



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS DE  
LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**EVALUACIÓN DE LOS POSIBLES CAMBIOS QUE SUFRE EL  
COLÁGENO EN CONEJOS DE LA RAZA CALIFORNIA  
DURANTE LAS 96 H POSTERIORES AL SACRIFICIO**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A:**

**GUADALUPE AURA ALVARADO CAMACHO**

**TUTOR PRINCIPAL:**

**Dra. Adriana Llorente Bousquets  
FES Cuautitlán**

**COMITÉ TUTOR:**

**Dr. José Francisco Montiel Sosa  
FES Cuautitlán**

**Dra. Edith Ponce Alquicira**

**Programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y Salud Animal**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Índice**

Índice de cuadros ..... ii

Índice de figuras ..... iv

Abreviaturas ..... vi

Dedicatorias ..... vii

Agradecimientos ..... viii

Resumen ..... 1

Abstract ..... 2

Introducción..... 3

1. Marco Teórico..... 4

1.1. Generalidades del colágeno ..... 4

1.2. Estructura del colágeno ..... 4

1.2.1. Tripletes de la hélice colágeno ..... 5

1.3. Síntesis de colágeno..... 8

1.3.1. Formación de fibrillas de colágeno ..... 11

1.4. Tipos de colágeno..... 11

1.5. Distribución del colágeno en el músculo esquelético ..... 15

1.6. Enlace entrecruzados del colágeno..... 16

1.7. Efecto del colágeno en la terneza ..... 19

1.8. Solubilidad del colágeno ..... 20

1.8.1. Calpaínas ..... 20

1.8.2. Catepsinas..... 20

1.8.3. Otras proteínas lisosomales ..... 21

1.8.4. Metaloproteinasas ..... 22

Justificación..... 25

Objetivos ..... 26

Hipótesis..... 27

2. Materiales y métodos ..... 28

2.1. Obtención y acondicionamiento de la muestra..... 28

2.2. pH..... 29

2.3. Cuantificación de hidroxiprolina ..... 29

2.4. Extracción del colágeno total ..... 31

---

2.5.	Extracción de colágeno soluble e insoluble .....	31
2.6.	Extracción de fibras de colágeno.....	33
2.7.	Extracción de las fracciones solubles e insolubles de las fibras de colágeno.....	34
2.8.	Perfil electroforético .....	34
2.8.1.	Preparación de la muestra.....	35
2.8.2.	Electroforesis .....	35
2.9.	Análisis estadístico .....	37
3.	Resultados y discusión .....	38
3.1.	Cuantificación de colágeno total, soluble e insoluble.....	38
3.1.1.	pH .....	38
3.1.2.	Cuantificación del colágeno total y sus fracciones .....	40
3.1.3.	Porcentaje de colágeno soluble y su relación con el pH .....	44
3.2.	Análisis del perfil electroforético de las fibras de colágeno y las fracciones soluble e insoluble .....	46
3.2.1.	SDS PAGE desnaturalizante y reductora de fibras de colágeno.....	46
3.2.2.	SDS- PAGE desnaturalizante y reductora de las fracciones de colágeno .....	50
	Conclusiones .....	58
	Bibliografía.....	60
	Anexos .....	67

**Índice de cuadros**

Cuadro 1. Frecuencia de la presencia de aminoácidos en los triplete de colágeno ..... 6

Cuadro 2. Frecuencia con la que los aminoácidos pueden localizarse en la posición X o Y de la secuencia de las cadenas de colágeno del tipo I al IV ..... 7

Cuadro 3. Clasificación de los tipos de colágeno, su composición y distribución ..... 12

Cuadro 4. Imágenes al microscopio electrónico de algunos tipos de colágeno ..... 14

Cuadro 5. Subgrupos de las MMP ..... 23

Cuadro 6. Lotes experimentales..... 28

Índice de figuras

Figura 1. Enlaces hidrógeno entre las cadenas de colágeno ..... 4

Figura 2. Triple hélice dextrógira del tropocolágeno ..... 5

Figura 3. Reacción catalizada por P4H. .... 8

Figura 4. Dominios del procolágeno y tropocolágeno ..... 9

Figura 5. Síntesis de colágeno ..... 10

Figura 6. Interacción entre las secuencias D y superposición del N y C terminal del tropocolágeno ..... 11

Figura 7. Distribución del colágeno en el músculo esquelético..... 15

Figura 8. Enlaces divalentes (a) y trivalentes (b) en las fibras de colágeno ..... 16

Figura 9. Acción de la lisil oxidasa..... 17

Figura 10. Ejemplo de la formación de enlaces divalentes y trivalentes a partir de lisina ..... 18

Figura 11. Ejemplo de la formación de enlaces divalentes y trivalentes a partir de hidroxilisina .... 18

Figura 12. Diferencias estructurales entre la Pro MMP-1 de humano y MMP-1 de cerdo (dominio propéptido color rojo, dominio catalítico color rosa, dominio hemopoxina color verde, dominio enlazador en amarillo, iones zinc en morado y iones calcio gris)..... 22

Figura 13. Potenciómetro Orion Five Start ..... 29

Figura 14. Reacciones para la cuantificación de Hyp ..... 30

Figura 15. Soluciones patrón par la cuantificación de Hyp..... 30

Figura 16. Fibras de colágeno..... 33

Figura 17. Analizador de Imágenes de Electroforesis..... 36

Figura 18. Analizador de bandas proteicas..... 36

Figura 19. Curva de descenso de pH del músculo cuádriceps femoral de conejos raza California de 70±3 durante las 96 h *post-mortem*..... 38

Figura 20. Curva de calibración para la cuantificación de Hyp..... 41

Figura 21. Gráfico del comportamiento del colágeno total y sus fracciones del músculo cuádriceps femoral de conejos raza California de 70±3 durante las 96 h *post-mortem* ..... 41

Figura 22. Gráfico del comportamiento del porcentaje de colágeno soluble del músculo cuádriceps femoral de conejos raza California de 70±3 durante las 96 h *post-mortem* ..... 44

Figura 23. SDS PAGE al 6% de la comparación de las fibras de colágeno con respecto al tiempo bajo condiciones desnaturalizantes (urea 3.5M y SDS 10%) (Izquierda) y reductoras (urea 3.5M, SDS 10% y β-mercaptoetanol 5%) (Derecha) extraídas del músculo cuádriceps femoral de conejos raza California de 70±3 durante las 96 h *post-mortem*..... 46

Figura 24. Masa molecular aparente (kDa) de las cadenas α y β de fibras de colágeno bajo desnaturalizantes (Urea 3.5 M y SDS 10%) y condiciones reductoras (Urea 3.5 M, SDS 10% y β-

mercaptoetanol 5%) del músculo cuádriceps femoral de conejos raza California de  $70\pm 3$  durante las 96 h *post-mortem* ..... 47

Figura 25. Concentración ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de fibras de colágeno bajo desnaturalizantes (Urea 3.5 M y SDS 10%) y condiciones reductoras (Urea 3.5 M, SDS 10% y  $\beta$ -mercaptoetanol 5%) del músculo cuádriceps femoral de conejos raza California de  $70\pm 3$  durante las 96 h *post-mortem* 48

Figura 26. SDS PAGE al 6% de la comparación de la fracción soluble de colágeno con respecto al tiempo bajo condiciones desnaturalizantes (urea 3.5M y SDS 10%) (Izquierda) y reductoras (urea 3.5M, SDS 10% y  $\beta$ -mercaptoetanol 5%) (Derecha) extraídas del músculo cuádriceps femoral de conejos raza California de  $70\pm 3$  durante las 96 h *post-mortem*..... 51

Figura 27. Masa molecular aparente (kDa) de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de la fracción soluble de colágeno bajo desnaturalizantes (Urea 3.5 M y SDS 10%) y condiciones reductoras (Urea 3.5 M, SDS 10% y  $\beta$ -mercaptoetanol 5%) del músculo cuádriceps femoral de conejos raza California de  $70\pm 3$  durante las 96 h *post-mortem*..... 52

Figura 28. Concentración ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de la fracción soluble de colágeno bajo desnaturalizantes (Urea 3.5 M y SDS 10%) y condiciones reductoras (Urea 3.5 M, SDS 10% y  $\beta$ -mercaptoetanol 5%) del músculo cuádriceps femoral de conejos raza California de  $70\pm 3$  durante las 96 h *post-mortem* ..... 53

Figura 29. SDS PAGE al 6% de la comparación de la fracción insoluble de colágeno con respecto al tiempo bajo condiciones desnaturalizantes (urea 3.5M y SDS 10%) (Izquierda) y reductoras (urea 3.5M, SDS 10% y  $\beta$ -mercaptoetanol 5%) (Derecha) extraída del músculo cuádriceps femoral de conejos raza California de  $70\pm 3$  durante las 96 h *post-mortem*..... 54

Figura 30. Masa molecular aparente (kDa) de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de la fracción insoluble de colágeno bajo desnaturalizantes (Urea 3.5 M y SDS 10%) y condiciones reductoras (Urea 3.5 M, SDS 10% y  $\beta$ -mercaptoetanol 5%) del músculo cuádriceps femoral de conejos raza California de  $70\pm 3$  durante las 96 h *post-mortem*..... 55

Figura 31. Concentración ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de la fracción insoluble de colágeno bajo desnaturalizantes (Urea 3.5 M y SDS 10%) y condiciones reductoras (Urea 3.5 M, SDS 10% y  $\beta$ -mercaptoetanol 5%) del músculo cuádriceps femoral de conejos raza California de  $70\pm 3$  durante las 96 h *post-mortem* ..... 56

## Abreviaturas

%CS: Porcentaje de CS

Ala: Alanina

Arg: Arginina

Asn: Asparagina

Asp: Aspartato

C: Contenido de colágeno

CAF: Activadas por calcio

CI: Colágeno insoluble

CS: Colágeno soluble

CT: Colágeno total

CTc: Colágeno total calculado

D.S. Desviación estándar

Fe: Hierro

Gly: Glicina

Gln: Glutamina

Glu: Glutamato

h: Horas, tiempo

*h* concentración de hidroxiprolina de la curva de calibración

H: Contenido de hidroxiprolina (g/100 g)

Hyp: Hidroxiprolina

Ile: Isoleucina

kDa: Kilodaltones

Leu:Leucina

Lys: Lisina

m: Peso de la porción (g)

mL: mililitros

M: Molar

MEC: Matriz extracelular

Met: Metionina

MPM: Marcador de peso molecular

N: Normal

OTC: Complejo oligosacárido transferasa

P4H:Prolil 4-hidroxilasa

P4L:Lisil 4-hidroxilasas

PDI:Disulfuro isomerasa

Phe: Fenilalanina

Pro: Prolina

PPI: peptidil-prolil cis-trans-isomerasa

Ser: Serina

Thr: Treonina

TIMP: Inhibidores tisulares de metaloproteinasas

V: Volumen (mL)

Val: Valina



## **Dedicatorias**

A Dios por permitirme culminar una etapa más de la vida.

A mis padres, Carmen y Manuel.

A mi hermano Jesús.

A Gerardo.

A Matías.

Les agradezco todo el apoyo, la paciencia, la tolerancia y la comprensión que me brindaron durante todo este proceso. LOS AMO.

## **Agradecimientos**

A mi Comité Tutorial, Dra. Adriana Llorente Bousquets, Dr. José Francisco Montiel y Dra. Edith Ponce Alquicira por ser una guía en la elaboración de este proyecto. Pero en especial a la Dra. Llorente por su confianza y apoyo a lo largo de esta travesía.

Al MVZ Andrés Cardona Leija y MVZ Susana Elisa Mendoza Elvira por el apoyo brindado en la obtención de la materia prima utilizada en esta experimentación.

A mis compañeras y compañeros de la Sección de Medicina Preventiva por que durante esta etapa de mi vida, la llenaron de anécdotas, experiencias, sugerencias y palabras de aliento.

A mis sinodales, Dr. José Juan Martínez Maya, Dr. Carlos Gerardo García Tovar, Dra. Romina María de la Paz Rodríguez Sanoja y Dra. Adela Rodríguez Romero por sus sugerencias, comentarios y aportaciones.

A todas aquellas personas que formaron parte de este proceso directa o indirectamente.

**Esta tesis forma parte de los proyectos  
del Laboratorio 7 de Bioconservación en la Unidad de Investigación  
Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.**

**Agradezco al proyecto al proyecto DGAPA-PAPIME  
PE202010-2 “Taller de Procesos Tecnológicos y Control  
de Calidad de Productos Cárnicos” por el apoyo para la realización  
de este trabajo de tesis.**

**Agradezco al proyecto DGAPA-PAPIIT IT201312-3  
“Aplicación de alternativas de bioconservación y conservación para mejorar  
la calidad de la carne y los productos cárnicos”, por el apoyo para la  
realización de este trabajo de tesis.**

## Resumen

El colágeno es una proteína fibrosa e insoluble en agua que constituye el 95% del tejido conectivo y tiene como función el soporte y protección del músculo esquelético.

El colágeno que constituye el músculo esquelético, sufre cambios estructurales y mecánicos durante su transformación en carne. Estos cambios, favorecen el desarrollo de características de calidad como la terniza, la cual forma parte de los criterios de selección o preferencia por el consumidor.

En la presente investigación, se realizó la caracterización de los cambios que ocurren en el colágeno de conejo, desde el sacrificio y hasta las 96 horas *post-mortem*. La metodología que se utilizó, incluye la extracción y cuantificación del colágeno total y sus fracciones (soluble e insoluble) del músculo cuádriceps femoral de conejos de  $70 \pm 3$  días, de la raza California, así como la obtención de los perfiles electroforéticos, de las fracciones y fibras de colágeno, bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras.

El contenido de colágeno total con respecto al tiempo fue estadísticamente similar ( $P > 0.05$ ). En la cuantificación de colágeno insoluble a las 96 h se extrajo la menor cantidad de esta fracción lo que corresponde con el aumento en la extracción de colágeno soluble.

Los perfiles electroforéticos de las fibras de colágeno y sus fracciones soluble e insoluble, presentaron las subunidades características del colágeno, sin embargo en, el patrón del colágeno insoluble se encuentra la presencia de una banda conocida como  $\alpha_{1(III)}$ . Sin embargo, la movilidad de las subunidades del colágeno y en consecuencia la masa molecular obtenida puede deberse al método de preparación de las muestras utilizado.

## Abstract

Collagen is a fibrous protein insoluble in water which constitutes 95 % of the connective tissue, and functions to support and protect the skeletal muscle.

Collagen constitutes the skeletal muscle, undergoes structural and mechanical changes during processing into meat. These changes favor the development of quality characteristics such as tenderness, which is part of the selection criteria or preference by the consumer.

In this research, the characterization of the changes that occur in collagen rabbit from slaughter until 96 hours *post-mortem* was performed. The methodology used included the extraction and quantification of total collagen and its fractions (soluble and insoluble) from cuadriceps femoris muscle of rabbits 70  $\pm$  3 days, the California race, besides we obtained the electrophoretic profiles of fractions and collagen fibers, under denaturing and reducing conditions.

Total collagen content over time was not statistically different ( $P > 0.05$ ). In the quantification of insoluble collagen at 96 h the least amount of this fraction which corresponds to the increase in the expression of soluble collagen was extracted.

The electrophoretic profiles of the collagen fibers and soluble and insoluble fractions, presented the characteristics of collagen subunits, but in the pattern of insoluble collagen is the presence of a band known as  $\alpha 1$  (III). However, the mobility of the subunits of collagen and consequently the molecular weight can be obtained due to the method of preparation of the samples used.

