el momento de la captura.

## **Reproducción**

Los calamares gigantes son organismos dioicos o, sea de sexo separado. Los órganos reproductores de los calamares se encuentran en la cavidad de manto o sábana (Markaida & Sosa-Nishizaki, 2003). También se sabe que el calamar gigante es una especie con reproducción monocíclica, cada individuo o espécimen solo tendrá una estación reproductiva durante su vida.

En el hemisferio sur, la reproducción ocurre durante todo el año con máximos durante primavera y verano teniendo lugar el desove tanto en la

pendiente continental como en áreas oceánicas adyacentes. Las determinaciones sobre las estaciones de desove en esta especie han sido difíciles de definir, debido principalmente a diferencias en las metodologías aplicadas así como a la talla de los ejemplares utilizados (Markaida y col., 2004).

En el golfo de California se han determinado grupos modelos en los cuales los porcentajes de hembras maduras varían considerablemente alcanzado las hembras la primera madurez sexual entre los 34 y 40 cm de longitud del manto además que es frecuente encontrar más hembras que machos. Se ha señalado que para las aguas de las regiones costeras de Perú y Chile existe un grupo modal de individuos grandes los cuales madurarían tardíamente en relación a las poblaciones que habitan la corriente de California y la corriente de Perú alcanzando las hembras su primera madurez sexual alrededor de los 36 y 37 cm de longitud del manto.

## **Comportamiento**

El calamar gigante es un típico organismo nectónico formado de cardúmenes los cuales están constituidos por docenas de individuos de tamaño uniforme, esparcidos ampliamente (Nesis, 1970). Entre octubre y diciembre en la corriente de Perú se han observado incluso de día, grandes cardúmenes compactos de cientos o miles de individuos que no se detienen a alimentarse y que probablemente estén migrado. Los juveniles son los miembros más activos formando cardúmenes de 20-40 animales entre la superficie e isoterma superior. Los sub-adultos son menos activos se agregan en grupos cazadores de 200-1200

individuos moviéndose a velocidades de 10-25 kilómetros. Pese a la posible competición por alimento el calamar *dosidicus gigas* y el calamar *Sthenoteuthis oulaniensis* forman a veces cardúmenes mixtos (Nigmatullin y col., 2009).

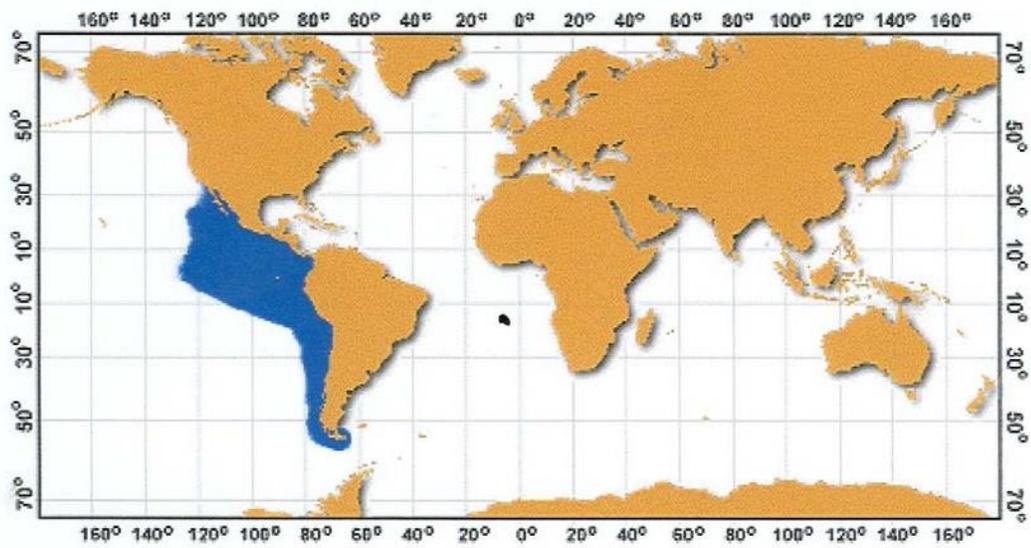
No ha sido posible mantener al calamar gigante en cautiverio, el tiempo máximo en que se mantuvo un ejemplar en cautiverio fue de tan solo tres días y se reportó que solo logran sobrevivir los ejemplares estudiados en condiciones de cautiverio por 16 horas aproximadamente. Mientras que en un estudio posterior se reportó que la muerte de los organismos se presentó tras 20 horas de cautiverio además de observar canibalismo en los tanques. Estos estudios dieron por concluido que los calamares gigantes no duran en cautiverio más de 24 horas.

El calamar gigante es potencialmente peligroso, mordiendo a los pescadores que lo manipulan a bordo. Los buceadores que han tratado de observar al calamar gigante en el golfo de california han sido atacados por lo que se requiere de la protección de las mismas jaulas para la observación subacuática de los tiburones. Este peligro está siempre ligado a la pesca de este espécimen. Ya que cuando se está pescando esta especie, hay un estrés que provoca un gran canibalismo y agresividad.

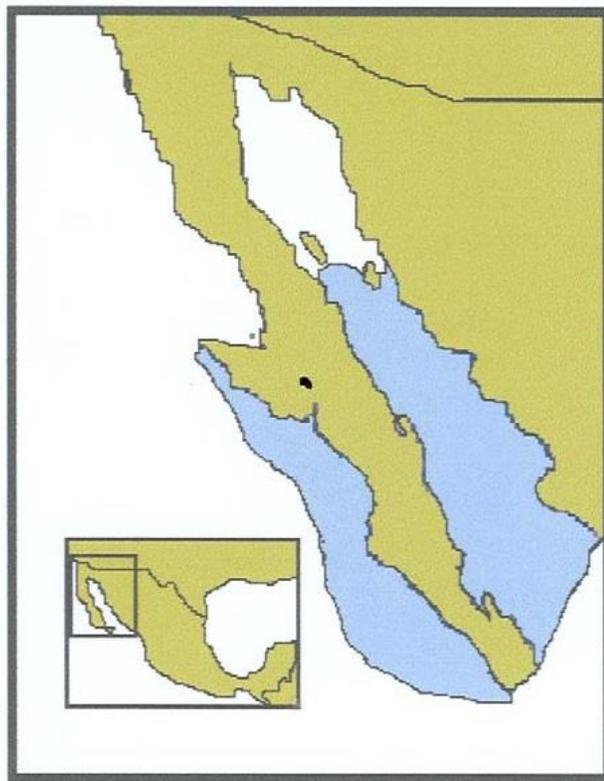
### **3.2 Distribución y Pesca de Calamar Gigante**

El calamar gigante se distribuye desde California (USA) hasta Chile en Sudamérica cubriendo todo el pacífico mexicano y una gran parte del continente americano como se muestra en la Figura tres. En México específicamente, las zonas donde se realiza la mayor explotación de calamar gigante se encuentran en el Golfo de California también llamado mar de Cortés como se muestra en la Figura 4. En ciudades como Guaymas, Sonora y Santa Rosalía, Baja California Sur (Uriarte, M. 2007).

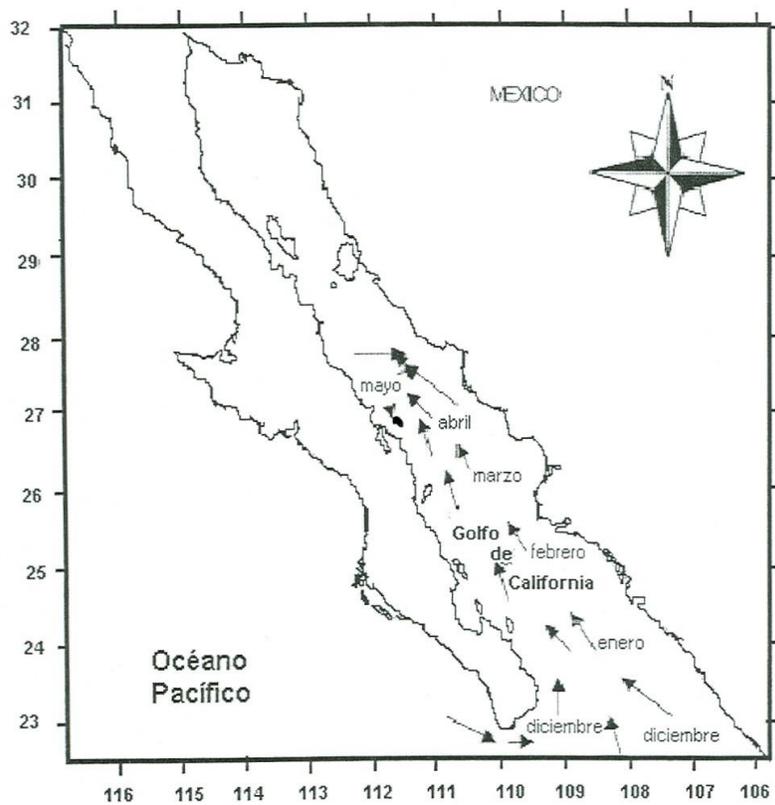
El calamar gigante es una especie migratoria ya que dependiendo de la disponibilidad de alimento y/o cambios de temperatura puede migrar desde el océano Pacífico al Golfo de California. Esta especie migra desde el océano Pacífico hacia aguas territoriales dentro y fuera del Golfo de California dependiendo de sus necesidades de alimentación. La migración hacia dentro del Golfo de California inicia en el mes de enero y el calamar se mueve hacia el norte en el mes de abril como se puede apreciar en la Figura 5. De mayo a agosto se sitúa en la parte media del Golfo. Durante el mes de julio algunos calamares se dispersan hacia el lado este y la mayoría ocupan la parte central, lo que provoca una mezcla de organismos una gran variedad de talla y peso. Iniciando el mes de agosto empieza la migración hacia el sur del Golfo de California para posteriormente salir al Océano Pacífico como se muestra en la Figura 6. Todo el patrón antes mencionado puede verse alterado por los cambios de temperatura (Ehrhardt, 1991).