## Introducción

La aceptación de la carne es definida por los consumidores con base en los criterios de terneza y jugosidad, por lo que en la actualidad se ha realizado una amplia investigación con el objeto de estudiar e identificar aquellos factores intrínsecos (raza, edad, sexo, tipo de músculo, etc.) y extrínsecos (manejo antes, durante y después del sacrificio) que están estrechamente relacionados con el desarrollo de estos atributos (Schaefer *et al.*, 2001).

A nivel del tejido muscular esquelético, la terneza dependerá de las proteínas miofibrilares y del tejido conectivo, las cuáles se caracterizan por tener estructuras y funciones diferentes. Durante la transformación de músculo en carne estas macromoléculas sufren cambios conformacionales plenamente identificados para las proteínas miofibrilares, mientras que para las del tejido conectivo se desconocen los mecanismos que favorecen estas modificaciones (Nishimura, 2010; Purslow, 2005).

El colágeno es el principal constituyente del tejido conectivo y tiene como función el soporte y protección del músculo esquelético. Esta proteína debido a su función se caracteriza por tener una estructura rígida favorecida por su composición de aminoácidos (Shoulders *et al.*, 2009; Kadler *et al.*, 1996).

Aunque se ha identificado más de 25 tipos de colágeno, en el músculo esquelético, se han encontrado colágeno tipo I y III principalmente, distribuidos en el endomisio, perimisio y epimisio (Gelse *et al.*, 2003; Shoulders *et al.*, 2009, Purslow, 2005).

La cantidad de colágeno muscular depende de la genética, nutrición, edad del animal y localización anatómica de los músculos (Boccard *et al.*, 1979; Hall *et al.*, 1982; Hunsley *et al.*, 1971), en donde se encuentra en pequeñas cantidades. Motivo por el cual, existe una controversia sobre su contribución en la terneza, además de la falta de información sobre sus modificaciones estructurales *post-mortem*, las cuales dependen varios parámetros y entre ellas el tipo de enlaces covalentes (aminas, pirrol y piridolina) que conforman las fibras de colágeno (Bailey, 1985; Light *et al.*, 1985; Eyre *et al.*, 2005).

## 1. Marco Teórico

### 1.1. Generalidades del colágeno

### 1.2. Estructura del colágeno

El colágeno está constituido por unidades de tropocolágeno (peso molecular de 300,000 a 325,000 Daltons). Cada unidad de tropocolágeno está formada por tres cadenas polipeptídicas que pueden ser homotriméricas o heterotriméricas y que contienen alrededor de 1,050 aminoácidos, las cadenas se encuentran estabilizadas por puentes de hidrógeno (Figura 1) y otras interacciones como fuerzas de van der Waals.

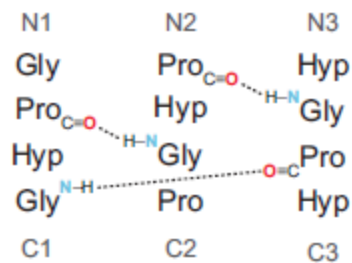


Figura 1. Enlaces hidrógeno entre las cadenas de colágeno

Gly: Glicina, Pro: Prolina e Hyp: Hidroxiprolina

Fuente: Shoulder *et al.*, 2009

El tropocolágeno se caracteriza por estar constituido por el triplete Gly-Xaa-Yaa, donde la posición Xaa y Yaa puede ser cualquier aminoácido, aunque frecuentemente son prolina (Pro) e hidroxiprolina (Hyp) (Figura 2); aminoácidos que se caracterizan por su hidrofobicidad (las fibras de colágeno son insolubles en agua) y por favorecer la formación de giros  $\beta$ , por lo que, al enrollarse entre sí cada cadena, se forma una hélice levógira conocida como hélice de colágeno, conformación en la que por cada 3.3 residuos de aminoácidos da un giro. En el enrollamiento de tropocolágeno, tres de estas cadenas se ensamblan formando

una triple hélice dextrógira, en la cual se localiza en el centro los residuos de glicina (Figura 1) (Kadler *et al.*, 1996; van der Rest *et al.*, 1991; Shoulders *et al.*, 2009).

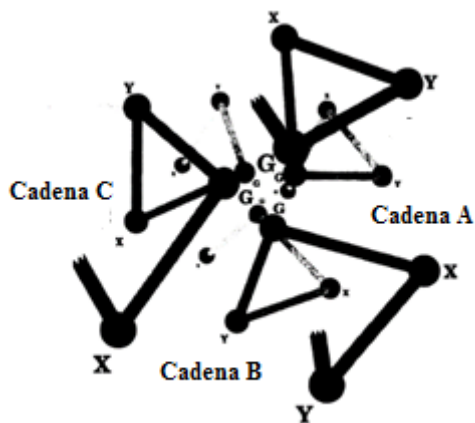


Figura 2. Triple hélice dextrógira del tropocolágeno

Fuente: Modificado de van der Rest *et al.*, 1991

Las unidades de tropocolágeno, se agrupan paralelamente y se unen formando las fibras de colágeno. (Shoulders *et al.*, 2009; Gelse *et al.*, 2003).

### 1.2.1. Tripletas de la hélice colágeno

La conformación de la triple hélice en el colágeno depende de los aminoácidos que se localizan en la posición Xaa y Yaa del triplete Gly-Xaa-Yaa, lo que resulta en la presencia de al menos 400 combinaciones de tripéptidos diferentes.

En 1998, Ramshaw y colaboradores utilizaron 4040 tripletas provenientes de 14 cadenas de diferentes tipos de colágeno de humano con lo que construyeron una tabla con el objetivo de identificar los residuos que se localizan principalmente en la posición X, Pro, Gln y Ala y en la posición Y, Hyp, Lys, Ala y Asp. El triplete de mayor frecuencia Gly-Pro-Hyp, con el 10.5% (Cuadro 1).



Cuadro 1. Frecuencia de la presencia de aminoácidos en los tripletes de colágeno

X \ Y	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	O	Q	R	S	T	V	W	Y
A	0.9		0.5						1.2			0.3	3.4	0.4	1.1	0.4		0.4		
C																				
D	0.4		0.3						1				1.5	0.5	1.2	0.3		0.3		
E	1.2		0.4					0.4	2.5		0.3	0.3	2.8	0.8	2.7	0.3	0.6	0.4		
F													2.5	0.3						
G									0.3				0.3							
H													0.5							
I	0.4								0.3				1.5							
K			0.5										1.4							
L	0.5		0.4						1				5.5	0.7	0.6		0.3			
M													0.6							
N													0.7							
P	3.4		0.4	0.4				0.9	2.7	0.5	0.4	0.3	10.5	2.5	2.6	1.4	0.8	1.3		
Q	0.3								0.6				1.1	0.3	0.3					
R	0.3		0.5										1.1							
S	0.4								0.4				2.3		0.5					0.3
T													0.8							
V									0.5				1.1	0.3						
W																				
Y													0.5							

Frecuencia de la presencia de aminoácidos en los tripletes que constituyen las cadenas de colágeno Cuadros blancos. Tripletes con una frecuencia > 10 veces (más del 0.25%). Cuadros grises de 3 a 10 veces (del 0.075% al 0.25% de los tripletes). Cuadros negros < 3 veces (porcentaje menor al 0.075%).

Sistema de nomenclatura de los aminoácidos de una y tres letras en cada uno: A-Ala-Alanina, C-Cys-Cisteína, D-Asp-Aspartato, E-Glu-Glutamato, F-Phe-Fenilalanina, G-Gly-Glicina, H-His-Histidina, I-Ile-Isoleucina, K-Lys-Lisina, M-Met-Metionina, N-Asn-Asparagina, O-Hyp-Hidroxiprolina, Q-Gln-Glutamina, R-Arg-Arginina, S-Ser-Serina, T-Thr-Treonina, V-Val-Valina, W-Trp-Triptófano, Y-Tyr-Tirosina

Fuente: Modificado de Ramshaw *et al.*, 1998

Posteriormente, Bhattacharjee y colaboradores (2005) realizaron un estudio para identificar aquellos residuos que podían encontrarse a lo largo de una cadena de colágeno en la posición X y Y, lo que demostró que dependiendo del tipo de colágeno y las cadenas que lo constituyen, será la secuencia de aminoácidos y en consecuencia tendrán o no una estructura fibrilar (Cuadro 2).

Cuadro 2. Frecuencia con la que los aminoácidos pueden localizarse en la posición X o Y de la secuencia de las cadenas de colágeno del tipo I al IV

Aminoácidos	Tipo I	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV
	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 1$	$\alpha 1$	$\alpha 1$
Ala	eq	eq	eq	eq	eq
Arg	Y	Y	Y	Y	Y
Asn	eq	eq	eq	Y	X
Asp	eq	eq	eq	Y	X
Gln	Y	Y	Y	eq	eq
Glu	X	X	X	X	X
Ile	eq	eq	X	X	X
Leu	X	X	X	X	X
Lys	Y	Y	Y	Y	Y
Met	Y	Y	Y	X	Y
Phe	X	X	X	X	X
Pro/Hyp	eq	eq	eq	eq	Y
Ser	eq	eq	Y	X	X
Thr	Y	Y	Y	eq	X
Val	eq	Y	eq	eq	eq

eq. Indica que el aminoácido, se puede encontrar en la posición X y Y

Fuente: Bhattacharjee *et al.*, 2005

En general, la estructura del colágeno depende de los aminoácidos que lo conforman. El 30 por ciento de esta molécula está constituida por glicinas que ocupa el tercer lugar en el triplete, lo que conlleva a que al plegarse en sus estructuras secundarias, terciarias y cuaternaria, se localicen en el centro de la super hélice. La hidroxiprolina es el residuo de aminoácido producto de la hidroxilación de la prolina que incrementa la estabilidad térmica del colágeno, debido a las interacciones con los residuos de las cadenas adyacentes, siempre y cuando esté en la posición Y del triplete (Ramshaw *et al.*, 1998). Por último, en la posición X del triplete del colágeno se encuentra el residuo de prolina, que en la triple hélice se localiza expuesta en la superficie de ésta.

### 1.3. Síntesis de colágeno

La síntesis de colágeno se lleva a cabo en los fibroblastos y se caracteriza por la hidroxilación de prolina y lisina y la glicosilación de hidroxilisina con galactosas y glucosas, etapas que a continuación se describirán para el colágeno tipo I (colágeno fibrilar) y que son cruciales en la formación de los enlaces precursores de la estabilidad del colágeno.

1. Síntesis de las cadenas pro- $\alpha$  por traslocación cotraduccional
2. Hidroxilación de los residuos de prolina y de lisina que constituyen las cadenas pro- $\alpha$  por las enzimas prolil 3-hidroxilasa, prolil 4-hidroxilasa (P4H), y lisil hidroxilasa (L4H) (cofactores:  $\text{Fe}^{2+}$ , 2-oxoglutarato,  $\text{O}_2$  y ácido ascórbico) a 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina y 4-hidroxilisina, respectivamente (Figura 4). La función de la 3-hidroxiprolina se desconoce pero la 4-hidroxiprolina es esencial para la formación de los puentes de hidrógeno que estabilizan las cadenas, mientras la 4-hidroxilisina interviene en la síntesis de enlaces covalentes intra e intermoleculares.

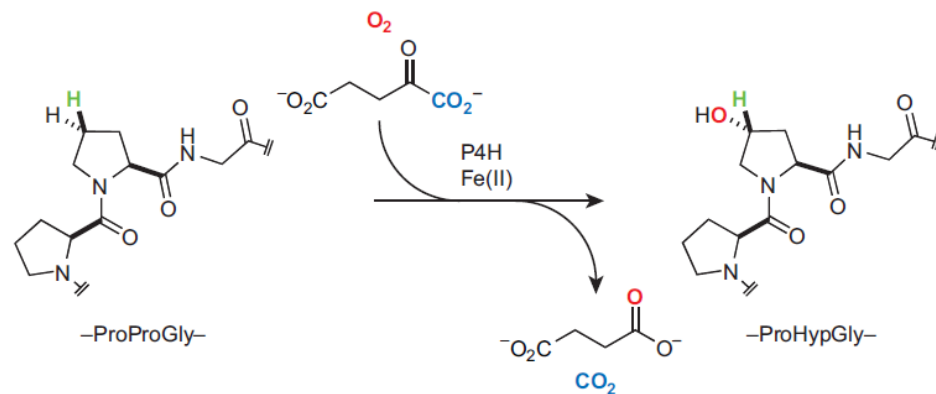


Figura 3. Reacción catalizada por P4H.

Fuente: Shoulder *et. al.*, 2009

3. Una vez que se forma la 4-hidroxilisina, se unen a ella por la acción de la galactosil

transferasa y la galactosilhidrosil-glicosil transferasa los residuos de galactosa y glucosa, respectivamente, lo que facilitan, el transporte de la cadena pro- $\alpha$  por medio de vesículas al aparato de Golgi.

4. En el aparato de Golgi se ensamblan tres cadenas pro- $\alpha$  formando una triple hélice, lo que es facilitado por la estructura globular del C-propéptido y la interacción con el complejo oligosácarido transferasa (OTC) y la enzima disulfuro isomerasas (PDI) que se encarga de formar los enlaces disulfuro intercatenarios; así como la peptidil-prolil cis-trans-isomerasa (PPI) que convierte los residuos de Pro cis en trans y la chaperona HSP47 que se localizan en el N-propéptido, favorecen la formación y plegado de las cadenas para conformar el procolágeno.

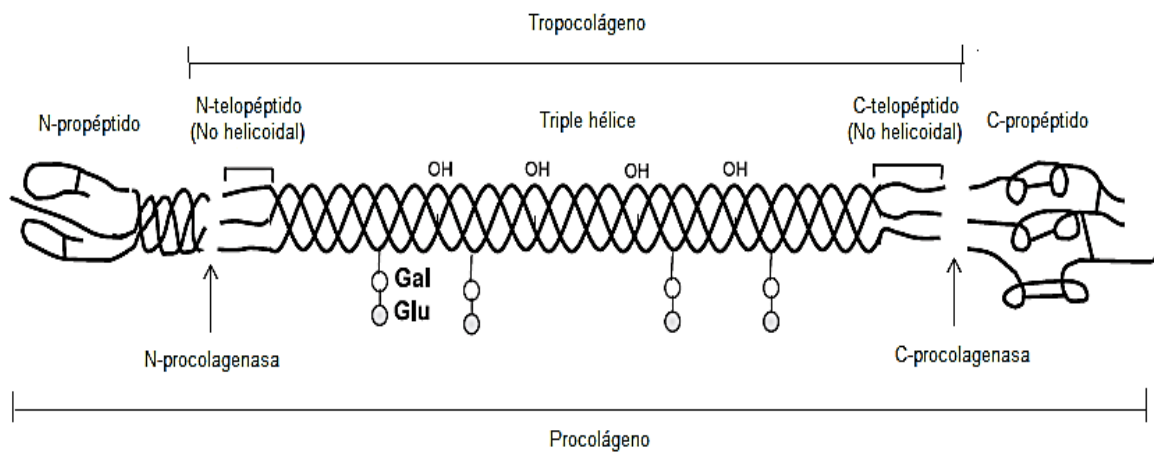


Figura 4. Dominios del procolágeno y tropocolágeno

*C terminal*. Dominio globular conformado por enlaces disulfuro inter e intracatenarios y sitio de nucleación de las cadenas pro- $\alpha$  para su plegamiento. *C telopéptido* y *N telopéptido*. Dominios sin triple hélice, conocidos como no colagenosos o no helicoidales que favorecen la formación de enlaces entrecruzados. *Helicoidal*. Dominio del triple hélice, caracterizado por la presencia de puentes de hidrógenos inter e intracatenarios y otras interacciones entre sus aminoácidos hidrofóbicos, lo que genera la formación de una hélice levógira de alrededor de 300nm. *N terminal*. Dominio globular con enlaces disulfuro intra catenarios y sitio de finalización del ensamble de las cadenas pro- $\alpha$  (Shoulder *et al.*, 2009; Kadler *et al.*, 2007; Canty *et al.*, 2005; Koivu 1987a y 1987b; Kühn, 1985)

Fuente: Modificado de Gelse *et. al.*, 2003

5. Secreción del procolágeno al exterior de la célula. Eliminación de las extensiones peptídicas de la molécula de procolágeno por acción de las procolágeno proteinasas

(N-.procolagenasa y C-procolagenasa), formándose la molécula de tropocolágeno (Figura 4).

- Las moléculas de tropocolágeno se unen, formando las fibras de colágeno.(Shoulder *et al.*, 2009; Kadler *et al.*, 2007; Canty *et al.*, 2005; Gelse *et al.*, 2003; Kadler *et al.*, 1996) (Figura 5)

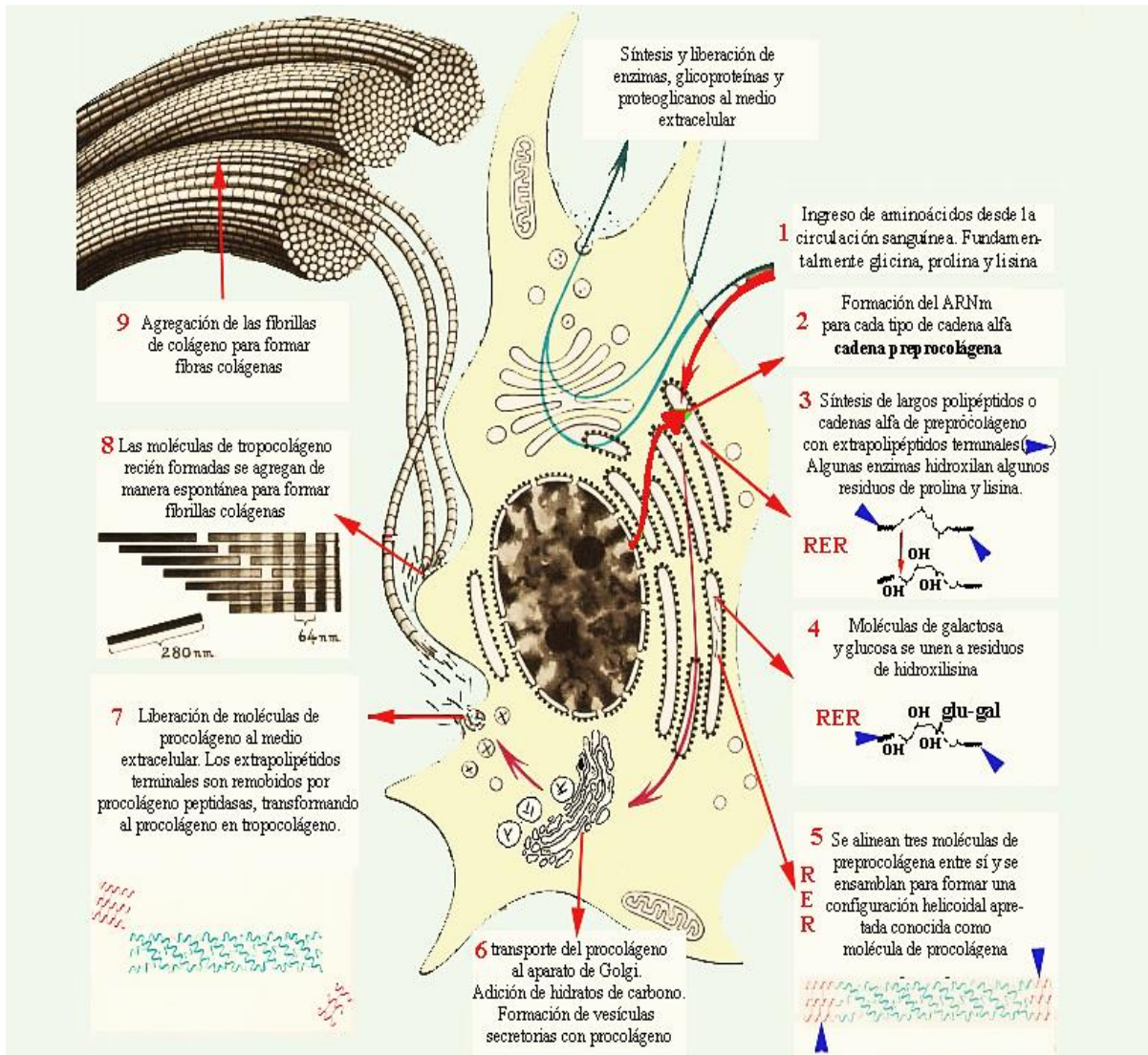


Figura 5. Síntesis de colágeno

Fuente: <http://www.ht.org.ar/histologia/NUEVAS%20UNIDADES/unidades/unidad3/sincola.htm>

### 1.3.1. Formación de fibrillas de colágeno

En la formación de fibras, el tropocolágeno se agrega de acuerdo a la distribución de los aminoácidos, los cuales se dividen en periodos denominados D1, D2, D3 y D4 con una longitud de 67 a 70 nm, disposición que da lugar al patrón estriado que se observa al microscopio (Figura 6).

La interacción entre estas secuencias favorece la superposición del N terminal de una unidad de tropocolágeno con el C terminal de otra unidad en una longitud de 30 nm, asociación en la que se forman enlaces covalentes amina (aldimina y cetoamina) (Mc Cormick, 1999; Kadler *et al.*, 1996; Kühn, 1985).

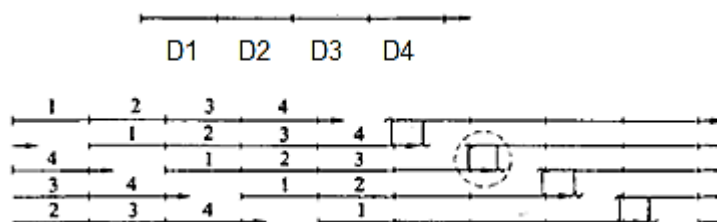


Figura 6. Interacción entre las secuencias D y superposición del N y C terminal del tropocolágeno

Fuente: Kühn, 1985

### 1.4. Tipos de colágeno

A inicios del siglo XX, se identificaron diferentes tipos de colágeno, y se le definió al colágeno como una proteína estructural de matriz extracelular (MEC) que contiene uno o más dominios con una conformación de triple hélice (van der Rest *et al.*, 1991). El colágeno es una familia de proteínas, las cuales debido a la diversidad en sus características estructurales han sido denominados con números romanos, además de ser clasificados en fibrilares y no fibrilares, dependiendo de la presencia o no del dominio helicoidal (Cuadro 3).

Cuadro 3. Clasificación de los tipos de colágeno, su composición y distribución

Tipo	Composición	Distribución
<i>Fibras formadoras de colágeno</i>		
I	$[\alpha_1(\text{I})_2 \alpha_2(\text{I})]$	Hueso, pie, tendón, ligamentos, córnea y músculo
II	$[\alpha_1(\text{II})_3]$	Cartílago, cuerpo vítreo
III	$[\alpha_1(\text{III})_3]$	Piel, pared de los vasos y fibras reticulares de la mayoría de los tejidos como el músculo
V	$\alpha_1(\text{V}), \alpha_2(\text{V}), \alpha_3(\text{V})$	Pulmón, córnea, huesos y membranas fetales
XI	$\alpha_1(\text{XI}), \alpha_2(\text{XI}), \alpha_3(\text{XI})$	Cartílago y cuerpo vítreo
<i>Colágeno de la membrana basal</i>		
IV	$[\alpha_1(\text{IV})_2 \alpha_2(\text{IV})]; \alpha_1 - \alpha_6$	Membranas basales
<i>Colágeno microfibrilar</i>		
VI	$\alpha_1(\text{VI}), \alpha_2(\text{VI}), \alpha_3(\text{VI})$	Dermis, cartílago, placenta, pulmones, pared del vaso
<i>Colágeno hexagonal que forma redes</i>		
VIII	$[\alpha_1(\text{VIII})_3]$	Células endoteliales
X	$[\alpha_3(\text{X})_3]$	Cartílago hipertrófico
<i>Fibrillas de anclaje</i>		
VII	$[\alpha_1(\text{VII})_3]$	Piel, mucosa y cérvix
<i>Fibras asociados a colágeno con triple hélice interrumpida (FACIT por sus siglas en inglés)</i>		
IX	$\alpha_1(\text{IX}), \alpha_2(\text{IX}), \alpha_3(\text{IX})$	Cartílago y córnea
XII	$[\alpha_1(\text{XII})_3]$	Tendón, ligamentos
XIV	$[\alpha_1(\text{XIV})_3]$	Dermis, tendón, placenta e hígado
XIX	$[\alpha_1(\text{XIX})_3]$	Rabdomiosarcoma humano
XX	$[\alpha_1(\text{XX})_3]$	Piel, cartílago, tendón
XXI	$[\alpha_1(\text{XXI})_3]$	Pared del vaso sanguíneo
<i>Colágenos de transmembrana</i>		
XIII	$[\alpha_1(\text{XIII})_3]$	Epidermis, endomisio, intestino,
XVII	$[\alpha_1(\text{XVII})_3]$	Uniones dermo-epidérmicas
<i>Multiplexinas</i>		
XV	$[\alpha_1(\text{XV})_3]$	Fibroblastos, páncreas
XVI	$[\alpha_1(\text{XVI})_3]$	Fibroblastos
XVIII	$[\alpha_1(\text{XVIII})_3]$	Pulmones e hígado

Fuente: Mayne *et al.*, 1993; Gelse, *et al.*, 2003; Shoulders, *et al.*, 2009







- a) *Fibras formadoras de colágeno*. Se caracterizan por su capacidad de agruparse y ensamblarse de forma escalonada
- b) *Colágenos de la membrana basal*. El colágeno tipo IV, como bien el nombre de este grupo lo dice, constituye la membrana basal y se caracteriza por tener interrupciones en la formación del triplete característico del colágeno, lo que genera la formación de triples hélices flexibles
- c) *Colágeno microfibrilar*. El colágeno tipo VI, es el único que se encuentra dentro de este grupo, debido a la formación de una triple hélice corta y terminales globulares largas
- d) *Colágeno hexagonal que forma redes*. Se caracteriza por tener una triple hélice corta y en consecuencia su interacción es hexagonal
- e) *Fibrillas de anclaje*
- f) *FACIT's*. Son fibrillas asociadas a colágeno con triple hélice interrumpida, lo que se debe a la presencia de dominios no coloidales y como bien lo dice, su asociación a la superficie de otras fibras (Cuadro 3)
- g) *Colágenos de transmembrana*
- h) *Multiplexinas*. Presentan múltiples dominios helicoidales con interrupciones

En general, dependiendo de la función y localización de los tejidos será el tipo de colágeno presente, por ejemplo, el músculo esquelético está conformado principalmente por los colágenos fibrilares, pero en mayor proporción el tipo I y III. El colágeno tipo I está constituido por tres cadenas del mismo tamaño, dos de ellas idénticas  $\alpha_1$  y otra ligeramente distinta  $\alpha_2$  (heterotrimérico) y se localiza en el endomisio, perimisio y epimisio del músculo (Bailey, 1985; Light *et al.*, 1985) (Cuadro 4).



El colágeno de tipo III está formado por tres cadenas idénticas  $\alpha_1$  (homotrimérico), y tiene la peculiaridad de que en su carboxilo terminal las tres cadenas no están agrupadas en forma de hélice, sino unidas entre ellas por enlace disulfuro; es característico del perimisio, endomisio y en pequeñas concentraciones en algunos músculos en el epimisio (Light *et al.*, 1985; Burson *et al.*, 1986).

Cuadro 4. Imágenes al microscopio electrónico de algunos tipos de colágeno

Tipo de colágeno	Imagen al microscopio electrónico
I,II,III,V y XI	
IX, XII y XIV	
IV	
VI	
VII	
VIII y X	

Fuente: Modificado de van der Rest *et al.*, 1991

### 1.5. Distribución del colágeno en el músculo esquelético

El colágeno en el músculo esquelético lo constituyen el endomisio, el perimisio y el epimisio, también conocido como tejido conectivo intramuscular (IMCT por sus siglas en inglés) (Figura 7). El endomisio es una capa de redes de fibras de colágeno en forma de vaina que envuelve las fibras musculares.

El perimisio rodea un conjunto de fibras musculares y se caracteriza por estar conformado por un haz de fibras de colágeno con patrón ondulado y conforma el 90% del colágeno intramuscular.

El epimisio agrupa los conjuntos de fibras musculares que constituyen el músculo, por lo que también se le conoce como fascia y está constituido por varias capas de fibras de colágeno acomodado en forma de hojas (Nishimura, 2010; Purslow, 2005).

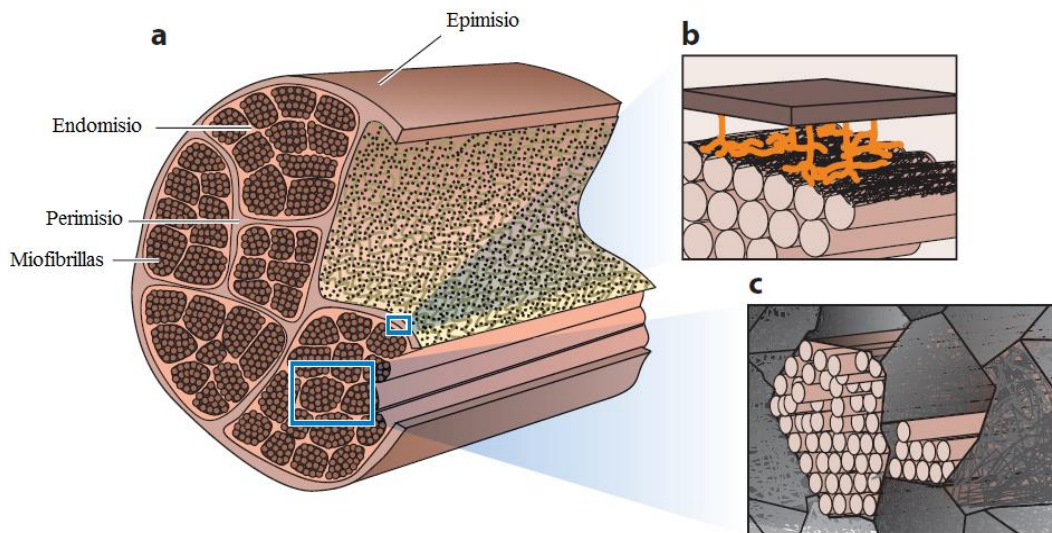


Figura 7. Distribución del colágeno en el músculo esquelético

a) Distribución del endomisio, perimisio y epimisio. b) Perimisio c) Endomisio agrupa a las miofibrillas como una red en forma de panal

Fuente: Modificado de Purslow, 2014

### 1.6. Enlace entrecruzados del colágeno

La estabilidad de la estructura del colágeno en parte se debe a los enlaces entrecruzados que se forman conforme avanza la edad de un animal. En el nacimiento se encuentran enlaces inmaduros o divalentes (entre dos moléculas de tropocolágeno) que sufren cambios estructurales y conformacionales durante la maduración de la carne mientras que al aumentar la edad se favorece la formación de enlaces maduros o trivalentes (entre tres moléculas de colágeno) que difícilmente son degradados durante la maduración de la carne o hidrolizados en la cocción, reflejándose en la terneza de la carne (Purslow *et al.*, 2012; Nishimura, 2010; Weston *et al.*, 2002; McCormick, 1999; Bailey, 1985) (Figura 8).