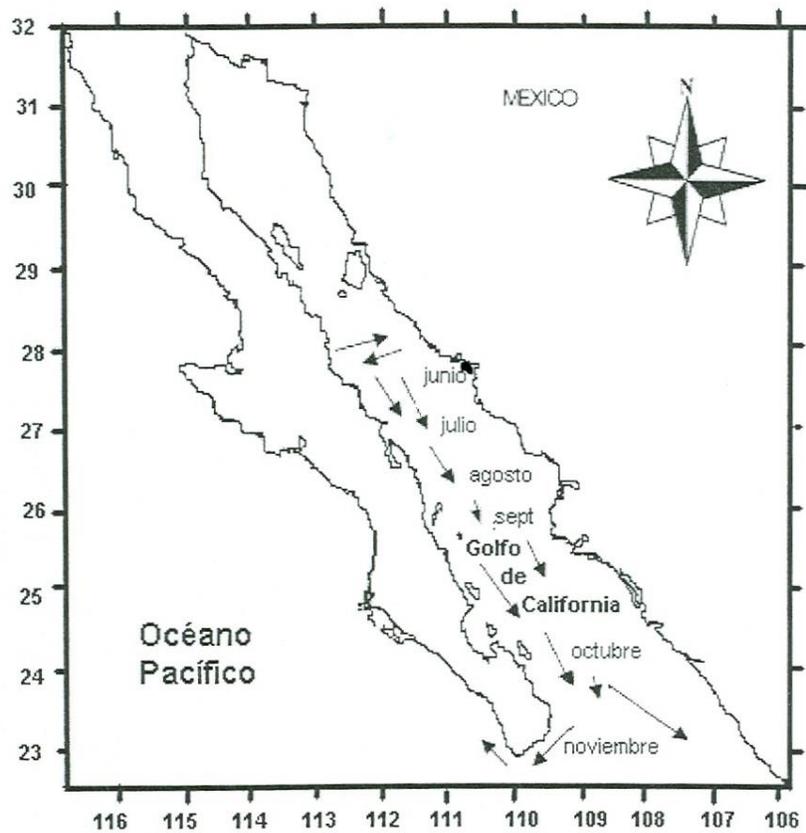
**Figura 3.** Ubicación geográfica de la distribución de *Dosidicus gigas* en América, el color azul denota la concentración de esta especie.  
Fuente: FAO, (2003).



**Figura 4.** Zona de mayor concentración de *Dosidicus gigas* en el Golfo de California representado en color azul.  
Fuente: FAO, (2003).



**Figura 5.** Migración de *Dosidicus gigas* del Océano Pacífico hacia el Golfo de California en las estaciones invierno-primavera.  
 Fuente: Ehrhardt y colaboradores (1983).



**Figura 6.** Migración de *Dosidicus gigas* del Golfo de California hacia el Océano Pacífico en las estaciones verano-otoño.  
 Fuente: Ehrhardt y colaboradores (1983)

En el Golfo de California, la pesca de calamar inicia en marzo hasta finales del verano en septiembre. Se realiza en período de penumbra y oscuridad, a embarcación parada, esto debido al fototropismo positivo característico de esta especie. El calamar gigante es una especie marina que ha sido subutilizada en el mercado nacional ya que el 89% de la pesca total se destina a exportación mayormente al mercado asiático, quedando solo el 11% para consumo nacional en donde se comercializa principalmente fresco, congelado y precocido (De la Cruz y col., 2007).

La pesquería de calamar gigante en el Golfo de California inició en 1974 con la operación de una reducida flota artesanal, explotándose comercialmente a partir de finales de la década de los 80s. No fue sino hasta la caída de precio del camarón y su periodo de veda correspondiente (1978) cuando se consideró al calamar como recurso pesquero viable según el Instituto Nacional de la Pesca.

Es en la región Noroeste del país donde se pesca la mayor parte de todo el calamar gigante, siendo Baja California Sur, Sonora y Sinaloa los estados de mayor aportación pesquera (Salinas y col., 2005). Es importante señalar que la naturaleza migratoria de esta especie hace que sea extremadamente difícil tener un cuadro delimitado de su distribución espacial y temporal en forma simultánea para el total de sus áreas de ocurrencia, además la variación de los parámetros ambientales afecta en gran medida la aparición de los organismos en diversas áreas de distribución (Markaida, 2001).

La mayor parte de las exportaciones corresponde a producto congelado con el 91% seguido del producto fresco con el 4% y del procesado y enlatado con el

4%. La presentación congelada obedece principalmente a que la mayoría de las capturas se congela y se semiprocesa en los barcos por razones de calidad (Salinas y col., 2005).

Los desechos de la industria procesadora de pescados y mariscos, después del fileteado, pueden representar hasta un 75 % del peso de la captura total en forma de huesos, aletas, cabezas, vísceras y escamas (Shahidi, 2006). En la pesquería del calamar sólo se aprovecha la parte comestible (42 %) y el resto es desechado. Tales desechos pueden ser utilizados para obtener enzimas y otros subproductos de alto valor nutricional y comercial, como es el colágeno. Cerca del 30 % de los desechos contienen alto contenido del mismo, que pueden ser empleados para la producción industrial de colágeno y gelatina, con fines cosméticos o de alimentos balanceados para animales, dándole así un valor agregado a la pesquería de este organismo e impulsando un desarrollo sustentable y redituable.

### **3.3 Composición Química Muscular y Proteica**

El músculo de calamar se caracteriza principalmente por ser blanco y magro. El calamar fresco tiene una consistencia pegajosa, y no es fácil de masticar. El manto al ser cocinado se contrae y asume una forma redonda, debido especialmente a la contracción de la piel. Por el contrario, la carne de calamar gigante seca tiene una consistencia dura que puede ser rasgada transversalmente, pero no en sentido longitudinal.

El manto está compuesto de cinco diferentes capas de tejido. La capa dominante está formada por bandas ortogonales de fibras musculares, intercaladas entre dos túnicas de tejido conectivo. Las túnicas interna y externa están cubiertas por un revestimiento visceral y uno exterior, respectivamente. Cada fibra contiene en sus periferias una determinada cantidad de miofibrillas.

La composición química del manto y tentáculos es muy parecida a otros organismos marinos magros. La carne contiene 75-84% agua, 13-22% proteína cruda, 0.1-2.7% lípidos y 0.9-1.9% minerales, también existen muchos compuestos nitrogenados lo que probablemente le atribuya el sabor ácido-amargo característico del calamar (Luna-Raya y col., 2006). El manto de calamar gigante contiene aproximadamente un 20% de proteína total, la cual puede ser clasificada basándose en sus características de solubilidad las: miofibrilares (solubles en soluciones salina,  $I=0.5$ ), sarcoplásmicas (solubles en agua) y estromales (insolubles en soluciones salina,  $I=0.5$ ). Las miofibrilares son las más abundantes, ya que constituyen el 55-60% del total de proteínas del músculo y forman su estructura fibrosa (Kijowski, 2001).

Las proteínas miofibrilares del calamar difieren de las proteínas del pescado y mamíferos al ser más solubles en agua, menos susceptibles a la congelación y más propensas a la desnaturalización térmica (Ramírez-Olivas y col., 2004). Tienen características térmicas diferentes, debido a la presencia de la paramiosina. Se ha reportado que ésta altera considerablemente las características de textura en los productos gelificados a partir de proteína muscular de especies marinas. Por lo que, tanto el contenido de paramiosina como las diferentes interacciones miosina-paramiosina podrían relacionarse, al

menos parcialmente con el comportamiento térmico observado en las proteínas miofibrilares de invertebrados marinos, debido a los cambios en el medio ambiente químico (Paredi y col., 2002).

Las proteínas sarcoplásmicas se localizan dentro del sarcolema, son solubles en agua o en soluciones salinas de baja molaridad (<50 mM) y comprenden cerca del 30 a 35% de las proteínas totales del músculo (Xiong, 1997). La mioglobina es presuntamente la más importante, debido a que es la responsable del color de la carne, que es relacionado con la calidad del producto (Kijowski, 2001). Sin embargo, en cefalópodos como el calamar, la hemocianina es la proteína que realiza la función que la mioglobina hace en organismos vertebrados, es decir, transporta el oxígeno a través del cuerpo. A diferencia de la mioglobina, la hemocianina presenta un color azul cuando se encuentra oxigenada mientras que cuando esta desoxigenada es incolora.

El tejido conectivo se encuentra en el espacio extracelular y su función es la de mantener y soportar al músculo mediante sus componentes: tendones, epimisio, perimisio y endomisio. El tejido conectivo está formado por diversas fibras que se encuentran en una sustancia amorfa, gelatinosa y altamente hidratada, rica en proteoglicanos y glucoproteínas. En esta sustancia están los fibroblastos que sintetizan las proteínas fibrosas de colágeno y elastina. La estabilidad estructural del tejido conectivo es determinada en gran medida por el colágeno puesto que es el que da firmeza y mantiene unidas a las células, la elastina también ayuda pero en menor grado proporcionando elasticidad requerida para el movimiento. Tomando en cuenta lo anterior se sabe que el colágeno es uno de los principales determinantes de la textura de carnes y productos marinos,

además en estos últimos años su concentración está relacionada con la capacidad natatoria de los pescados.