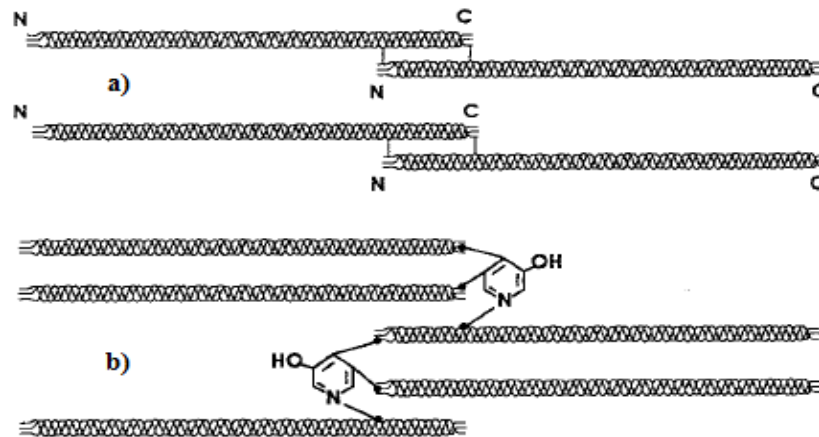


Figura 8. Enlaces divalentes (a) y trivalentes (b) en las fibras de colágeno

Fuente: Mc Cormick, 1999

En el espacio extracelular, los residuos de lisina e hidroxilisina que se encuentran en el N y C terminal de la unión escalonada del tropocolágeno (telopéptido) por acción de la enzima lisil oxidasa por desaminación, produce alisina e hidroxialisina (Figura 9) (con un grupo aldehído). Estos compuestos, en la formación de fibrillas de colágeno por la interacción con los residuos de lisina (Figura 10) e hidroxilisina (Figura 11) del dominio helicoidal de otra

molécula de tropocolágeno forman enlaces covalentes por dos vías: alisina con la formación de enlaces aldimina (Base de Schiff) (ejemplo Hidroxilisino norleucina) e hidroxialisina con la producción de enlaces cetoamina (por modificación de Amadori) (ejemplo Lisino cetonorleucina) (Eyre *et al.*, 2005; Mc Cormick, 1999; Siegel, 1976).

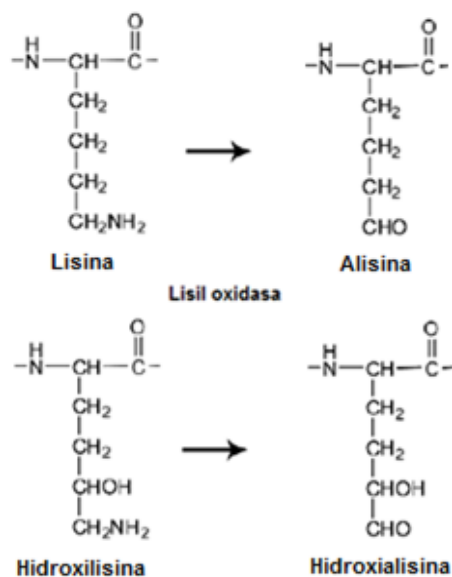


Figura 9. Acción de la lisil oxidasa

Fuente: Modificado de Hulmes, 2008

En la formación de enlaces trivalentes, los enlaces divalentes interactúan entre sí o con otros aminoácidos de un tercer tropocolágeno. Por ejemplo, los enlaces aldimina reaccionan con un residuo de histidina del dominio helicoidal mientras que los enlaces cetoaminas forman enlaces pirrol y piridolina (Figuras 10 y 11) (Eyre *et al.*, 2005; Mc Cormick, 1999; Siegel, 1976). Por otra parte, existen enlaces covalentes intracatenarios generados por la condensación aldólica de dos alisinas del telopéptidos con una histidina e hidroxialisina del dominio helicoidal (Yamauchi *et al.*, 2008).

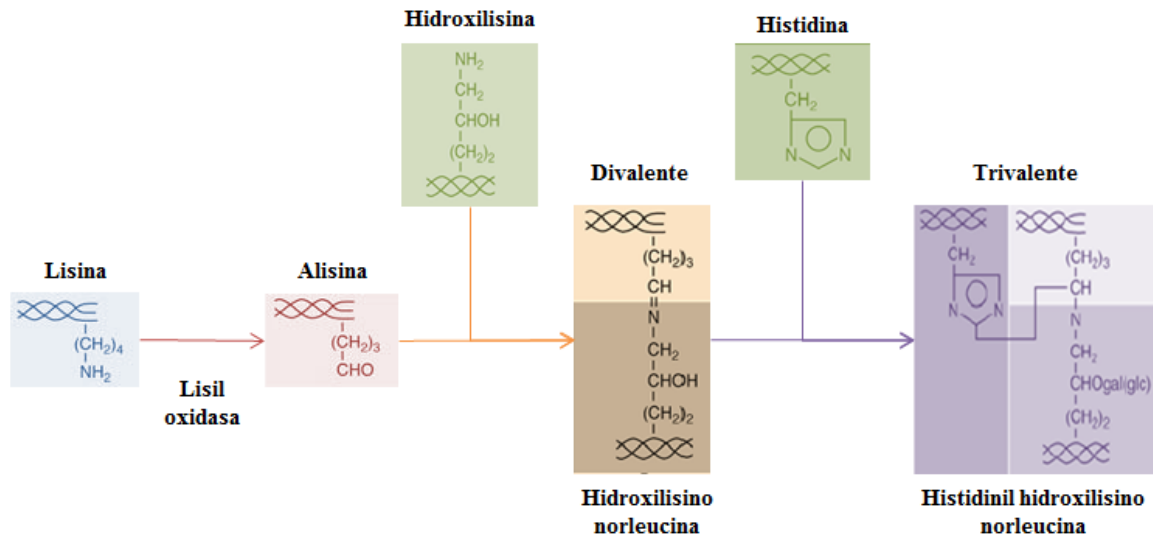


Figura 10. Ejemplo de la formación de enlaces divalentes y trivalentes a partir de lisina

Fuente: Modificado de Eyre *et al.*, 2005

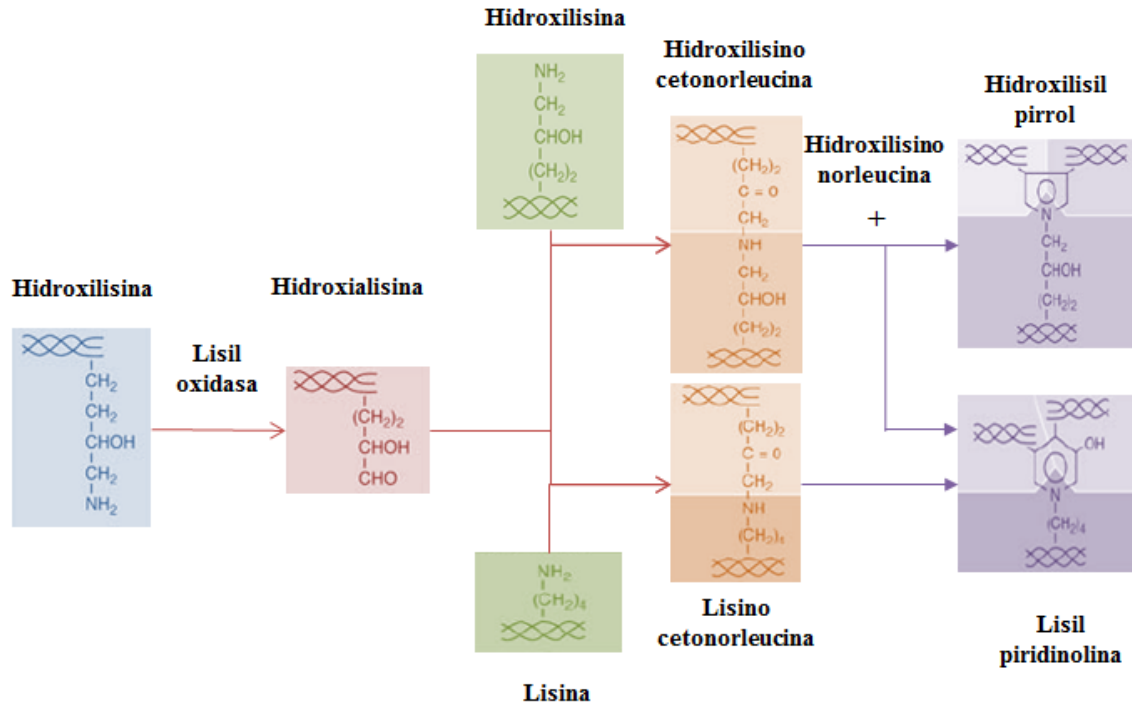


Figura 11. Ejemplo de la formación de enlaces divalentes y trivalentes a partir de hidroxilisina

Fuente: Modificado de Eyre *et al.*, 2005

### 1.7. Efecto del colágeno en la ternera

La ternera es un atributo de calidad de la carne y es un elemento de selección y aceptación para el consumidor (Weston *et al.*, 2002; Sentandreu *et al.*, 2002). El desarrollo de la ternera depende de diversos factores como lo son el manejo antes, durante y después del sacrificio así como de la genética y fisiología de los animales y el tipo de músculo, las cuáles condicionan el valor de pH y en consecuencia la presencia de carne normal, dura (DFD por sus siglas en inglés Obscura, Firme y Seca) o suave (PSE por sus siglas en inglés Pálida, Suave y Exudativa) (Silva *et al.*, 1999).

La carne está constituida por tres tipos de proteínas: sarcoplásmicas, miofibrilares y del tejido conectivo. La ternera de la carne se relaciona principalmente con los cambios estructurales de las proteínas miofibrilares durante la maduración. Sin embargo, las proteínas del tejido conectivo, en especial el colágeno, tienen cierta contribución a este atributo. Por ejemplo, la diferencia entre cortes de carne en cuanto a ternera depende del contenido de colágeno y la composición de las fibras musculares y su interacción. Aquellos cortes que provienen de músculos encargados del sostén se caracterizan por ser más tiernos y tener menor contenido de colágeno en comparación con los cortes provenientes de músculos de movimiento (Torrescano *et al.*, 2003). O bien la carne proveniente de animales adultos en comparación con la de los jóvenes, por la formación de enlaces maduros en las fibras de colágeno presenta mayor estabilidad al calor y mayor fuerza de corte durante la masticación, reflejándose en menor ternera, sin importar el tipo de músculo de donde proceda (Nishimura, 2010; Purslow, 2005; Weston *et al.*, 2002; Bailey, 1985).

Durante la transformación de músculo en carne, el colágeno sufre modificaciones estructurales, las causas de estos cambios son desconocidas puesto que se le ha dado mayor importancia a su evolución durante la cocción, ya que cuando se eleva la temperatura el colágeno tiende a gelatinizarse (desnaturalización-solubilización) sin embargo, el aumento de la ternera dependerá del tipo de enlaces (inmaduros o maduros) así como el método, tiempo y temperatura de cocción (Chang *et al.*, 2011; Powell *et al.*, 2002).

## 1.8. Solubilidad del colágeno

Existen investigaciones en diversos músculos principalmente provenientes de bovino, donde se determina el efecto de la raza, sexo, edad y maduración en la solubilidad del colágeno (Mills *et al.*, 1989a; Mills *et al.*, 1985b; Wu *et al.*, 1982; Boccard *et al.*, 1979; Prost *et al.*, 1975).

Durante la transformación del músculo en carne, el colágeno sufre cambios que favorecen la generación de una fracción soluble, sin embargo, los mecanismos, reacciones o naturaleza que genera este evento son desconocidos y para poder elucidar y entender las causas de estas modificaciones estructurales varios autores han mencionado algunas de las enzimas que pueden estar relacionadas con este fenómeno.

### 1.8.1. Calpaínas

Las calpaínas son un sistema enzimático activado por calcio. Estas enzimas intracelulares neutras, se clasifican de acuerdo con sus requerimientos de calcio en  $\mu$ -Calpaína,  $\mu$ /m-Calpaína, m-Calpaína y Calpastatinas. Las calpastatinas actúan como inhibidores de las calpaínas. Este sistema enzimático degrada principalmente las proteínas miofibrilares (Kemp *et al.*, 2010; Sentandreu *et al.*, 2002). Mills y sus colaboradores (1989a) atribuyen que la solubilidad del colágeno durante las primeras 8 h *post-mortem* es debida a la acción proteolítica de estas proteasas activadas a pH neutro como las CAF (por sus siglas en inglés, Calcium Activated Factor) (activadas por calcio) o calpaínas.

### 1.8.2. Catepsinas

Las catepsinas son enzimas lisosomales activadas a pH ácidos. En el músculo esquelético se encuentran las catepsinas B, L, H, S, F, K (Cisteína peptidasas) y D (Aspártico peptidasas) (Kemp *et al.*, 2010; Sentandreu *et al.*, 2002).

*Catepsina B1.* Burghley y sus colaboradores (1974) identificaron que esta catepsina se relaciona con la desnaturalización de las fibras de colágeno mientras que Etherington (1976), encontró que su actividad colagenolítica disminuye a pH de 6.0, ambos investigadores comentan que esta enzima escinde en el telopéptido del tropocolágeno.

*Catepsina D.* Dingle (1973) y colaboradores (1971) mencionan que en cartílago la catepsina D está relacionada con la degradación de proteoglicanos.

Wu y colaboradores (1982) tras los resultados obtenidos al investigar el efecto del tiempo y temperatura en el colágeno intramuscular del largo dorsal de bovinos, describieron que probablemente los cambios en el colágeno se deben a la acción de las catepsinas D y B1, por lo que ellos mencionan que estas enzimas degradan el colágeno liberando sus componentes al romper las interacciones que estabilizan la molécula. En 1992, el grupo de investigadores encabezados por Beltrán, al comparar la degradación de colágeno por la catepsinas B y L, encontraron que la catepsina B presenta mayor actividad colagenolítica que la catepsina L (lo que se debe a la dependencia de la presencia de iones calcio).

*Catepsina K.* En la investigación realizada por Sentandreu y colaboradores (2002), mencionan que la catepsina K tiene una alta actividad colagenolítica con un pH de 6.0 a 6.5. En 2011, Bromme y Wilson describen que las catepsinas degradan el telopéptido y que la catepsina K es la excepción a la regla, debido a que esta enzima se une con algún glucosaminoglicano de la MEC como el condroitín sulfato y escinde enlaces peptídicos en la región helicoidal, la formación de este complejo depende del tipo y cantidad de los glucosaminoglicanos en la MEC.