El músculo de calamar gigante se suaviza después de su cocción (Otwell y Hamann, 1979; Ando y col., 2001), En el músculo de animales marinos, la firmeza tiene una estrecha relación con el colágeno, el principal constituyente del tejido conectivo (Ochiai y col., 1985). En el músculo cocido, el calor descompone el colágeno a gelatina lo cual disminuye la integridad entre las células musculares, lo que lleva a un reblandecimiento muscular. En el músculo de calamar, sin embargo, el espacio intercelular es tan estrecho que las fibrillas de colágeno no pueden ser claramente observadas bajo un microscopio electrónico de transmisión. Por lo tanto, el colágeno parecía tener poca influencia sobre el ablandamiento del músculo de calamar después de la cocción. La principal causa del ablandamiento se informó que era debido probablemente a la destrucción de células musculares durante la cocción (Kugino y Kugino, 1994). Sin embargo, Ando y colaboradores informaron que había una considerable cantidad de colágeno en cinco especies de calamar y que los músculos del manto se habían ablandado después de la gelatinización de 30% del total de colágeno en la cocción. Por lo anteriormente dicho tanto el colágeno y las células musculares podrían ser la causa por la cual el músculo de calamar gigante se ablanda después de su cocción. También es importante saber que el calamar no solo es consumido cocinado, ya que en Japón es consumido crudo (*Sashimi*) y la textura del músculo es muy importante para la calidad del platillo. El músculo de calamar gigante se ablanda rápidamente durante su almacenamiento que conduce a un deterioro de la calidad. Por lo tanto, la resolución del mecanismo de

ablandamiento es muy importante para la industria pesquera. En una investigación por parte de Ando y colaboradores en 2001, se comparó la resistencia al corte del músculo de calamar crudo y músculo cocido. En este estudio se observó que la fuerza de corte en el músculo crudo disminuyó considerablemente entre las tres y nueve horas, en contraste la fuerza de corte para el músculo cocido se mantuvo casi constante aunque por debajo de la fuerza de corte del músculo crudo.

### **3.4 Generalidades del Colágeno**

El colágeno es el principal elemento fibroso de tejido conectivo y la proteína individual más abundante del organismo. El colágeno contribuye de manera significativa a la dureza del músculo del animal, de ahí que el término colágeno derive de un vocablo griego “kolla” que significa pegamento. Además la gelatina producto de la desnaturalización del colágeno es usada en muchos productos alimenticios (Purslow, 2002).

Las principales fuentes de colágeno industrial están limitadas a piel y huesos de cerdos y bovinos, con posibilidad de transmitir enfermedades a los humanos. Por tal razón, la obtención de colágeno a partir de organismos acuáticos se ha incrementado en las últimas décadas, por su alta disponibilidad, bajo costo y ausencia de riesgo de transmisión de enfermedades. El uso de colágeno a partir de organismos marinos en la industria de alimentos, cosméticos y productos biomédicos como biomaterial se ha expandido considerablemente (Johnston y col., 2005).

El colágeno no es una molécula homogénea, sino que es una familia de moléculas que tienen una configuración común única de triple hélice. Hasta el momento se han aislado 19 tipos distintos de colágeno, codificado por 40 genes, estos colágenos varían en su ensamblado, longitud de hélice, naturaleza y tamaño de porciones no helicoidales. Los tipos de colágeno de mayor importancia en el músculo de productos marinos son el tipo I, III y V, estos están caracterizados por formar fibras (Exposito y col., 2002). Y su estructura básica está constituida por tres cadenas proteicas helicoidales unidas para formar los llamados tropocolágenos la cual tiene una longitud de 280 nm y diámetro de 1.5 nm, cada cadena alfa contiene alrededor de 1000 aminoácidos y pesa 100 kDa. Las tres cadenas están perfectamente entrelazadas a lo largo de la molécula de tropocolágeno con excepción de los extremos donde se encuentran proteínas globulares que intervienen en la unión química con otra molécula de tropocolágeno adyacente, esta zona fina se le conoce como telopéptidos (Engel & Bachinger, 2005).

Entre los aminoácidos del colágeno, la glicina es el más abundante puesto que representa 35% del total de aminoácidos. La glicina no contiene cadena R o cadena lateral por lo que permite colocarse empacada y estable sin problemas estéricos. El colágeno en si es pobre en aminoácidos esenciales, por lo que se le tiene en una clasificación muy baja y que añade poco valor nutritivo, pero como se revisó anteriormente afecta significativamente la fuerza tensil y la integridad muscular y propiedades reológicas del músculo (Alberts y col., 1990).

El colágeno es la única proteína rica en hidroxiprolina, siendo mayor su concentración en el colágeno de mamíferos con respecto a los colágenos de

pescado. El contenido de hidroxiprolina es relativamente constante y debido a que no se encuentra en cantidades significativas en otras proteínas animales, los métodos químicos para la detección de colágeno están basados principalmente en la determinación de hidroxiprolina en el tejido (Vazquez y col., 2004).

Por otro lado, se sabe que la estabilidad del colágeno en las diferentes regiones anatómicas de un organismo o entre diferentes organismos es debida principalmente a la concentración de prolina e hidroxiprolina, a mayor contenido de estos, la estabilidad de la proteína es mayor. Sin embargo, estos aminoácidos no son los únicos responsables de la estabilidad de las fibras de colágeno, existe una enzima llamada lisil oxidasa que en mayor o menor medida le confiere estabilidad, lo anterior por medio de una agregación del tejido conectivo, efecto de un entrecruzamiento en las fibras de colágeno.

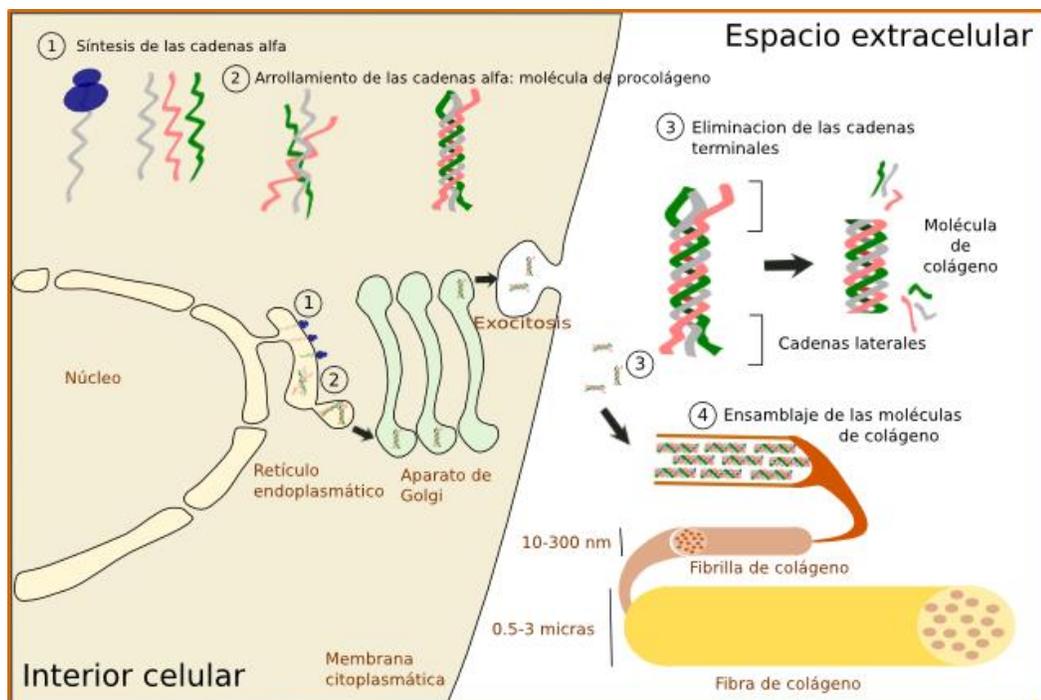
### **Aplicaciones del colágeno**

El colágeno es un material biológico natural muy importante y ha sido extensamente estudiado como polímero para su aplicación en productos manufacturados. Tecnológicamente, el colágeno tiene aplicaciones biomédicas e industriales. Las aplicaciones industriales del colágeno datan desde mucho tiempo atrás. El principal atractivo del colágeno como biomaterial para aplicaciones biomédicas es su baja inmunogenicidad por lo que es visto en el cuerpo como un constituyente natural en lugar de un cuerpo extraño. El colágeno se puede procesar de diversas presentaciones como tubos, esponjas, polvos, soluciones inyectables (Meena y col., 1999).

Industrialmente, el colágeno tiene aplicaciones en la elaboración de cuero y la elaboración de la gelatina. El cuero consiste básicamente en piel animal tratada químicamente, mientras que la gelatina es tejido conectivo animal que es desnaturalizado y degradado por el calor y agentes químicos. Ambos consisten básicamente de colágeno pero son muy distintos en cuanto a su química y forma (Meena y col., 1999).

La gelatina es sin duda actualmente uno de los ingredientes más versátiles en la industria, encontrando mayor aplicación en la industria cosmetológica, al ser constituyentes de jabones, shampos, cremas faciales y otros cosméticos. La gelatina en las últimas décadas en la industria de alimentos, se ha venido potenciando significativamente, ya que suele utilizarse para mejorar la elasticidad, la consistencia y la estabilidad de los alimentos (Fennema, 2000). La gelatina se obtiene del colágeno de piel y huesos de animales terrestres.

También cuando el colágeno se calienta en exceso, más allá de la temperatura óptima, se obtiene un producto amorfo, sin ninguna ordenación que se usa como pegamento y que comúnmente se le conoce como cola.



**Figura 7.** Biosíntesis de colágeno.  
Fuente: Atlas de histología vegetal y animal

### 3.5 Generalidades de Lisil Oxidasa

Palamakumbura y Trakman (2002) reportaron que LOX se sintetiza como proenzima de 50 kDa y es secretada en el medio ambiente extracelular para después ser activada por enzimas proteolítica que dan como resultado una enzima funcional con un peso molecular de 32 kDa y un propéptido de 24 kDa (Panchenko y col., 1996). La enzima funcional está involucrado en la reticulación de colágeno y elastina en el espacio extracelular. Estos enlaces cruzados contribuyen al mantenimiento de la estructura física y la rigidez de la matriz de colágeno (Bailey y col., 1998), así como a mantener sus propiedades funcionales.

Por lo tanto LOX juega un papel muy importante en la formación y reparación de la matriz extracelular en sistemas cardiovasculares, respiratorios, óseos y otros sistemas del cuerpo. La visión inicial en la estructura molecular de LOX fue derivada de la clonación de la secuencia de ADNc de la aorta de rata (Trackman y col., 1990, 1991).

Aunque el peso molecular del catalizador funcional aislado de los tejidos conectivos variaron entre 28 y 32 kDa, dependiendo de las especies de vertebrados de origen, una proteína de 46 kDa era el producto del gen predicho a partir de la secuencia de ADNc obtenido. Estudios posteriores (Trackman y col., 1991; Panchenko y col., 1996) se confirmó que la enzima de la aorta de rata se sintetiza como una pre-proteína de 46 kDa que contiene secuencia de péptido señal. El péptido señal se elimina por la escisión en el vínculo Cys21-Ala22 y el dominio de propéptido es N-glicosilado durante su paso a través del aparato de

Golgi produciendo una proenzima de 50 kDa, que se secreta entonces en la matriz extracelular como una proteína catalíticamente inactiva (Trackman y col., 1992).

La enzima activa de 32-kDa se libera por escisión proteolítica de la proenzima en Gly162-Asp163 por una metalo-endoproteasa (Cronshaw y col., 1995; Panchenko y col., 1996) y recientemente confirmado (Uzell y col., 2001). Lo que se sabe actualmente de las propiedades catalíticas y moleculares de la enzima activa viene en gran parte derivadas de la cinética, química, y estudios espectroscópicos en LOX purificada a partir de aorta bovina. La comparación de la secuencia de aminoácidos de la enzima lisil oxidasa de aorta de rata con varios péptidos aislados de lisil oxidada del tubo digesto de bovino reveló que hay una homología casi completa entre estas dos enzimas (Trackman y col., 1990, 1991). Por otra parte, las propiedades de LOX de rata y LOX purificada de bovino son casi las mismas y es pertinente pensar que también para las formas con actividad catalítica de las enzimas clonados de humano, ratón y de pollo se esperaría encontrar homología mayor al 95%.

Los primeros intentos de purificación de LOX de los tejidos conectivos se vieron frustrados por la insolubilidad de la enzima en solución salina neutra. El hallazgo de que la enzima se solubiliza fácilmente por estos tampones suplementados con urea 4 a 6 M (Narayanan y col., 1974) allanó el camino para ser exitosamente purificada hasta la homogeneidad aparente. La insolubilidad de LOX probablemente refleja su estrecha asociación con sus sustratos en la matriz extracelular (Kagan y col., 1986), que es consistente con el comportamiento totalmente soluble de LOX excreta por células fibrogénicas *in vitro*, antes de la deposición de cantidades significativas de proteínas de la matriz extracelular.

La enzima LOX madura aislada de aorta bovina migra como una proteína de una sola banda aparentemente de 32 kDa, en SDS-PAGE (Kagan y col., 1979). Esta enzima aparentemente homogénea resultó en cuatro isoformas de 32 kDa sobre una cromatografía a través de DEAE celulosa. Cada uno de estas isoformas muestra el mismo mecanismo catalítico, la especificidad y el perfil inhibitorio (Sullivan & Kagan, 1982).

### **3.7 Entrecruzamiento de Colágeno por Lisil Oxidasa**

La estructura fibrosa del colágeno se estabiliza frente al esfuerzo mecánico por entrecruzamientos intra e intermoleculares inducidos enzimáticamente. Inicialmente, la formación de enlaces cruzados está mediada por la enzima LOX durante la formación de las fibras de colágeno. La actividad de esta enzima está limitada a la región no helicoidal del colágeno, es decir, en los telopéptidos, y da como resultado la deaminación de lisina (Lys) e hidroxilisina (Hyl) para formar una molécula llamada piridinolina (Pyr).

La molécula de mayor entrecruzamiento de colágeno maduro es la Pyr (Ando 2001). LOX se ha estudiado ampliamente en los organismos terrestres (pollo, bovinos y humanos), principalmente con un enfoque biomédico. Sin embargo, desde el punto de vista de la ciencia alimentaria, hay evidencia del efecto que pueden tener un alto contenido de colágeno y Pyr en la textura de los alimentos y una estrecha relación se ha encontrado entre la firmeza muscular y el comportamiento de colágeno en los mariscos (Eyre, 2005).

Pyr es un componente muy activo de la matriz extra celular que da estabilidad y dureza al colágeno y elastina por entrecruzamientos en ingles “cross-linking” (Fujimoto y col., 1977).

En el músculo de calamar alrededor del 70% del colágeno permanece insoluble después de calentarlo por más de 30 minutos, como se sabe el colágeno en los músculos gelatiniza después de un tratamiento de calor por lo que este hecho sugiere que hay un tipo de colágeno resistente al calentamiento donde la Pyr está en mayor concentración lo que produce un mejor entrecruzamiento estable al calentamiento (Ando 2001). En un estudio realizado por Ando y sus colaboradores también se determinó la cantidad de Hyl en este colágeno insoluble, el cual resultó ser más bajo que en el colágeno soluble, esto es porque la molécula de Pyr es formada por la oxidación de Hyl por la enzima LOX.

Por lo tanto sí los niveles de LOX en tejido están elevados esto llevará a mayor producción de Pyr por lo tanto habrá más dureza y estabilidad en el tejido (Consuegra & Johnston 2006).

Es importante saber que la actividad LOX, o incluso presencia de esta enzima, no se ha reportado en tejido de animales marinos. Sin embargo, es bien sabido que en el salmón del Atlántico, a pesar de su baja concentración de colágeno, la cantidad de piridinolina (Pyr) entrecruzada afecta a las propiedades texturales del salmón fresco o ahumado (Johnston y col., 2005). Mientras tanto, en el manto de diferentes especies de calamar (*Loligo pealei* y *Todarodes pacificus*), se observó un aumento en la cantidad de Pyr y contenido de la fracción de colágeno insoluble después de un tratamiento térmico (Ando y col., 2001).

En estudios anteriores, el contenido, así como algunas propiedades físicas y químicas, del colágeno soluble en pepsina (CSP) y el colágeno insoluble (CI) se comparó en aleta, manto y tentáculos de calamar gigante adulto (Torres-Arreola y col., 2008). En ellos, el uso de calorimetría diferencial de barrido mostró una transición estructural molecular muy alta en las temperaturas de 115 a 120 °C con el CSP. La más alta temperatura y  $\Delta H$  se detectaron para el colágeno de los tentáculos calamares gigantes. Estos hechos sugieren fuertemente la presencia de LOX en los tejidos de calamares gigantes.

## **MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **4.1 Materia Prima**

Se utilizó músculo de especímenes adultos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*), los cuales fueron capturados en las costas de Bahía de Kino, Sonora. Los organismos eviscerados fueron transportados en hielo al laboratorio de productos marinos del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Universidad de Sonora, e inmediatamente se llevó a cabo el faenado, separando las aletas, manto y tentáculos, los cuales fueron destinados para análisis enzimático.

### **4.2 Extracción Enzimática**

La extracción del tejido conectivo fue desarrollada de acuerdo a la metodología descrita por Kagan y Cai (1995) con ligeras modificaciones. 100 gramos de músculo fresco de las tres regiones anatómicas (manto, aletas y tentáculos) del calamar gigante fue mezclado y homogenizado por 24 h con una solución de NaOH 0.1 N con la finalidad de remover las proteínas miofibrilares y proteoglicanos. Pasadas las 24 h, se procedió a la centrifugación a 9000 rpm por 40 min para obtener un precipitado (tejido conectivo), el cual fue puesto en congelación para su futura liofilización.

### **4.3 Ensayos de Actividad**

La actividad de LOX fue determinada utilizando la técnica descrita en 2002 por Palamakumbura y Trakman, basada en la detección fluorométrica (Ex, 560 nm;

Em, 590 nm) del compuesto amplex red. La mezcla de reacción (1000  $\mu$ L) está compuesta por: 10 mM de 1,5-diaminopentano (sustrato específico sintético), 50 mM de borato de sodio (pH 8.2), 1.2 M de urea, 10 mM de amplex red (N-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina) utilizado como fluoróforo una unidad de peroxidasa de rábano y 50  $\mu$ L del extracto enzimático (adicionado al final). La mezcla de reacción fue incubada por 30 min a 37 °C, pasado ese tiempo la reacción fue detenida aplicando un enfriamiento con hielo. La actividad fue reportada como la cantidad de peróxido de hidrogeno formados por mg de proteína, comparando los cambios en fluorescencia con una curva estándar de peróxido de hidrogeno.

#### **4.4 Electroforesis en Gel de SDS-Poliacrilamida**

La masa molecular de la enzima semipurificada fue estimada por electroforesis en gel de sds-poliacrilamida con dodecíl sulfato sódico al 12% (SDS-PAGE) en condiciones reductoras. El gel fue teñido con azul de Coomassie. Las imágenes de las muestras en geles de electroforesis fueron capturadas utilizando un densitómetro.