### 1.8.3. Otras proteínas lisosomales

Wu y colaboradores (1982), dentro de su discusión mencionan que otras proteínas lisosomales como la hialuronidasa,  $\beta$ -glucuronidasa y  $\beta$ -galactosidasa degradan algunos componentes de la matriz del colágeno y pueden estar relacionados con su degradación.



Por el contrario Dingle (1973) menciona que la enzima hialuronidasa no juega un papel importante en la degradación de la matriz del colágeno.

En 2010, Nishimura menciona que los componentes de la matriz extracelular del colágeno son degradados *in vitro* por enzimas lisosomales y colagenasas, por lo que sugiere que los cambios conformacionales durante la maduración podrían deberse a la acción de las glucosidasas lisosomales que degradan los proteoglicanos que se encargan de estabilizar y rodear las fibras de colágeno, dejándolas expuestas y en consecuencia facilitando la degradación por las colagenasas, sin embargo comenta que el tipo y cantidad de proteoglicanos en el colágeno son importantes para determinar el nivel de susceptibilidad de su degradación.

#### 1.8.4. Metaloproteinasas

Las MMP (metaloproteinasas de matriz) son enzimas dependientes de calcio que contienen zinc en su estructura y dominio catalítico, encargadas de la degradación de los constituyentes de las MEC (matriz extracelular) (Figura 12). Enzimas secretadas por los fibroblastos como pro MMP (zimógeno) o MMP inactiva y reguladas por las TIMP (por sus siglas en inglés, Tissue Inhibitors of Metaloproteinasas) (Purslow *et al.*, 2012; Balcerzak *et al.*, 2001)

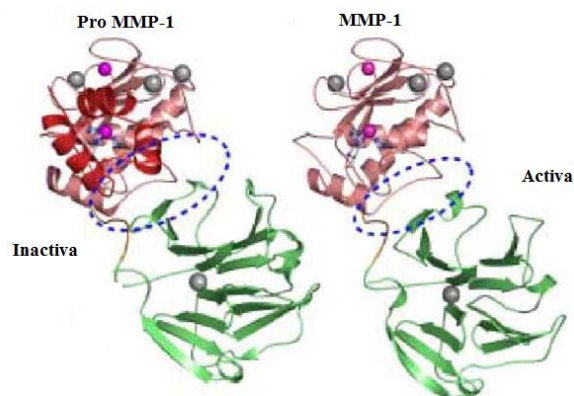


Figura 12. Diferencias estructurales entre la Pro MMP-1 de humano y MMP-1 de cerdo (dominio propéptido color rojo, dominio catalítico color rosa, dominio hemopoxina color verde, dominio enlazador en amarillo, iones zinc en morado y iones calcio gris)

Fuente: Modificado de Nagase *et al.*, 2006

Se conocen 23 MMP que son divididas en 6 grupos de acuerdo con el sustrato que degradan (Cuadro 5) (Snoek Van *et al.*, 2005).

Cuadro 5. Subgrupos de las MMP

Subgrupo	MMP	Nombre común	Sustrato
<b>Colagenasas</b>	MMP-1	Colagenasas 1	Col I, II, III, VII, VIII, X, gelatin
	MMP-8	Colagenasas 2	Col I, II, III, VII, VIII, X, gelatin
	MMP-13	Colagenasas 3	Col I, II, III, IV, IX, X, XIV, gelatina
<b>Gelatinasas</b>	MMP-2	Gelatinasas A	Gelatina, Col I, II, III, IV, VII, X
	MMP-9	Gelatinasas B	Gelatina, Col IV, V
<b>Estromelisinina</b>	MMP-3	Estromelisinina 1	Col II, IV, IX, X, XI, gelatina
	MMP-10	Estromelisinina 2	Col IV, laminina, fibronectina, elastina
	MMP-11	Estromelisinina 3	Col IV, fibronectina, laminina
<b>Matrilisinina</b>	MMP-7	Matrilisinina 1	Fibronectina, laminina, Col IV, gelatina
	MMP-26	Matrilisinina 2	Fibrinogena, fibronectina, gelatina
<b>MMT-MMP</b>	MMP-14	MMT1-MMP	Gelatina, fibronectina, laminina
	MMP-15	MMT2-MMP	Gelatina, fibronectina, laminina
	MMP-16	MMT3-MMP	Gelatina, fibronectina, laminina
	MMP-17	MMT4-MMP	Fibrinogena, fibrina
	MMP-24	MMT5-MMP	Gelatina, fibronectina, laminina
	MMP-25	MMT6-MMP	Gelatina
<b>Otros</b>	MMP-12	Metaloproteinasas macrófago	Elastina, fibronectina, Col IV
	MMP-19	-	Aggrecana, elastina, fibrillina, Col IV, gelatina
	MMP-20	Enamelisinina	Aggrecana,
	MMP-21	XMMP	Aggrecana,
	MMP-23	-	Gelatina, caseina, fibronectina
	MMP-27	CMMP	-
	MMP-28	Epilisinina	-

Fuente: Snoek-Van, *et al.*, 2005

A finales del siglo pasado, se empezaron a realizar investigaciones para identificar el efecto de las metaloproteinasas en la molécula de colágeno, hoy en día se sabe que existen cambios conformacionales durante la transformación de músculo en carne pero se desconoce la contribución de la actividad de estas enzimas (Purslow, 2012; Nishimura, 2010; Sylvestre *et al.*, 2002 Mills, et al., 1989a y b). Sin embargo, Bromme y Wilson (2011) mencionan que estas las metaloproteinasas escinden en el dominio helicoidal del tropocolágeno por la interacción con el dominio hemopoxina.

Mills y colaboradores (1989a y b) estudiaron el comportamiento del colágeno soluble durante las primeras 24 h *post-mortem* del músculo infraespinoso de bovino y observaron que durante las primeras 8 h tras el sacrificio se da un incremento paulatino de la solubilidad del colágeno, lo que ellos atribuyen a la acción proteolítica de proteasas con actividad a pH neutros como las colagenasas, lo que podría explicar el descenso en la modificación estructural del colágeno al disminuir el pH en el sistema cárnico

En 2002, Sylvestre y colaboradores, mencionaron que este tipo de enzimas degradan el colágeno en todos los tejidos, por lo que para poder identificar si existe algún efecto en el colágeno intramuscular compararon la actividad de la MMP-2 inactiva y activa en el músculo largo dorsal y semimembranoso, al día 0 y 21 días *post-mortem* y observaron que existía mayor presencia de pro MMP-2 en el día 0 en comparación con el día 21, lo que resalta que durante este tiempo algún factor como el pH genera la activación de las enzimas y probablemente los cambios conformacionales en el colágeno se deben a estas metaloproteinasas.

En años más recientes, Purslow y colaboradores (2012) realizaron una revisión bibliográfica con el objeto de buscar alternativas para mejorar la terneza de la carne a partir del colágeno intramuscular, donde resaltaron la existencia de metaloproteinasas de matriz MMP-2 y MMP-9.

## Justificación

El colágeno tiene una estructura característica que lo hace resistente al calor; durante la maduración de la carne sufre cambios conformacionales que generan inestabilidad en algunas cadenas polipeptídicas y en consecuencia esta fracción se vuelve soluble, durante la transformación de músculo en carne. No existe evidencia en la literatura sobre los fenómenos que ocurren durante esta cascada de eventos que definan el comportamiento del colágeno y los tipos de colágeno y sus fracciones que se obtienen por la actividad de las metaloproteinasas y la degradación de esta molécula. Lo anterior lleva a la necesidad de realizar una investigación que permita relacionar los posibles cambios bioquímicos que ocurren en el colágeno intramuscular durante las 96 horas *post-mortem*.

En el presente trabajo, se buscó relacionar los cambios que ocurren durante la maduración de la carne de conejo y su efecto en la solubilidad de los diferentes tipos de colágeno: total, soluble e insoluble utilizando métodos espectrofotométricos y electroforéticos durante las 96 horas *post-mortem*, al identificar el perfil electroforético y la presencia de sus oligómeros (monómeros, dímeros y trímeros).

## Objetivos

### *General*

- Evaluar los cambios que sufre el colágeno del músculo cuádriceps femoral de conejos de raza California de  $70\pm 3$  días durante las 96 h desde la matanza, mediante métodos espectrofotométricos y electroforéticos.

### *Particulares*

- Determinar la concentración del colágeno total y sus fracciones (soluble e insoluble) del músculo cuádriceps femoral de conejos de raza California de  $70\pm 3$  días durante las 96h desde la matanza, mediante la cuantificación de Hyp.
- Identificar el perfil electroforético de las fibras de colágeno y sus fracciones (soluble e insoluble) del músculo cuádriceps femoral de conejos de raza California de  $70\pm 3$  días durante las 96 h desde la matanza, mediante el uso de agentes desnaturalizantes y reductores.

## Hipótesis

### Hipótesis 1

En la transformación de músculo en carne existen cambios conformacionales de las proteínas. En el caso del colágeno y debido a sus características estructurales conforme aumenta el tiempo desde la matanza, mayor será el porcentaje de colágeno soluble.

### Hipótesis 2

Durante la transformación de músculo en carne, los cambios conformacionales del colágeno generan la disociación de la triple hélice y en consecuencia, en el perfil electroforético con respecto al tiempo se observará una mayor presencia de monómeros.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Obtención y acondicionamiento de la muestra

Los conejos se obtuvieron del Módulo de Cunicultura de la FESC-UNAM, de donde se movilizaron al Taller de Carnes para su sacrificio.

Al término del sacrificio se obtuvieron el par de miembros pelvianos de 30 conejos macho de la raza California, de  $70 \pm 3$  días de edad, que se dividieron en 5 lotes de 6 animales cada uno.

Los miembros pelvianos de cada conejo se colocaron en charolas de poliestireno con todos los datos de identificación. Se trasladaron de inmediato en hielera al Laboratorio 7 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, para su almacenamiento en refrigeración ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y posterior evaluación durante 0, 24, 48, 72 y 96 h (Cuadro 6).

Cuadro 6. Lotes experimentales

Unidad experimental	Lotes				
	0h	24h	48h	72h	96h
1	1	7	13	19	25
2	2	8	14	20	26
3	3	9	15	21	27
4	4	10	16	22	28
5	5	11	17	23	29
6	6	12	18	24	30

Las determinaciones se realizaron con el homogenizado de los músculos cuádriceps femoral de cada uno de los miembros pelvianos. Previo a la homogenización, se les retiró la fascia y

se les midió el pH. Posteriormente, se pesaron los gramos para cada una de las determinaciones.

## 2.2. pH

La medición del pH de los músculos se realizó utilizando un potenciómetro Orion Modelo Five Start (USA) y electrodo de penetración KNIpHE (Reino Unido) (Figura 13). El cual fue calibrado con soluciones amortiguadoras y las lecturas de los valores de pH se registraron por duplicado.

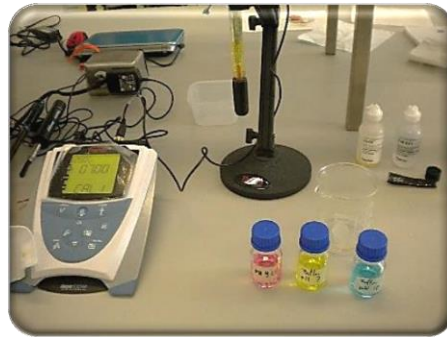


Figura 13. Potenciómetro Orion Five Start

## 2.3. Cuantificación de hidroxiprolina

La cuantificación de hidroxiprolina (Hyp) se realizó por colorimetría a 558 nm, al oxidarla a pirrol por la adición de cloramina T (oxidante) y una reacción colorida en presencia de calor por la adición de 4-dimetilaminobenzaldehído (Figura 14).

En la curva patrón de Hyp (Sigma-Aldrich Chemical) se utilizó una solución stock de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , de la cual se prepararon soluciones de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 15).





Figura 14. Reacciones para la cuantificación de Hyp

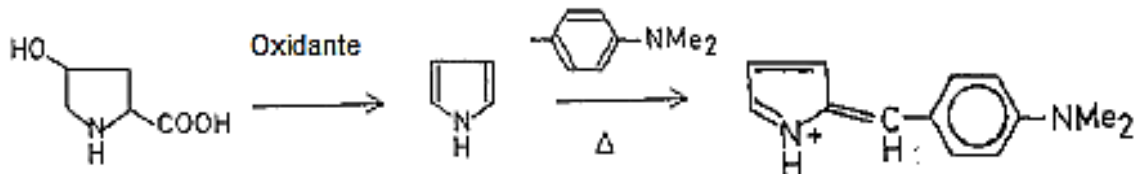


Figura 15. Soluciones patrón par la cuantificación de Hyp

Fuente: Modificado de Pindur, 1978

En tubos de ensaye se vertieron 2 mL de cada una de las soluciones patrón y 2 mL de agua destilada en el caso del tubo blanco. Se le adicionó a cada tubo 1 mL de cloramina T (Sigma-Aldrich Chemical) y se dejaron reposar por 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó 1 mL de 4-DMAB (4-dimetilaminobenzaldehído) (Sigma-Aldrich Chemical). Cada tubo de ensaye se tapó con aluminio y se colocaron en baño maría a 60°C por 20 min. Se dejaron enfriar por 3 min y se realizó la lectura a 558±2 nm en el espectrofotómetro Spectronic 20D (Roy Minolta, USA).

La curva patrón de Hyp se realizó por triplicado, se promedió y se construyó un gráfico con la concentración en µg/2mL, para obtener la ecuación de la recta y calcular la cantidad de colágeno total y sus fracciones solubles e insoluble como se describe a continuación

## 2.4. Extracción del colágeno total

La obtención de colágeno total consiste en la hidrólisis en ácido sulfúrico de las proteínas a aminoácidos, se utilizó la metodología del método 990.26 del AOAC con algunas modificaciones.

Se pesan 4 g de muestra y se adicionan 30 mL de ácido sulfúrico 3.5 M. (J. T. Baker) Posteriormente se incubaron a 105°C por 17 h con agitación constante.

Se obtuvo un volumen de 20 mL de hidrolizado, el cual se enfrió por 30 min y se vertió en una probeta de 500 mL; se adicionaron 480 mL de agua destilada y se filtró. Se tomaron 10 mL del filtrado y se aforaron a 100 mL Se utilizaron 2 mL para la cuantificación de Hyp.

Se calculó la concentración de Hyp en la muestra (H) (g/100g) con la ecuación 1, donde:  $h$  es el valor obtenido con la ecuación de la recta ( $\mu\text{g}/2\text{mL}$ ), 2.5 el factor de dilución,  $m$  peso de la muestra (g) y  $V$  volumen utilizado de la dilución de la muestra (mL).

$$H = \frac{hx2.5}{mxV} \text{ (ec. 1)}$$

Por último, según el AOAC, el valor de H se multiplica por 8 para conocer la cantidad de tejido conectivo presente en la muestra, los datos se reportaron en mg/g.

## 2.5. Extracción de colágeno soluble e insoluble

La extracción de colágeno soluble e insoluble se realizó con modificaciones a la metodología descrita por Hill en 1966.

Se pesaron 4 g de muestra en tubos cónicos de 50 mL para centrifuga y se adicionaron 20 mL de la dilución 1:3 de Ringer (cloruro de sodio 119.8 mM, cloruro de calcio 234  $\mu\text{M}$  y cloruro de potasio 4.7 mM) (J. T. Baker). Los tubos se colocaron en un baño maría a 77 °C

por 70 min y se agitaron a 200 rpm cada 10 min. Se dejaron enfriar por 30 min y se centrifugaron a 6000x g por 10 min.