#### **4.5 Cuantificación de Piridinolina**

100 mg de tejido conectivo liofilizado fueron hidrolizados con tres mL HCl 6M a 150 °C por 6 h. Después la muestra hidrolizada se pre-fraccionó mediante la extracción de fase sólida (SPE) usando una columna de entrecruzamiento Chromabond® para remover moléculas de interferencia. Después 1.6 mL de la muestra hidrolizada fueron diluidos con un volumen igual de ácido acético al 90% y se mezclaron con 2.5 mL de acetonitrilo en un tubo de ensaye de 5 mL. Luego,

la solución se transfirió a una columna SPE previamente equilibrada con 2.5 mL de tampón de lavado preparado con acetonitrilo, ácido acético y agua desionizada (8: 1: 1, v / v / v). La columna se lavó cuatro veces con 2.5 mL de tampón de lavado y un lavado final con 400  $\mu$ L de agua desionizada. La columna se drenó y los entrecruzamientos de Pyr se eluyeron con 200  $\mu$ L de ácido heptafluorobutírico al 1% (HBFA) directamente en un vía de HPLC de micro-inserto. La Pyr se separó usando un sistema HPLC Serie 1100 (Hewlett Packard Co. Waldbrom, Alemania) acoplado a un detector de fluorescencia. Se utilizó un sistema de inyección automática equipada con una jeringa de 100  $\mu$ L para cargar 20  $\mu$ L de cada muestra a una columna ODS C18 Microsorb-MV (100 C18, 4.6 mm ID x 250 mm, Microsorb, Rainin, CA, EE.UU.) y la separación fue realizada a una velocidad de flujo de 1 mL/min a 40 ° C. La fase móvil consistió en 0.12% HBFA en agua desionizada (solución A) y acetonitrilo al 50% (solución B). La columna se equilibró con 20% de disolvente B, la separación cromatográfica se logró con un gradiente de elución de 20 a 30% de disolvente B en 20 min. La Pyr fue controlada por fluorescencia a  $\lambda_{ex} = 297$  nm and  $\lambda_{em} = 395$  nm. El Contenido de Pyr se estimó como moles por mol de colágeno. Se utilizó un factor de 7.14 para convertir masa de hidroxiprolina a la masa de colágeno, y la concentración se calculó suponiendo que el colágeno tiene una masa molecular de  $3.38 \times 10^5$  g/mol (Ando y col., 2006).

#### **4.6 Determinación del Perfil de textura**

La textura fue medida registrando la fuerza requerida para cortar el músculo de calamar (1 cm x 1 cm x 1 cm) utilizando un texturómetro TA-XT2 Plus (Food

Technology Corp., Sterling, VA, USA) con una cuchilla en forma de V unido a una celda de 100 N de carga y a una velocidad de corte de 200 mm/min.

#### **4.7 Análisis Estadístico**

El diseño estadístico del presente estudio fue planeado para reducir la variación entre repeticiones. Los datos referidos de la actividad LOX y contenido Pyr se basan en el promedio de tres determinaciones. El análisis de la textura se basa en el promedio de diez determinaciones. Los datos fueron evaluados mediante el análisis de varianza (ANOVA). Se establecieron las diferencias de medias mediante la prueba de Tukey con una variación por la replicación de <5%. También se realizó un análisis de correlación entre la actividad LOX, el contenido Pyr y textura. Los datos fueron analizados mediante el programa JMP 5.0.

## RESULTADOS

### 5.1 Obtención de Tejido Conectivo

El extracto crudo de tejido conectivo fue obtenido a partir de 100 g de músculo de cada una de las regiones anatómicas (aleta, manto y tentáculos) del calamar gigante, donde primeramente fue necesario realizar una precipitación del tejido conectivo. Dicha extracción se llevó a cabo durante los 20 días donde el músculo permaneció en hielo, con intervalos de cinco días (Día 0, 5, 10, 15 y 20). Debido a que el rendimiento de extracción se mantuvo constante durante todo el periodo de almacenamiento, en la Tabla 1 solo se muestra el contenido de tejido conectivo al día cero de las tres regiones anatómicas evaluadas, donde los tentáculos presentan un mayor contenido en comparación con aletas y manto ( $P < 0.05$ ). Esto concuerda con investigaciones anteriores, donde se ha reportado que en dicha región anatómica se encuentra un mayor contenido de tejido conectivo (Torres-Arreola y col., 2008).

**Tabla 1.** Tejido conectivo extraído a partir 100 gramos de músculo fresco de calamar gigante.

Días de Almacenamiento (días)	Aleta	Manto	Tentáculos
Día 0	1.68 g	0.74 g	1.85 g

\*Los valores obtenidos representan el tejido conectivo con un contenido de humedad del 90%.

El rendimiento en gramos obtenido del tejido conectivo fue consistente con el reportado en la investigación de Luna-Raya y colaboradores en 2006 ya que atribuyen solamente entre 2% del peso total de músculo a las proteínas del tejido conectivo.

Por otra parte, en estudios llevados a cabo en especies de calamar como *Loligo patagonica*, *Illex argentinus*, *Illex cndenti*, *Tadoropis eblanae* (Sikorski y Borderias, 1994; Morales y col., 2000) se ha detectado un contenido de tejido conectivo que varía entre el 3 y 18 % en las diferentes regiones anatómicas, incluyendo manto y aleta. La gran variabilidad en los valores encontrados para las tres regiones anatómicas analizadas y con respecto a lo reportado previamente, sustenta que dependiendo de las funciones que desempeña el organismo y considerando que los cefalópodos son especies de rápido crecimiento, implicando un alto grado de reemplazo o recambio proteico, estos factores afectan significativamente la variabilidad en el contenido de tejido conectivo en el músculo (Sikorski y Borderias, 1994; Morales y col., 2000).

Cabe mencionar que el contenido de tejido conectivo no mostró variación significativa ( $P \geq 0.05$ ) durante el almacenamiento en hielo del calamar gigante. Finalmente, una vez obtenido el tejido conectivo este fue sometido a un proceso de extracción de nuestra enzima en estudio LOX.

## **5.2 Actividad de Lisil Oxidasa**

Se evaluó la actividad de LOX extraída del músculo de calamar gigante durante los 20 días de almacenamiento en hielo, utilizando 1,5-diaminopentano como

sustrato específico (Tabla 2). Se ha informado que la edad y el tamaño de los organismos marinos influye en el contenido de tejido conectivo y la actividad de LOX en su músculo (Ando y col., 2006). Teniendo en cuenta que LOX es una enzima extracelular situada en el tejido conjuntivo, se espera que tenga actividad diferente según la región anatómica evaluada.

**Tabla 2.** Actividad de lisil oxidasa durante el almacenamiento en hielo del músculo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

Almacenamiento en hielo (días)	Actividad específica ( $10^{-3}$ U/mg proteína*)		
	Aleta	Manto	Tentáculos
0	7.0 <sup>c</sup>	4.1 <sup>a</sup>	2.0 <sup>a</sup>
5	7.0 <sup>c</sup>	4.0 <sup>a</sup>	4.1 <sup>c</sup>
10	7.1 <sup>c</sup>	5.2 <sup>b</sup>	5.0 <sup>d</sup>
15	5.2 <sup>b</sup>	5.9 <sup>c</sup>	3.2 <sup>b</sup>
20	4.1 <sup>a</sup>	7.1 <sup>d</sup>	3.1 <sup>b</sup>

Unidades = Actividad expresada como nmoles de peróxido de hidrogeno producidos en un minuto

\*U = Unidades por mg de proteína en ensayo a 37°C.

Los datos son la media de tres determinaciones, la variación entre repeticiones fue <5%.

Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En la Tabla 2 se muestra que durante los 20 días de almacenamiento en hielo. La actividad de LOX presenta un comportamiento diferente entre las tres regiones anatómicas evaluadas, mientras que la actividad específica de LOX extraída de aletas mostró una tendencia a disminuir gradualmente, siendo un 43% inferior a los 20 días que al día 0 (músculo fresco). Por lo contrario, en manto la actividad aumentó gradualmente, con un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en su actividad específica en el mismo período de tiempo. Por último, en los tentáculos

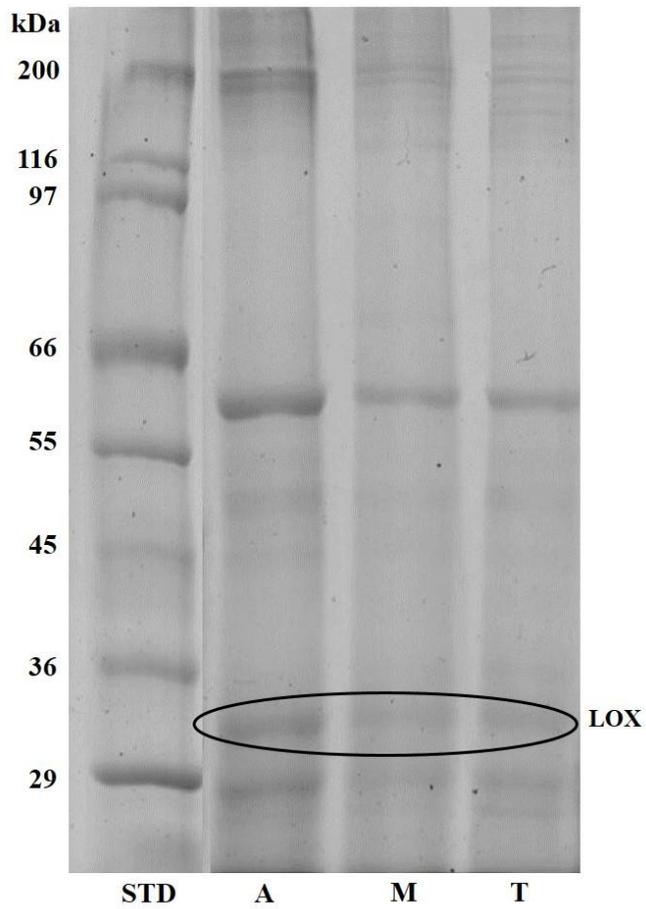
la actividad de LOX alcanzó un valor máximo después de 10 días de almacenamiento en hielo, con una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) para después disminuir gradualmente a partir del día 15. La presencia de LOX activa en el músculo sugiere la producción de Pyr durante el almacenamiento en hielo de calamar gigante, que podría conducir al incremento en la dureza del músculo durante el mismo período de tiempo, influenciado inicialmente por este comportamiento enzimático. Lo anterior podría estar relacionado con la alta resistencia térmica lograda por las proteínas del tejido conectivo durante el almacenamiento en hielo de aleta, manto y tentáculo de calamar gigante, que afecta a la solubilidad del colágeno en el músculo (Razcon-Zavala y Tapia-Vazquez, 2015).