Al término de la centrifugación, para obtener el colágeno soluble (CS), el sobrenadante se vertió en un vaso de precipitados de 100 mL y se adicionaron 10 mL de solución ¼ de Ringer, posteriormente, se centrifugaron utilizando las mismas condiciones antes mencionadas.

El sobrenadante se vertió en el vaso de precipitados (CS) y el sedimento o colágeno insoluble (CI) en otro vaso de precipitados de 100 mL, a cada fracción de colágeno se adicionaron 20 mL de ácido clorhídrico (J. T. Baker) concentrado.

Las fracciones de colágeno (CS y CI) fueron hidrolizadas por 16 h a 120°C con agitación constante.

Transcurrida la hidrólisis, se dejaron enfriar por una hora a temperatura ambiente. El sobrenadante hidrolizado (CS), se vertió en una probeta de 50 mL y se le adicionó agua destilada, mientras que el sedimento hidrolizado (CI), se llevó a 500 mL, ambos se filtraron.

Se utilizaron 2 mL de cada una de las fracciones para la cuantificación de Hyp.

Para calcular la concentración de Hyp se utilizó la ecuación de la recta de la curva patrón y se procedió entonces, a calcular el contenido de Hyp (H) (g/100g) para cada una de las fracciones del colágeno soluble (ecuación 1) e insoluble (ecuación 2).

$$H = \frac{hx0.5}{mxV} \text{ (ec. 2)}$$

El valor de H para el colágeno soluble e insoluble se multiplica por 7.52 y 7.25, respectivamente, para conocer la cantidad de estas fracciones del colágeno presentes en la muestra.

El contenido de CS se reportó en porcentaje (el CS se dividió entre la sumatoria del CI y CS).

## 2.6. Extracción de fibras de colágeno

Se pesaron 6 g de muestra, se les adicionaron 250 ml de agua ultra pura a 4°C. Se homogenizaron por 15 s y colocó en agitación constante por 30 min. Posteriormente se filtró con un cedazo de 5 mm.

A la muestra, se le adicionó tres veces 100 mL de PBS 0.1 M (amortiguador salino de fosfato, PBS por sus siglas en inglés y se prepara con fosfato de sodio monobásico y dibásico, más cloruro de sodio) (J. T. Baker ) y cloruro de potasio 1.1 M (J. T. Baker) (pH 7.4) a 4°C, como se describe a continuación: la muestra adicionada con el buffer, se homogenizó por 30 s y se incubó en agitación constante (300 rpm) por 30 min, posteriormente se filtró y se obtuvieron las fibras de colágeno. Las fibras se resuspendieron en el mismo buffer, se incubaron en agitación constante por 6 h y 12 h y se filtraron.

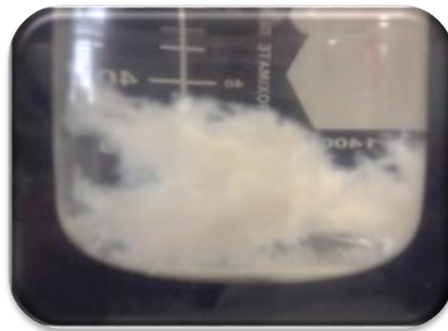


Figura 16. Fibras de colágeno

Con el objetivo de eliminar aquellos residuos de miofibrillas, se adicionaron a las fibras de colágeno 50 mL de cloruro de potasio 1 M (J. T. Baker) a 4°C y se mantuvieron en agitación baja constante por 24 h. Finalmente se adicionaron 50 mL de cloruro de sodio al 0.9% (J. T. Baker) a 4°C y se colocó en agitación baja constante por 24 h (Figura 16), se filtró. Las fibras de colágeno obtenidas con esta metodología, se congelaron a -50°C por 24 h y liofilizaron a 0.06 mBar en una Liofilizadora LABCONCO Freezezone 4.5 (USA).

## 2.7. Extracción de las fracciones solubles e insolubles de las fibras de colágeno

En la extracción de fibras de colágeno se utilizó la metodología de Sivakumar y colaboradores (1998) y para la extracción de las fracciones soluble e insoluble del colágeno, el método de Nalinanon y colaboradores (2007). El primero de estos métodos se basa en el uso de una solución buffer y agentes caotrópicos. El segundo de éstos consiste en el uso de ácido acético y pepsina para la obtención de las fracciones soluble e insoluble de las fibras de colágeno.

Se pesaron 10 g de muestra, se adicionaron 100 mL de acetato de sodio 0.5 M (J. T. Baker) y urea 0.1 M (Sigma-Aldrich Chemical) (pH 6.8) y se homogenizó por 30 s, se incubó en agitación baja constante por 24 h. Al término de la incubación, se filtró y se recolectaron las fibras de colágeno.

Estas últimas se incubaron con 45 mL de ácido acético 0.5 M (J. T. Baker) y pepsina con una actividad de 20 kU/g (Sigma-Aldrich Chemical, USA) a 4°C durante 24 h. Posteriormente, se decantó el sedimento que corresponde a la fracción insoluble del colágeno, el cuál fue congelado a -50°C por 24 h y liofilizado a 0.06 mBar. El sobrenadante o fracción soluble, se centrifugó a 6000 rpm por 60 min a 4°C. El sedimento de la centrifugación se resuspendió en 10 mL de Tris 0.5 M (Sigma-Aldrich Chemical) con cloruro de sodio 2.6 M (Sigma-Aldrich) con objeto de precipitar la fracción soluble del colágeno.

En membrana de diálisis con un corte de 12 kDa (dialysis tubing de celulosa de 2.5 cm de diámetro) (Sigma Aldrich Chemical) se colocaron 10 mL del precipitado y se dializó contra un volumen de 200 mL de ácido acético 0.1 M (J. T. Baker) y agua destilada durante de 6 h (2 veces) y 12 h. El dializado, se congeló a -50°C por 24 h y liofilizó a 0.06 mBar.

## 2.8. Perfil electroforético

El perfil electroforético se obtuvo de acuerdo con la metodología descrita por Laemmli (1970) mediante el cual se preparan las moléculas cargadas negativamente con el SDS por

migración en un campo eléctrico del cátodo al ánodo, utilizando un gel concentrador y de separador con porcentajes de 4 y 6%, respectivamente bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras.

### 2.8.1. Preparación de la muestra

Se pesó 1mg de las muestras liofilizadas (Fibras de colágeno, CI y CS) y se les adicionó 200  $\mu$ L de PBS 0.02 M (Fosfato de sodio dibásico y Fosfato de sodio monobásico) (J.T. Baker), SDS 2% (Bio-Rad) y urea 3.5 M (Sigma-Aldrich Chemical) y se incubaron a 50°C por 90 min. Posteriormente se centrifugaron en una centrífuga refrigerada (Centurión, Mod. K2015 Inglaterra) a 10,500 rpm por 5 min.

A las muestras se les adicionó sample buffer para electroforesis desnaturalizantes (Bio-Rad) en relación 1:1 y se incubó a 95°C durante 5 min, para los geles bajo condiciones desnaturalizantes, para los geles bajo condiciones reductoras se les adicionó 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol al sample buffer.

### 2.8.2. Electroforesis

Se prepararon geles de poliacrilamida al 6% y se colocaron dentro de la cámara de electroforesis Mini-Protean 3Cell (Bio-Rad) y se cargaron en cada pozo 15  $\mu$ L de las muestras, con una concentración de 5  $\mu$ g/ $\mu$ L. Se utilizaron marcadores de peso molecular All Blue Precision Plus (Bio-Rad, con masas moleculares de 10 a 250 kDa). Los geles se corrieron a 20 mA/gel por aproximadamente 2 h.

Se realizó la comparación de los perfiles electroforéticos de las *fibras de colágeno*, de las extracciones de cada lote y entre estos. El tñido de los geles se realizó con azul de Coomassie G 250 al 1 % (Bio-Rad) con ácido acético (J. T. Baker), metanol (J. T. Baker) y agua en

proporciones 1:4.5:4.5 durante 30 min. Posteriormente se realizó un desteñido de 30 min con ácido acético, metanol y agua en proporciones 1:1:8.



Figura 17. Analizador de Imágenes de Electroforesis

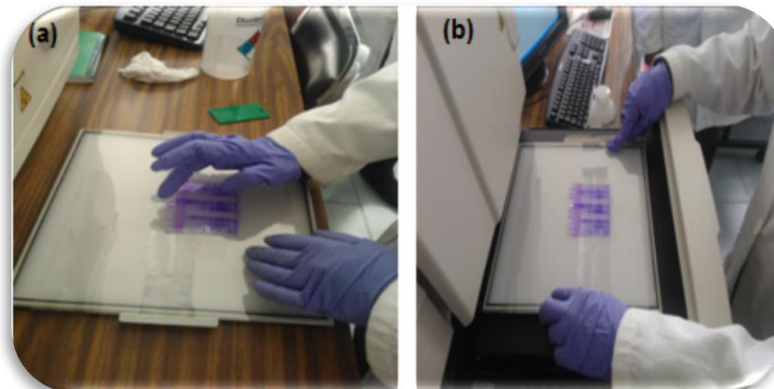


Figura 18. Analizador de bandas proteicas

Para el caso de las *fracciones soluble e insoluble* de colágeno se utilizó la comparación entre lotes y se adicionó como control las fibras de colágeno.

Al término del primer desteñido, se realizó un segundo desteñido toda la noche y los geles se analizaron en un analizador de imágenes marca Bio Rad modelo Gel Doc™ (USA) (Figura 17) y se adquirieron las imágenes con el programa Imagin System (Figura 18a y b). Los pesos moleculares de las bandas proteicas se determinaron con el programa Image Lab 3 (Bio-Rad, USA).

## **2.9. Análisis estadístico**

Los datos experimentales se recopilaron en una hoja de Excel del Office 2013 con el objeto de facilitar la construcción de las gráficas en el programa Sigma Plot versión 11.0,

Esta hoja de Excel de resultados se usó para el análisis estadístico ANOVA de una vía en el caso del pH, CS y %CS y de dos vías, para el CT, CTc, CI, así como de las subunidades del colágeno con el programa MINITAB® versión 16.0.



### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. Cuantificación de colágeno total, soluble e insoluble

##### 3.1.1. pH

En la presente investigación, se utilizó el músculo cuádriceps femoral para determinar el descenso del pH, el cual se sabe que tiene influencia sobre la solubilidad del colágeno.

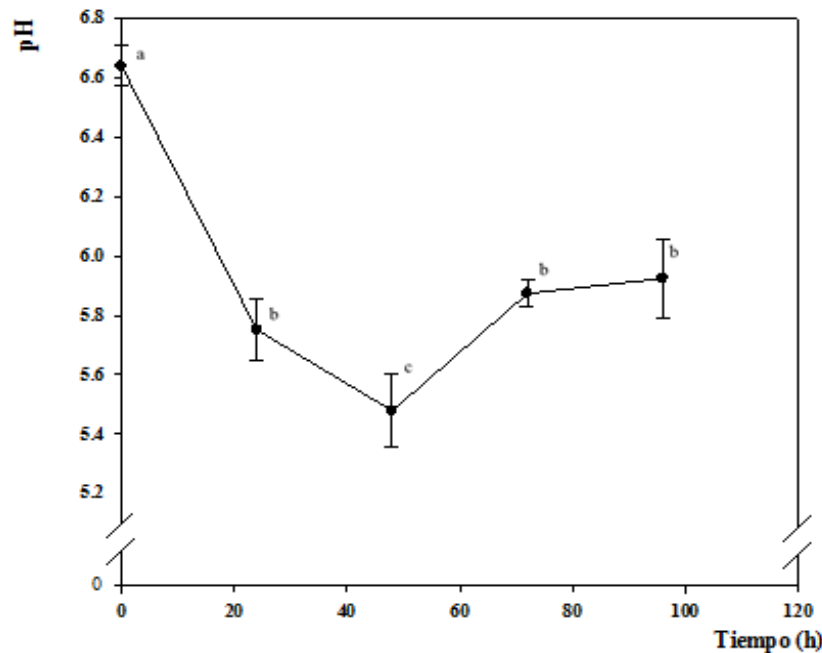


Figura 19. Curva de descenso de pH del músculo cuádriceps femoral de conejos raza California de  $70 \pm 3$  días durante las 96 h *post-mortem*

<sup>a-c</sup>Prueba de Tukey significativamente diferentes entre tiempos ( $p > 0.05$ )

Tras el sacrificio, el valor de pH desciende rápidamente durante las primeras 24 horas *post-mortem*, fenómeno que es debido a la formación de ácido láctico a partir de las reservas de glucógeno muscular, mediante la glucólisis anaerobia. En este periodo de tiempo, en paralelo se instaura el *rigor mortis* por el agotamiento del ATP, el cual está relacionado con la contracción sostenida del músculo esquelético.

Al término de las 48 h disminuye la velocidad en el descenso de pH, evento generado por el agotamiento de las reservas de glucógeno reduce la producción de ácido láctico; en este lapso de tiempo, el ATP se agota generando la presencia de enlaces actomiosina, cuando estos enlaces llegan a su saturación se inicia el proceso de maduración con la transformación del músculo en carne, con una cascada de modificaciones debidas principalmente a los sistemas enzimáticos encargados de la degradación de las proteínas (calpaínas-calpastatinas), el cual es favorecido por la ausencia de la acidificación en el músculo-carne y en consecuencia, el valor de pH presenta un ascenso al cabo de las 72 h.

Posteriormente, se observa un aumento paulatino del valor de pH a las 96 h lo que presume que la transformación del músculo en carne está por culminar (Figura 19). Este argumento se relaciona con los resultados durante las 72 h y 96 h posteriores al sacrificio los cuales estadísticamente son similares ( $p>0.05$ ). Los valores de pH al tiempo 0 h y 48 h son diferentes con los tiempos 24 h, 72 h y 96 h ( $p<0.05$ ) (Anexo 1).

En conejos, el descenso del pH *post-mortem* ha sido estudiado principalmente en los músculo largo dorsal y bíceps femoral (Blasco *et al.*, 1990, Hulot *et al.*, 1999) y longissimus dorsi (de la Cruz, 2011).

Blasco y colaboradores (1990) realizaron una investigación que tenía como objetivo identificar si en los músculo largo dorsal y bíceps femoral de conejos de 69 a 71 días, de la raza Nueva Zelanda (línea A) y una mezcla con la raza California (línea V) el descenso del pH estaba relacionado con su metabolismo, ellos encontraron que los valores de pH a los 45 min *post-mortem*, para los músculos largo dorsal es de 6.72 (D.S.=0.08 línea V y 0.09 línea A) y bíceps femoral es de 6.6 (D.S.=0.11 línea V y 0.13 línea A) para ambas líneas, mientras que a las 24 h para la línea A el pH es de 5.66 y 5.77 y la línea V es de 5.71 y 5.88 para el largo dorsal y bíceps femoral respectivamente ( $\sigma=0.06$ ). Estos autores concluyeron que las diferencias en el comportamiento del descenso de pH, se debe a la actividad metabólica diferente en cada músculo.

Las fibras musculares que constituyen cada músculo condicionan el metabolismo de este, por ello el músculo largo dorsal tiene un metabolismo glucolítico y su valor de pH es inferior al

del bíceps femoral, el cual se caracteriza por ser oxidativo, en general la carne de conejo está constituido por fibras blancas como en el cerdo, sin embargo, dependiendo de la función y localización anatómica de los músculos, la composición de fibras es diferente y en consecuencia su actividad metabólica (Bizkova *et al.*, 2010; Klont *et al.*, 1998; Peter *et al.*, 1972).