Más allá de las diferencias en la actividad de LOX con respecto al tiempo de almacenamiento, es importante resaltar que su actividad presenta diferencias considerables entre regiones anatómicas. Además de una mayor actividad con respecto a lo reportado anteriormente para la misma especie. En este sentido, Torres-Arreola y col. (2011) reportaron una actividad de 0.0002 U/mg proteína en un extracto crudo de LOX de tentáculos de calamar gigante, lo cual es inferior a lo detectado en las tres regiones anatómicas evaluadas en este estudio. Dichas diferencias podrían deberse a la edad de los organismos evaluados, ya que en dicho estudio se trabajó con calamares de mayor talla (45-50 cm), lo cual implica que se trata de organismos adultos, a diferencia de los evaluados en este estudio (25-30 cm). Diversos autores han reportado que la edad juega un papel fundamental en el grado de entrecruzamiento de las fibras de colágeno por efecto de la acción de LOX, siendo mayor el grado de entrecruzamiento en organismos

adultos (Kaga, 1986; Palamakumbura y Trackman, 2002). Sin embargo, en este caso al tratarse de un organismo de rápido crecimiento y recambio proteico, la actividad de LOX puede variar considerablemente.

### **5.3 Perfil Electroforético**

Una vez realizado el procedimiento de extracción y los ensayos de actividad enzimática, se realizó una electroforesis en geles de SDS-Policrilamida de extractos obtenidos a partir de músculo fresco de las tres regiones anatómicas de calamar gigante, la cual sugiere que LOX apareció como una banda con un peso molecular (PM) de 32-34 kDa (Figura 9). Sin embargo, ya que este es un extracto crudo a partir de tejido conectivo, se pueden ver más bandas, probablemente relacionado con cadenas  $\beta$  de colágeno ( $\approx 200$  kDa) y elastina ( $\approx 60$  kDa). Se ha informado que LOX aislada de mamíferos y sobre expresada a partir de peces de agua dulce tiene un peso molecular de 28-32 kDa (Kagan & Li, 2003; Reynaud y col., 2008). Por otra parte, LOX purificada de tentáculos de calamar gigante también tiene un peso molecular dentro de este rango (32 kDa) (Torres-Arreola y col., 2012).



**Figura 8.** Electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida del extracto crudo de LOX obtenido a partir de músculo fresco de aletas (A), manto (M) y tentáculos (T) de calamar gigante. STD: estándar de peso molecular.

#### 5.4 Concentración de Piridinolina

Con la finalidad de determinar el grado de entrecruzamiento de las fibras de colágeno, se cuantificó el contenido de Pyr de las tres regiones anatómicas del calamar gigante (aletas, manto y tentáculos) en el músculo fresco (día 0) y al final del almacenamiento en hielo (día 20). En el músculo fresco el contenido de Pyr en aletas fue de 233.3 pmol/ 100 mg de tejido conectivo. En cambio en aleta y manto el contenido no pudo ser determinado. Sin embargo, todas las regiones anatómicas mostraron un aumento significativo en la cuantificación de día 20 de almacenamiento en hielo ( $p < 0.05$ ). En otras palabras, la molécula Pyr se acumula independientemente del valor de la actividad enzimática. Por otra parte, el contenido Pyr encontrado después del almacenamiento en hielo está relacionada con la dureza del músculo, lo que confirma la interdependencia entre el entrecruzamiento de colágeno y la textura del músculo de calamar gigante. Estos hallazgos concuerdan con el estudio realizado por Razcón-Zavala y Tapia-Vázquez (2015), donde se encontraron cambios en las proteínas del tejido conectivo durante el mismo almacenamiento de hielo, induciendo una disminución significativa de la solubilidad del colágeno. Por otro lado, se ha sugerido que el contenido Pyr en el pescado y calamar podría aumentar durante la manipulación en frío del músculo, afectando las propiedades texturales de la estabilidad de las fibras de colágeno (Ando y col., 2001).

**Tabla 3.** Cuantificación de piridinolina durante el almacenamiento en hielo del músculo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

Almacenamiento en hielo (días)	Contenido de piridinolina (pmol/100 mg tejido conectivo)		
	Aleta	Manto	Tentáculo
0	233.3 <sup>a</sup>	ND	ND
20	526.6 <sup>b</sup>	351	474.2

ND: no detectado

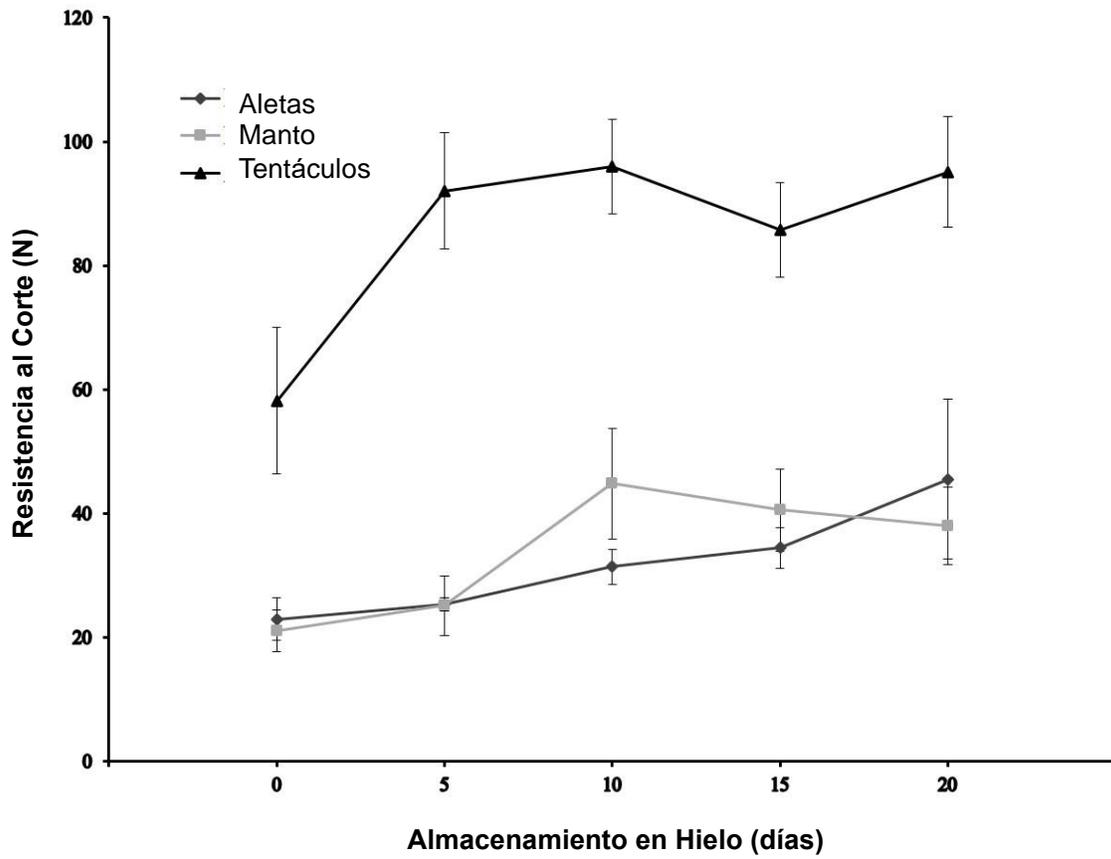
Los resultados son promedio de tres determinaciones.

Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### 5.5 Perfil de Textura

En la Figura 9 se muestran los cambios en la dureza del músculo que se miden como la resistencia al corte que presentan las regiones anatómicas del calamar gigante (aleta, manto y tentáculos) durante los 20 días de almacenamiento en hielo. Después del día 10 con respecto al día 0 se encontraron cambios significativos ( $p < 0,05$ ) en la dureza del músculo para las tres regiones anatómicas. Lo anterior podría estar relacionado con el mecanismo de entrecruzamiento del colágeno durante el almacenamiento en hielo del calamar gigante, esto debido probablemente a la actividad de LOX, que entrecruza el colágeno y la elastina en el músculo mediante la formación de Pyr a través de la deaminación de lisina e hidroxilisina y así aumentando la estabilidad de la molécula de colágeno que se reflejaría como un aumento en la fuerza de corte de las fibrillas (Kagan y col, 1986; Smith-Mungo & Kagan, 1998; Torres-Arreola y col., 2012).

Por otra parte, después del día 10 hasta el 20 no se encontraron cambios significativos ( $p > 0,05$ ) en la fuerza de corte requerida para cualquiera de las regiones anatómicas evaluadas. Esto puede ser debido a una actividad proteolítica (endógena y microbiana) sobre las proteínas miofibrilares que son las principales proteínas en el músculo con casi un 80%. En otras palabras el músculo está entrando en un periodo de descomposición lo que conlleva a la degradación de estas proteínas miofibrilares y así a la pérdida de dureza del músculo por el tiempo que lleva en el hielo el músculo. Razcon-Zavala y Tapia-Vazquez (2015) informaron de cambios en la agregación y la resistencia térmica de las proteínas del tejido conectivo durante el almacenamiento en hielo, que podrían estar relacionados con el endurecimiento muscular que se muestra en este estudio.