Al comparar esos valores de pH con los obtenidos en esta investigación en el músculo cuadríceps femoral al tiempo 0 h ( $6.64 \pm 0.07$ ) y 24 h ( $5.75 \pm 0.103$ ) se observa que son similares a los del músculo largo dorsal y bíceps femoral, lo que se puede deber a diversas causas, siendo la de mayor importancia, el efecto del manejo antes durante y después del sacrificio, al presentar distinta actividad metabólica cada tipo de músculo, adicionalmente, que dependen de los factores genéticos (especie y raza) y fisiológicos (edad y sexo) de cada animal (Apata *et al.*, 2012; Hulot *et al.*, 1999). El descenso del pH es un criterio de calidad de la carne importante, que está relacionado con defectos en textura y color como son PSE y DFD (por sus siglas en inglés Pálida, Suave y Exudativa y Dura, Seca y Firme, respectivamente) (Schaefer *et al.*, 2001).

### 3.1.2. Cuantificación del colágeno total y sus fracciones

En la cuantificación del colágeno y sus fracciones soluble e insoluble, las curvas patrón de Hyp utilizadas, tuvieron valores de coeficiente de correlación ( $r$ ) superiores a 0.99 (Figura 20), valores que indican que existe una relación entre las variables de cuantificación de colágeno y sus fracciones, y en consecuencia su uso es confiable.

El colágeno total no presentó valores estadísticamente diferentes con respecto al tiempo ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, al realizar la sumatoria de sus fracciones soluble e insoluble, se obtuvieron valores diferentes a los del colágeno total (CT) por lo que se le denominó colágeno total calculado (CTc) aunque al comparar los datos del colágeno total y calculado, se observó que su comportamiento no es estadísticamente diferente ( $p > 0.05$ ) (Figura 21), lo que lleva a sugerir que las variaciones entre estas tendencias, pueden ser debidas principalmente al método utilizado en la obtención de las fracciones de colágeno.

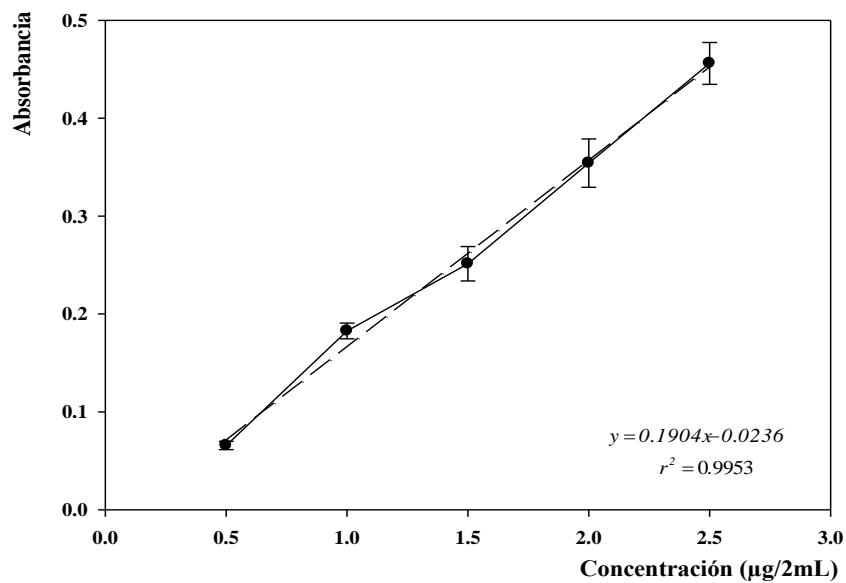


Figura 20. Curva de calibración para la cuantificación de Hyp

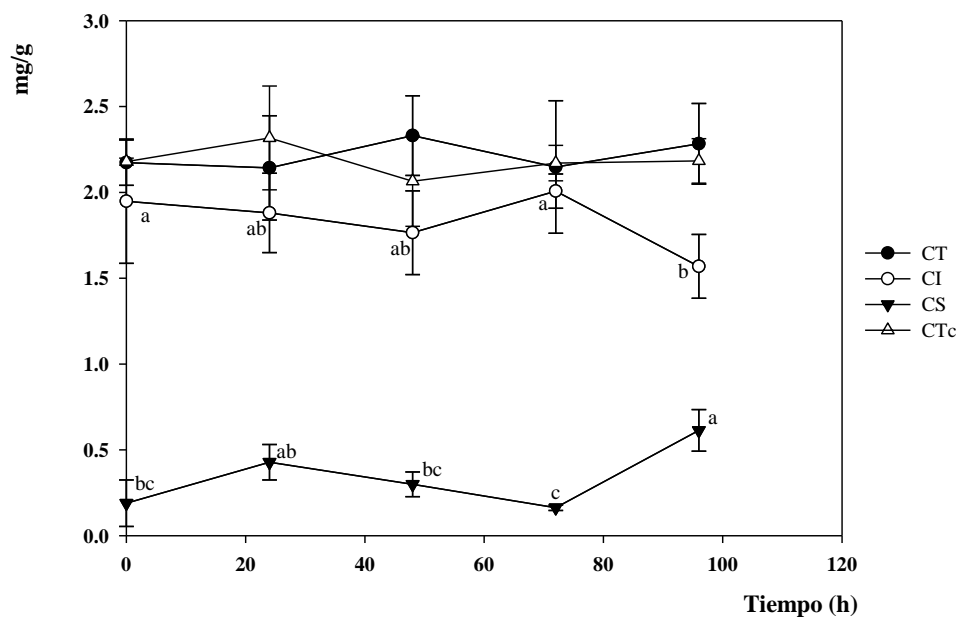


Figura 21. Gráfico del comportamiento del colágeno total y sus fracciones del músculo cuádriceps femoral de conejos raza California de 70±3 días durante las 96 h post-mortem

CT: Colágeno total. CTc: Colágeno total calculado. CI: Colágeno insoluble. CS: Colágeno soluble  
<sup>a-c</sup>Prueba de Tukey significativamente diferente entre tipos de colágeno (p > 0.05)

Con respecto al colágeno insoluble (CI), los resultados se presentan en las Figuras 21 y 22, en donde se observa que en las primeras 48 h presenta una disminución paulatina en su concentración, hasta las 72 h, aunque no presenta diferencias significativas ( $p>0.05$ ). Al término de las 96 h la concentración de colágeno insoluble disminuye, se observa que esto tiene correspondencia con el aumento en la concentración del colágeno soluble (CS), el cual en las primeras 24 h tiene un incremento precedido de una disminución paulatina hasta las 72h, momento en el que son evidentes en el sistema cárnico los eventos relacionados con su maduración (actividad enzimática) y pueden ser la pauta al incremento de esta fracción de colágeno al alcanzar las 96 h. Se observan diferencias significativas en la concentración de colágeno soluble con respecto al tiempo ( $p<0.05$ ).

En general, los valores en las concentraciones del colágeno total y sus fracciones soluble e insoluble, presentaron diferencia significativas entre ellas con respecto al tiempo ( $p<0.05$ ). (Figura 21) (Anexo 1).

En conejos, la mayoría de las cuantificaciones de colágeno total se realizan en el músculo largo dorsal; en esta investigación, para el músculo cuádriceps femoral se obtuvo un promedio de  $2.24\pm 0.24$  mg/g. Las diferencias con los resultados obtenidos por otros grupos de investigadores pueden ser debidas a las metodologías utilizadas en la obtención de la muestra y cuantificación, el factor de conversión utilizado así como el tipo de músculo empleado en cada caso, como se describe a continuación.

En 2003 un grupo de investigadores encabezados por Corino encontraron que en el músculo largo dorsal, parte lumbar de conejos Nueva Zelanda mayores a 90 días aumenta notablemente la cantidad de colágeno total, obteniendo alrededor de  $15 \mu\text{g}/\text{mg}$  de músculo deshidratado ( $15 \text{ mg}/\text{g}$ ). Combes y colaboradores (2003) utilizaron el mismo músculo a las 24 h *post-mortem* para determinar el efecto de la cocción en la terneza y cuantificaron el contenido de colágeno en conejos de 70 días teniendo como resultado  $17.1\pm 2.7$  mg/g de músculo deshidratado. Al comparar los valores de colágeno total obtenidos con los mencionados anteriormente, las diferencias de los resultados radican en los factores de conversión utilizados ( $7.14$  y  $7.25$ , Corino *et al.*, 2003 y Combes *et al.*, 2003 respectivamente) y las muestras liofilizadas.

En carne fresca, Pascual y colaboradores (2008) realizaron a las 24 h *post-mortem* una disección entre las vértebras lumbares VI y VII del músculo largo dorsal de conejos de una línea sintética de 63 días obteniendo un contenido promedio de 6.8 mg/g de músculo; lo que al ser comparado con lo obtenido en el músculo cuádriceps femoral no corresponde con lo obtenido por Prost (1975) y Jeremiah (1981).

Prost y colaboradores (1975) argumentan que el contenido de colágeno está relacionado con la distribución anatómica, debido a que ellos mencionan que los músculos del miembro pelviano (cuarto trasero) de bovinos contienen más colágeno que los del miembro torácico (cuarto delantero), mientras que Jeremiah y colaboradores (1981), identificaron que el músculo largo dorsal en comparación con el semitendinoso de bovinos tiene menor contenido de colágeno, lo que se debe a la función de éstos, ya que el primero se encarga del sostén, mientras que el segundo se utiliza para el movimiento, lo que requiere mayor concentración de colágeno para proteger y dar sostén al músculo. Razones por las que el contenido de colágeno total en el músculo cuádriceps femoral debería ser mayor al del músculo largo dorsal.

En el sistema cárnico, existe una amplia investigación sobre las proteínas miofibrilares durante el *rigor mortis* y la maduración, debido a que éstas se relacionan con la terneza, dejando de lado el efecto en las proteínas del tejido conectivo. Al respecto, existen pocos estudios relacionados con los cambios estructurales *post-mortem* del colágeno, sin embargo, varios autores mencionan que existen modificaciones, sin conocer la naturaleza de éstas y en consecuencia los mecanismos que los causan y de la misma manera, hacen suposiciones de los eventos que lo generan (Nishimura, 2010; Sylvestre *et al.*, 2002; Mills *et al.*, 1989b; Wu *et al.*, 1982).

Así mismo, en esta investigación, la obtención de la fracción soluble se realizó con aplicación de temperatura, entonces, la cantidad de esta fracción puede estar relacionada principalmente con la estabilidad del colágeno al calor, la cual depende del tipo de enlaces covalentes como los aldimina, cetoamina y puentes disulfuro o inmaduros que se encuentran en su estructura, por el contrario la fracción insoluble por tanto, estaría constituida por aquellas moléculas de

tropocolágeno estabilizadas por enlaces piridolina y pirrol o enlaces maduros (Purslow, 2014; Purslow *et al.*, 2012; Nishimura, 2010; Weston *et al.*, 2002; McCormick, 1999).

### 3.1.3. Porcentaje de colágeno soluble y su relación con el pH

Los valores de las fracciones de colágeno soluble, generalmente se expresan en porcentaje; según se observa en la Figura 22, el colágeno soluble se caracterizó por un aumento al término de las primeras 24 h *post-mortem*. Durante las 48 h y 72 h el porcentaje de colágeno soluble disminuye. Posteriormente, a las 96 h se observa un aumento de tres veces el porcentaje inicial.

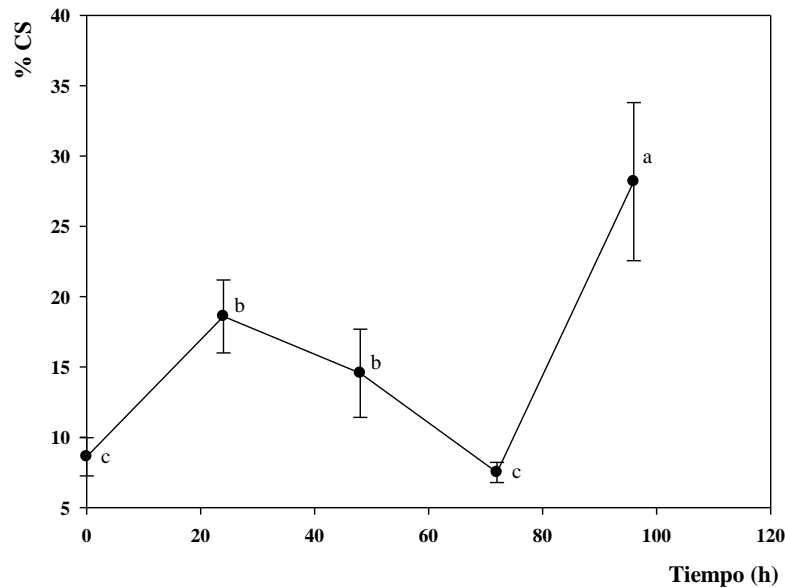


Figura 22. Gráfico del comportamiento del porcentaje de colágeno soluble del músculo cuadríceps femoral de conejos raza California de  $70 \pm 3$  días durante las 96 h *post-mortem*

<sup>a-c</sup>Prueba de Tukey significativamente diferente entre tratamientos ( $p > 0.05$ )

El porcentaje de colágeno soluble presenta diferencias significativas principalmente a las 96 h *post-mortem* ( $p < 0.05$ ) (Figura 22), el análisis estadístico se presenta en el Anexo 1.

Una vez discutido el porcentaje del colágeno soluble con respecto al tiempo, al comparar la evolución de los cambios en las fibras de colágeno con la cinética de descenso de pH se tiene que durante las 24 h *post-mortem* como menciona Mills (1989a y b), las modificaciones estructurales se pueden deber al efecto de las proteasas lisosomales como las catepsinas que tienen su actividad a pH de 5. Posteriormente, el descenso del valor de pH entre 5.75 y 5.47 de las 48 h y 72 h, respectivamente, marca la desnaturalización del complejo actomiosina (su punto isoeléctrico es de alrededor 5.5), mientras que en la fracción de colágeno soluble el efecto del pH no lo afecta y tiene un descenso mínimo.

A las 72 h se extrajo la menor cantidad de colágeno soluble, lo que se refleja en el porcentaje de esta fracción (Figuras 21 y 22), al relacionar su comportamiento con el pH, debería existir un incremento en la cantidad de esta fracción de colágeno puesto que el valor de pH es similar al de las 96 h, sin embargo, su disminución puede deberse a que bajo estas condiciones en el sistema cárnico el colágeno es desnaturalizado en menor grado.

El porcentaje de solubilidad aumenta hasta las 96 h al incrementar el valor de pH, lo que presume que las enzimas que degradan al colágeno están reguladas por valores de pH cercanos a la neutralidad, como sugieren Koohmaraie, (1994) y Oauli, (1992); ellos mencionan que hay tres tipos de enzimas en el músculo, las catepsinas (proteasas lisosomales), las calpaínas-calpastatinas (dependientes de calcio) y las enzimas de complejo multicatalítico (constituidas por varios polipéptidos de bajo peso molecular y tienen una masa molecular de alrededor de 700 kDa). Las dos primeras se encargan de las miofibrillas mientras que las últimas a pH superiores a 7.0 y temperaturas de refrigeración, con una actividad mínima degradan el tejido conectivo. O bien, de acuerdo con Mills y colaboradores (1989b) debido al aumento del pH se activan las colagenasas que pierden su actividad a pH bajos.