**Figura 9.** Fuerza de corte requerida en las diferentes regiones anatómicas durante su almacenamiento en hielo.

## CONCLUSIONES

Basado en lo observado en los geles de poliacrilamida, se logró identificar la LOX extraída del tejido conectivo, con un peso molecular de aproximadamente 32 KDa. De la misma manera se obtuvieron resultados positivos en los ensayos de actividad enzimática ya que con el sustrato específico 1,5-aminopentano. Esto asegura que LOX está presente y activa en las tres regiones anatómicas de *dosidicus gigas* durante su almacenamiento en hielo.

Se logró establecer una relación entre la actividad de LOX, el contenido de Pyr y la resistencia al corte del músculo de calamar gigante durante su almacenamiento en hielo. En este trabajo se reporta por primera vez los cambios de actividad de la LOX y contenido de Pyr de este organismo durante su almacenamiento el hielo, lo cual podría ayudar a entender el comportamiento del músculo de calamar gigante durante su manejo poscaptura.

## **RECOMENDACIONES**

Se recomienda en estudios posteriores la cuantificación de piridinolina con intervalos de 5 días como máximo para poder apreciar el aumento de esta molécula gradualmente.

Se recomienda también cuantificar el contenido de hidroxilisina al inicio y término del almacenamiento de calamar gigantes con el fin de saber si esta molécula está siendo utilizada para la formación de Pyr por parte de LOX.

## REFERENCIAS

- Ando, M., Makino, M., Tsukamasa, Y., Makinodan, Y. & Miyoshi, M. (2001). Interdependence between heat stability and pyridinoline contents of squid mantle collagen. *Journal of Food Science*.
- Ando, M., Nakagishi, Y. & Yoshida, K. (2006). Pyridinoline concentration in muscular and skin collagen of fish and relationship between collagen solubility and pyridinoline concentration in fish muscular collagen. *Fisheries Science*.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (1990). Molecular biology of the Cell. 2<sup>nd</sup> ed., Garland Pubs., New York, USA 1219 pp.
- Bailey, A., Paul, R. & Knott, L. (1998). Mechanisms of maturation and ageing of collagen. *Mechanisms of Ageing and Development*, 106, 1–56.
- Consuegra, S., & Johnston, I.A. (2006). Polymorphism of the lysyl oxidase gene in relation to muscle collagen cross-link concentration in Atlantic salmon. *Aquaculture*.
- Cronshaw, A.D., Fothergill-Gilmore, L.A. & Hulmes, D.J. (1995). The proteolytic processing site of the precursor of lysyl oxidase. *Biochem J* 306:279–284.
- Cubillos, L., Ibáñez, C., González, C. & Sepúlveda, A. (2004). Pesca de jibia (*Dosidicus gigas*) con red de cerco entre la V y X Región, año 2003. Pesca de Investigación. *Instituto de Investigación Pesquera Octava Región. Talcahuano, Chile*. 48 p.

- Dalmay, T. & Edwards, D.R. (2006). MicroRNAs and the hallmarks of cancer. *Oncogene* 25 (46): 6170-5.
- Dawson, D.A., Rinaldi, A.C. & Poch, G. (2002). Biochemical and toxicological evaluation of agent-cofactor reactivity as a mechanism of action for osteolathyrism. *Toxicology* 177 (2-3): 267-84.
- 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. *Interciencias* 32(3):144-150.
- Domingues, P.M., Kingston, T., Sykes, A. & Andrade, J.P. (2002). The effects of temperature en the life cycle of two consecutive generations of the cuttlefish *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758), culture in the Algarve (South Portugal). *Aquacult. Int.* 10:207-220.
- Ehrhardt, N.M., Jacquemin, F., García, B., González, D., López, B., Ortíz, C. & Solís, N. (1982). Descripción de la pesquería de calamar gigante *Dosidicus gigas* durante 1980 en el Golfo de California. Flota y poder de pesca. *Instituto Nacional de la Pesca.* 3:41-60.
- Ehrhardt, N.M., Jacquemin, F., García, B., González, D., López, B., Ortíz, C. & Solís, N. (1983). On the fishery and biology of the giant squid (*Dosidicus gigas*) in the Gulf of California, México. En Advances in Assessment of world cephalopod resources (J.F. Caddy, ed). *FAO Fish Fed.* 231:306-339.
- Ehrhardt, N.M., Solís, N.A., Pierre, S.J., Ortíz, J., Ulloa, P., Gonzáles, G. & García, F. (1986). Análisis de la biología y condiciones de stock del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en el Golfo de California, México, durante 1980. *Ciencia Pesquera INP* 5: 63-76.

- Ehrhardt, N.M. (1991). Potential impact of a seasonal migratory jumbo Squid (*Dosidicus gigas*) stock on a Gulf of California sardine (*Sardinops sagax caerulea*) population. *Bulletin of Marine Science* 49 (1-2): 325-332.
- Engel, J., & Bachinger, H.P. (2005). Structure, stability and folding of collagen triple helix. *Top. Curr. Chem* (247):7-33.
- Exposito, J.Y., Cluzel, C., Garrone, R. & Lethias, C. (2002). Evolution of collagens. *Antatomical record* 268(3):302-316.
- Eyre, D.R. & Wu, J.J. (2005). Collagen cross-link. *Top Curr Chem* (247):207-229
- Franklin, T.J. (1995). Current approaches to the therapy of fibrotic diseases. *Biochem Pharmacol* 49 (3): 267-73.
- Fennema, O. (2000). Química de los Alimentos 2da ed., Acribia España, 1280 pp.
- Fujimoto, D., Akiba, K. & Nakamura, N. (1977). Isolation and characterization of a fluorescent material in bovine achilles tendon collagen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 76, 1124–1129.
- Gacheru, S.N., Trackman, P.C., Calaman, S.D., Greenaway, F.T. & Kagan H.M. (1989). Vicinal diamines as pyrroloquinoline quinone-directed irreversible inhibitors of lysyl oxidase. *J Biol Chem* 264 (22): 12963-9.
- Gacheru, S.N., Trackman, P.C., Shah, M.A., O'Gara, C.Y., Spacciapoli, P. & Greenaway, F.T. (1990). Structural and catalytic properties of copper in lysyl oxidase. *J Biol Chem*; 265 (31): 19022-7.
- Gregory, K.E., Marsden, M.E., Anderson-MacKenzie, J., Bard, J.B., Bruckner, P. & Farjanel, J. (1999). Abnormal collagen assembly, though normal phenotype, in alginate bead cultures of chick embryo chondrocytes. *Exp Cell Res* 246 (1): 98-107.

- Ibarra-Garcia, L.E., Camarillo-Coop, S. & Salinas-Zavala, C.A. (2014). Cannibalism assessment of jumbo squid *Dosidicus gigas* from the Gulf of California. *Hidrobiológica* [online]. 2014, vol.24, n.1, pp. 51-56. ISSN 0188-8897.
- Johnston, I., Li, X. & Bickerdike, R. (2005). Hydroxylysyl pyridinoline cross-link concentration affects the textural properties of fresh and smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) flesh. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Kagan, H.M., Sullivan, K.A., Olsson, T.A. & Cronlund A.L. (1979). Purification and properties of four species of lysyl oxidase from bovine aorta. *Biochem J* 177:203–214.
- Kagan, H., Vaccaro, C., Bronson, R., Tang, S. & Brody, J. (1986). Ultrastructural immunolocalization of lysyl oxidase in vascular connective tissue. *The Journal of Cell Biology*, 103, 1121–1128.
- Kagan, H.M. (1994). Lysyl oxidase: mechanism, regulation and relationship to liver fibrosis. *Pathol Res Pract* 190 (9-10): 910-9.
- Kagan, H. & Cai, P. (1995). Isolation of active site peptides of lysyl oxidase. *Methods in Enzymology*, 258, 122–132.
- Kagan, H. & Li, W. (2003). Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *Journal of Cellular Biochemistry*, 88, 660–672.
- Kijowski, J. (2001). Muscle proteins. En Z.E. Sikorski (Ed). *Chemical and functional properties of food proteins*. (pp 233–264). New York: CRC Press LLC.
- Klett, T., Casas-Valdez, M., Ponce-Díaz, G. (1996) Estudio potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur. *Instituto Nacional de la Pesca/SEPESCA, Mexico*, pp 127–149.

- Konishi, A., Iguchi, H., Ochi, J., Kinoshita, R., Miura, K. & Uchino H. (1985). Increased lysyl oxidase activity in culture medium of nonparenchymal cells from fibrotic livers. *Gastroenterology* 89 (4): 709-15.
- Krauzer, R.. (1986). Squid Seafood Extraordinaire in "Infofish marketing digest". N° 6. (Editado por Sikorski Z.E.). Ed, CRP Press LLC New York, pp. 233-64.
- Kugino, M., & Kugino, K. (1994). Microstructural and rheological properties of cooked squid mantle. *J. Food Sci.* 59: 792-796.
- Laczko, R., Szauter, K.M., Jansen, M.K., Hollosi, P., Muranyi, M. & Molnar J. (2007). Active lysyl oxidase (LOX) correlates with focal adhesion kinase (FAK)/paxillin activation and migration in invasive astrocytes. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33 (6): 631-43.
- Liu, G., Nellaiappan, K. & Kagan H.M. (1997). Irreversible inhibition of lysyl oxidase by homocysteine thiolactone and its selenium and oxygen analogues. Implications for homocystinuria. *J Biol Chem* 272 (51): 32370-7.
- Luna, R.M.C., Urciaga, G.J., Salinas, Z.C., Cisneros, M. & Beltrán, M. (2006). Diagnóstico del consumo del calamar gigante en México y en Sonora. *Economía, Sociedad y Territorio*.
- Markaida, U. (2001). Biología del Calamar Gigante *Dosidicus gigas* Orbigny, 1835 (Cephalopoda: Ommastrephidae) en el Golfo de California, México. *Tesis Doctoral, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada*.
- Markaida, U. & Sosa-Nishizaki, O. (2003). Food and feeding habits of jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae) from the Gulf of

- California, México. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*. 83:507:522.
- Markaida, U., Quiñonez-Velázquez, C. & Sosa-Nishizaki, O. (2004). Age, growth and maturation of jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae) from the Gulf of California, Mexico. *Fisheries Research*. 66:31-47.
- Maza-Ramírez, S. (2001). Tecnología de Procesamiento de Pota "*Dosidicus gigas*"
- Meena, C., Mengi, S.A. & Deshpande, S.G. (1999). Biomedical and industrial applications of collagen. *Proc. Indian Acad. Sci (Chem Sci)* 111(2):319-329
- Narayanan, A.S., Siegel, R.C. & Martin G.R. (1972). On the inhibition of lysyl oxidase by b-aminopropionitrile. *Biochem Biophys Res Commun* 46: 745-51.
- Narayanan, A.S., Siegel R.C. & Martin G.R. (1974). Stability and purification of lysyl oxidase. *Arch Biochem Biophys* 162: 231–237.
- Nesis, K.N. (1970). The Biology of the giant squid of Peru and Chile, *Dosidicus gigas*. *Ocean*. 10(1):108-118.
- Nigmatullin, C.M., Arkhipkin, A.I. & Sabirov, R.M. (1991). Structure of the reproductive system of the squid, *Thysanoteuthis rhombus* (Cephalopoda: Oegopsida). *Journal of Zoology* 224: 271-283.
- Nigmatullin, C.M. & Markaida, U. (2009). Oocyte development, fecundity and spawning strategy of large sized jumbo squid (*Dosidicus gigas*) (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 89:789-801.
- Ochiai, Y., Kariya, Y., Watabe, S. & Hashimoto K. (1985). Heat-induced tendering of turban shell (*Batillus cornutus*) muscle. *J. Food Sci.* 50: 981-984.

- Otwell, W.S., & Hamann, D.D. (1979). Textural characterization of squid (*Loligo pealei*): Instrumental and panel evaluations. *J. Food Sci.* 44: 1636-1643.
- Palamakumbura, A. & Trakman, P. (2002). A fluorometric assay for detection of lysyl oxidase enzyme activity in biological samples. *Analytical Biochemistry* 300, 245-251.
- Panchenko, M., Stetler-Stevenson, W., Trubetskoy, O., Gacheru, S. & Kagan, H. (1996). Metalloproteinase activity secreted by fibrogenic cells in the processing of prolysyl oxidase. *The journal of biological chemistry*, 271, 7113-7119.
- Paredi, M.E., Tomas, M.C. & Crupkin, M. (2002). Thermal denaturation of myofibrillar proteins of striated and smooth adductor muscles of scallop (*Zygochlamys patagonica*). A differential scanning calorimetric study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 830-834.
- Purslow, P.P. (2002). The structure and functional significance of variations in the connective tissue within muscle. *Comp. Biochem. Physiol* 133A(4):947-966.
- Ramirez-Olivaz, R., Rouzaud-Sandez, O., Haard, N., Pacheco-Aguilar, R. & Ezquerro-Brauer, J. (2004). Changes in firmness and thermal behavior of ice-stored muscle of jumbo squid (*Dosidicus gigas*). *European Food Research and Technology*.
- Razcon-Zavala E. y Tapia-Vazquez A. (2015). Cambios estructurales en las proteínas del tejido conectivo del manto, aletas y tentáculos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) durante su almacenamiento en hielo. Tesis de licenciatura. Departamento de Ciencias Químico Biológicas.

- Reynaud, C., Baas, D., Gleyzal, C., Le Guellec, D. & Sommer, P. (2008). Morpholino knockdown of lysyl oxidase impairs zebrafish development, and reflects some aspects of copper metabolism disorders. *Matrix Biology*, 27, 547–560.
- Rosas-Luis, R. (2007). Descripción de la Alimentación del Calamar Gigante (*Dosidicus gigas*), D'Orbingy, 1835 en la Costa Occidental de la Península de Baja California. *Tesis de Maestría en Ciencias (Biología Marina)*, CIBNOR, México. 84 p.
- Rucker, R.B., Kosonen, T., Clegg, M.S., Mitchell, A.E., Rucker, B.R., Uriu-Hare, J.Y. & Copper, J. (1998). Lysyl oxidase and extracellular matrix protein cross-linking. *Am J Clin Nutr* 67 (5): 996-1002.
- Salinas, Z.C.A., Sánchez, H.S., Aragón, N.E., Sanches, V.C., Soria, M.G., Escoto, G.G., Moctezuma, C.T., Camarillo, C.S., Mejía, R.A. & Bazzino, F.G. (2005). Programa Mestros de la pesquería de Calamar gigante. *Comité Sistema Producto de la pesquería de calamar gigante en el Estado de Sonora*.
- Sharma, R., Kramer, J.A. & Krawetz S.A. (1997). Lysyl oxidase, cellular senescence and tumor suppression. *Biosci Rep* 1997; 17 (4): 409-14.
- Smith-Mungo, L. & Kagan, H. (1998). Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology. *Matrix Biology*, 16, 387–398.
- Sullivan, K.A. & Kagan H.M. (1982). Evidence for structural similarities in the multiple forms of aortic and cartilage lysyl oxidase and a catalytically quiescent aortic protein. *J Biol Chem* 257:13520–13526.
- Torres-Arreola, W., Pacheco-Aguilar, R., Sotelo-Mundo, R., Rouzaud-Sandez, O. & Ezquerra-Brauer, M. (2008). Caracterización parcial del colágeno extraído

a partir del manto, aleta y tentáculos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).  
*Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 6, 101–108.

Torres-Arreola, W., Ezquerra-Brauer, J.M., Pacheco-Aguilar, R., Valenzuela-Soto, E.M., Rouzaud-Sandez, O., Lugo-Sanchez, M.E., & Carvallo-Ruiz, G. (2011). Lysyl oxidase from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) muscle: detection and partial purification. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(8), 1711-1715. doi: 10.1111/j.1365-2621.2011.02676.x.

Torres-Arreola, W., Ezquerra-Brauer, J.M., Pacheco-Aguilar, R., Valenzuela-Soto, E.M., Rouzaud-Sandez, O., Lugo-Sanchez, M.E., & Carvallo-Ruiz, G. (2012). Lysyl oxidase from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) muscle: purification and partial characterization. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(5), 947-953. doi: 10.1111/j.1365-2621.2011.02926.x.

Trackman, P.C., Pratt, A.M., Wolanski, A., Tang, S.S., Offner G.D., Troxler R.T. & Kagan H.M. (1990). Cloning of rat aorta lysyl oxidase cDNA: Complete codons and predicted amino acid sequence. *Biochemistry* 29:4863–4870; *ibid*, *Biochemistry* 30:8282, 1991.

Trackman, P.C., Bedell-Hogan, D., Tang J. & Kagan H.M. (1991). Post-translational glycosylation and proteolytic processing of a lysyl oxidase precursor. *J Biol Chem* 267:8666– 8671.

Ulloa, P., Fuentealba, M. & Ruiz, V. (2006). Hábitos alimentarios de *Dosidicus gigas* (D' Orbigny, 1835) (*Cephalopoda: Teuthoidea*) frente a la costa centro-sur de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*. 79: 475-479.

- Uriarte-Montoya, M. (2007). Aislamiento parcial y caracterización del colágeno del manto de calamar gigante (*dosidicus gigas*) y su pontencial aplicación como plastificante en la elaboración de biopelículas con quitosano. *Tesis de Maestría*
- Uzell, M.I., Scott, I.C., Babakhanlou-Chase, H., Palamakumbura, A.H., Pappano, W.N., Hong, H.H., Greenspan, D.S. & Trackman P.C. (2001). Multiple bone morphogenetic protein 1-related mammalian metalloproteinases process pro-lysyl oxidase at the correct physiological site and control lysyl oxidase activation in mouse embryo fibroblast cultures. *J Biol Chem* 276:22537–22543.
- Vazquez, O.F.A., Moron, F.O.E. & Gonzalez, M.N.F. (2004). Hydroxyproline measurement by HPLC: Improved method of total collagen determination in meat samples. *J. Liq. Chrom & Rel. Technol* 27(17):2771-2780.
- Villanueva, R., Koueta, N. & Riba J. (2003). The fatty acid composition of Octopus *Vulgaris paralarvae* reared with live and inert food: deviation from their natural fatty acid profile. *Aquaculture*. 219:613-631.
- Wakasaki, H. & Ooshima A. (1990). Immunohistochemical localization of lysyl oxidase with monoclonal antibodies. *Lab Invest* 63 (3): 377-84.
- Wilmarth, K.R. & Froines J.R. (1992). In vitro and in vivo inhibition of lysyl oxidase by aminopropionitriles. *J Toxicol Environ Health* 37 (3): 411-23.
- Xiong, Y.L. (1997). Structure-function relationships of muscle proteins. En S. Damodaran y A. Paraf (Eds). *Food proteins and their applications*. (pp. 341–392).

Young, R.E. (2009). *Dosidicus Steenstrup* (1857). *Dosidicus gigas* (Orbigny 1835).

Jumbo Squid. *Version 29 December 2009.*