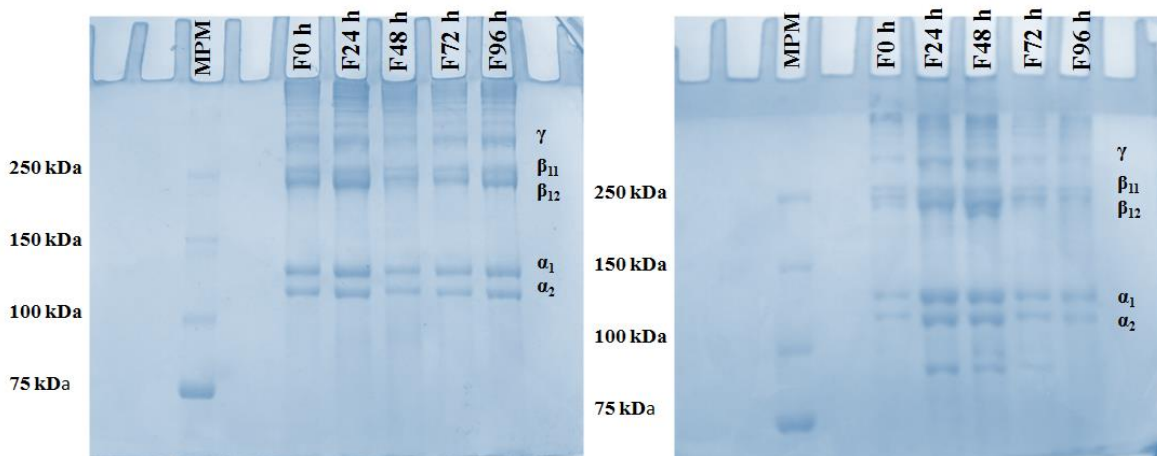
En general, el porcentaje de colágeno soluble o la fracción soluble no aumenta con respecto al tiempo, sino que todos los cambios mecánicos, fisicoquímicos y estructurales que sufren las fibras de colágeno *post-mortem* podrían estar relacionados con la actividad enzimática, la cual está regulada principalmente por el pH, por lo que al disminuir la fracción insoluble, aumenta la fracción soluble.



### 3.2. Análisis del perfil electroforético de las fibras de colágeno y las fracciones soluble e insoluble

#### 3.2.1. SDS PAGE desnaturalizante y reductora de fibras de colágeno

El perfil electroforético de las fibras de colágeno se realizó bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras (Figura 23), los resultados obtenidos en estos patrones muestran la presencia de las subunidades características del colágeno (*Monómeros* o  $\alpha$ -cadenas polipeptídicas de alrededor de 100 kDa conocidas como  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ . *Dímeros* o  $\beta$ - unión de dos cadenas  $\alpha$  y se denominan  $\beta_{11}$  ( $\alpha_1 + \alpha_1$ ),  $\beta_{12}$  ( $\alpha_1 + \alpha_2$ ) con masas de 200 kDa. *Trímeros* o  $\gamma$ -interacción de tres cadenas  $\alpha$  y se pueden encontrar  $\gamma_{111}$  ( $\alpha_1 + \alpha_1 + \alpha_1$ ) y  $\gamma_{112}$  ( $\alpha_1 + \alpha_1 + \alpha_2$ ) de 300 kDa) (Deyl *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 1982; McClain, *et al.*, 1971a y b; McClain, *et al.*, 1970) (Anexo 2).



**Figura 23.** SDS PAGE al 6% de la comparación de las fibras de colágeno con respecto al tiempo bajo condiciones desnaturalizantes (urea 3.5M y SDS 10%) (Izquierda) y reductoras (urea 3.5M, SDS 10% y  $\beta$ -mercaptoetanol 5%) (Derecha) extraídas del músculo cuádriceps femoral de conejos raza California de  $70 \pm 3$  días durante las 96 h *post-mortem*

La letra F corresponde a fibras de colágeno precedida por un número el cual indica el tiempo *post-mortem* de la extracción. MPM: Precision All Blue (Bio Rad de 10 a 250 kDa)

En el gel bajo condiciones reductoras, se presentan bandas con masa molecular inferior a las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , a las 24 h y 48 h y 72 h y se observa la presencia de una y dos bandas inferiores a las cadenas  $\alpha_2$ , respectivamente, con masas de  $93.45 \pm 3.641$  y  $104.15 \pm 3.004$ . Del mismo modo, se aprecia la presencia de una banda en las 0 h, 24 h y 48 h por debajo de  $\beta_{12}$ , la cuál puede ser la subunidad denominada  $\beta_{22}$  con una masa de  $217.62 \pm 4.59$ .

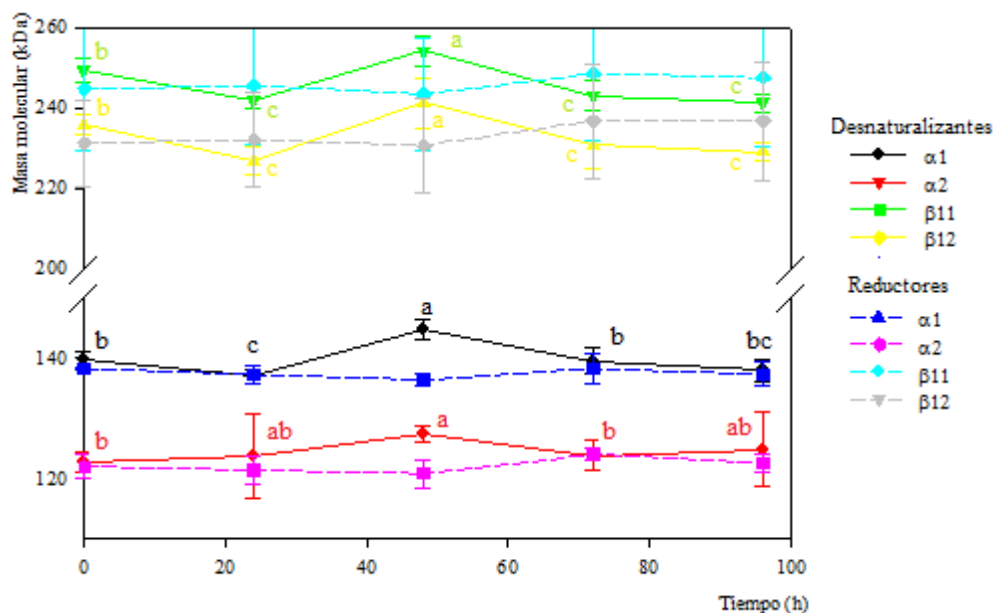


Figura 24. Masa molecular aparente (kDa) de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de fibras de colágeno bajo desnaturalizantes (Urea 3.5 M y SDS 10%) y condiciones reductoras (Urea 3.5 M, SDS 10% y  $\beta$ -mercaptoetanol 5%) del músculo cuádriceps femoral de conejos raza California de  $70 \pm 3$  días durante las 96 h *post-mortem*

<sup>a-c</sup>Prueba de Tukey significativamente diferente entre tratamientos ( $p > 0.05$ )

Los valores de la masa molecular de las cadenas  $\beta$ , bajo condiciones reductoras presentan D.S. elevadas (Figura 24); esta variación puede deberse a la cantidad de colágeno tipo III presente en la muestra.

En general, los patrones de perfil electroforético en presencia y ausencia de agentes reductores de las cadenas  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  y  $\beta_{11}$  y  $\beta_{12}$  son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ) (Figura 24).

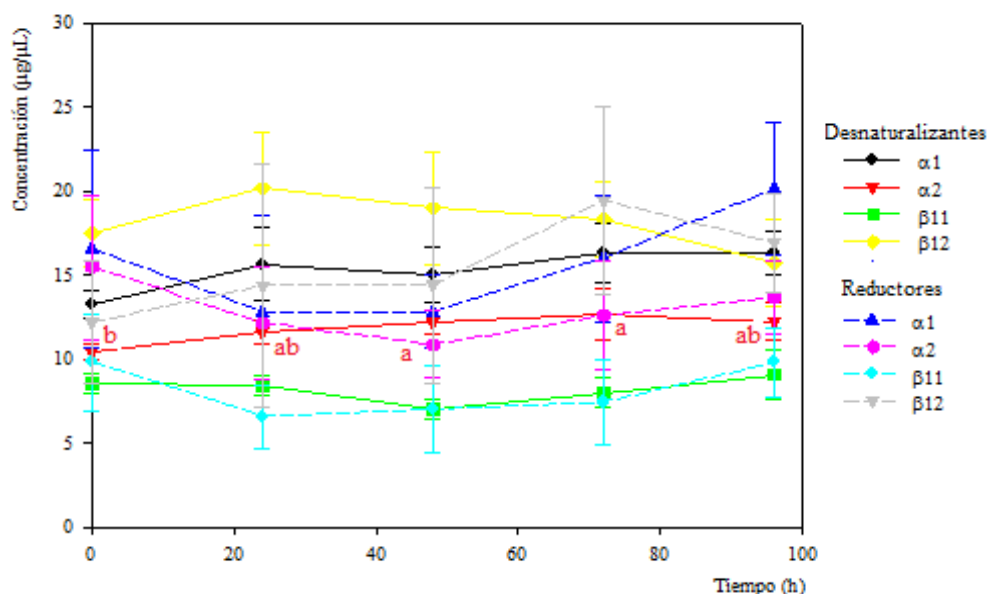


Figura 25. Concentración ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de fibras de colágeno bajo desnaturalizantes (Urea 3.5 M y SDS 10%) y condiciones reductoras (Urea 3.5 M, SDS 10% y  $\beta$ -mercaptoetanol 5%) del músculo cuádriceps femoral de conejos raza California de  $70\pm 3$  días durante las 96 h *post-mortem*

<sup>a-c</sup>Prueba de Tukey significativamente diferente entre tratamientos ( $p>0.05$ )

En cuanto a la concentración de las subunidades del colágeno, en la Figura 25 se tiene que, con respecto al tiempo, sólo en las cadenas  $\alpha_1$  de los geles desnaturalizantes existen algunas diferencias significativas ( $p<0.05$ ), principalmente entre las 72 h y 96 h con el tiempo 0. Así mismo, se observa que las cadenas  $\beta_{11}$  son diferentes a las 48 h bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras. De la misma manera, se observa que no hay diferencias estadísticas entre el enriquecimiento de las subunidades de colágeno con respecto al tiempo ( $p>0.05$ ) (Anexos 2 y 4).

En la Figura 25 se observa las bandas  $\beta_{12}$  a las 0 h y 24 h tienen mayor concentración de bajo condiciones desnaturalizantes que bajo condiciones reductoras. Al someter las muestras a condiciones reductoras, genera el aumento del enriquecimiento de las bandas  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  y en consecuencia la disminución de  $\beta_{12}$ .

Al comparar los valores de las masas moleculares de las subunidades con los valores bibliográficos, son diferentes debido a que la cadena  $\alpha_2$  se ha reportado que pesa entre 96 y

100 kDa y la cadena  $\alpha_1$  tiene una masa molecular alrededor de 116 kDa; en esta investigación, los valores de  $\alpha_2$  son de alrededor de 120 kDa bajo condiciones desnaturalizantes y reductores (Figura 24). Esta variación obtenida podría deberse a dos situaciones: 1) al tipo de marcadores de peso molecular y 2) al método de preparación de las muestras. El marcador de peso molecular (Precision All Blue Bio-Rad) utilizado en esta investigación está constituido principalmente por proteínas globulares, de acuerdo con Furtmayr y colaboradores (1971) y Hayashi y colaboradores (1979) la movilidad de las subunidades del colágeno es menor que las proteínas globulares del mismo peso molecular y en consecuencia las cadenas del colágeno aparecen como de mayor masa molecular. Con respecto al método de preparación utilizado, un grupo de investigadores encabezados por Hayashi (1979) utilizaron el colágeno de piel de ternero para identificar el comportamiento de colágeno tipo I y III en la electroforesis, dentro de su investigación utilizaron diversas concentraciones de urea (1, 2, 3, 4, 5, 5.8 y 8 M) (Anexo 3), en el perfil electroforético de las muestras adicionadas con estas soluciones identificaron que a mayor concentración de urea, menor movilidad de las subunidades del colágeno y en consecuencia mayor masa molecular, lo que puede deberse al contenido de aminoácidos hidrofóbicos de cada cadena. En la preparación de las muestras de las fibras de colágeno y sus fracciones soluble e insoluble, se utilizó urea en una concentración de 3.5M (Nalinanoon *et al.*, 2007), esto puede ser la causa por la cual la masa de las subunidades del colágeno fueron diferentes. Sin embargo, la diferencia en la movilidad y en consecuencia el peso molecular entre las cadenas  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  se debe posiblemente según Furthmayr y colaboradores (1970) al contenido de aminoácidos (Pro e Hyp) en cada cadena, ya que tienen un peso molecular parecido.

En los geles reductores se observan bandas inferiores a  $\alpha_2$  según Wu y colaboradores (1982) pueden ser residuos contaminantes de las proteínas miofibrilares, mientras que la presencia de las cadenas  $\beta_{22}$  de acuerdo con la revisión de un grupo de investigadores encabezados por Deyl (2010) es el resultado de la interacción entre dos cadenas  $\alpha_2$  de dos tropocolágenos tipo I (colágeno fibrilar heterotrimérico compuesto por dos cadenas  $\alpha_1$  y una  $\alpha_2$ ).

El motivo de las diferencia entre el perfil electroforético bajo condiciones desnatulizantes es debido a que se emplea SDS el cuál con la proteínas provocando la interrupción de

interacciones hidrófobas, mientras que bajo condiciones reductoras al adicionar el agente reductor ( $\beta$ -mercaptoetanol) se rompen los enlaces disulfuro, efecto que en el caso del colágeno tipo III debería genera el enriquecimiento de las bandas  $\alpha_1$  y  $\beta_{11}$  de acuerdo con lo establecido por Hayashi y sus colaboradores (1979). En el músculo esquelético también se encuentra colágeno tipo I, el cual no presenta modificación alguna debida a la ausencia de cisteínas, responsables de la formación de enlaces

Con respecto a los resultados obtenidos en la concentración de las cadenas características del colágeno la ausencia de enriquecimiento de las bandas  $\alpha_1$  y  $\beta_{11}$  bajo condiciones reductoras en comparación de las desnaturizantes podría deberse a la cantidad de colágeno tipo III presente en el músculo, sin embargo se observa mayor enriquecimiento de las cadenas  $\beta_{11}$  aunque estadísticamente sean iguales.

### 3.2.2. SDS- PAGE desnaturizante y reductora de las fracciones de colágeno

Las fracciones soluble e insoluble del colágeno presentan componentes similares a los de las fibras de colágeno y comportamiento semejante en el perfil electroforético. En las Figuras 26 y 29 se observa el patrón bajo condiciones desnaturizantes y reductoras de las fracciones soluble e insoluble, respectivamente.

En la Figura 26 se observa que el perfil electroforético bajo condiciones desnaturizantes tiene mayor intensidad en las bandas de las 24 h y 72 h y la presencia de bandas por debajo de las bandas correspondientes a  $\alpha_2$ , con masas moleculares de alrededor de  $109.62 \pm 4.95$  kDa. Al comparar las cadenas  $\alpha_1$  bajo condiciones reductoras en estos tiempos, se observa que presentan mayor intensidad.

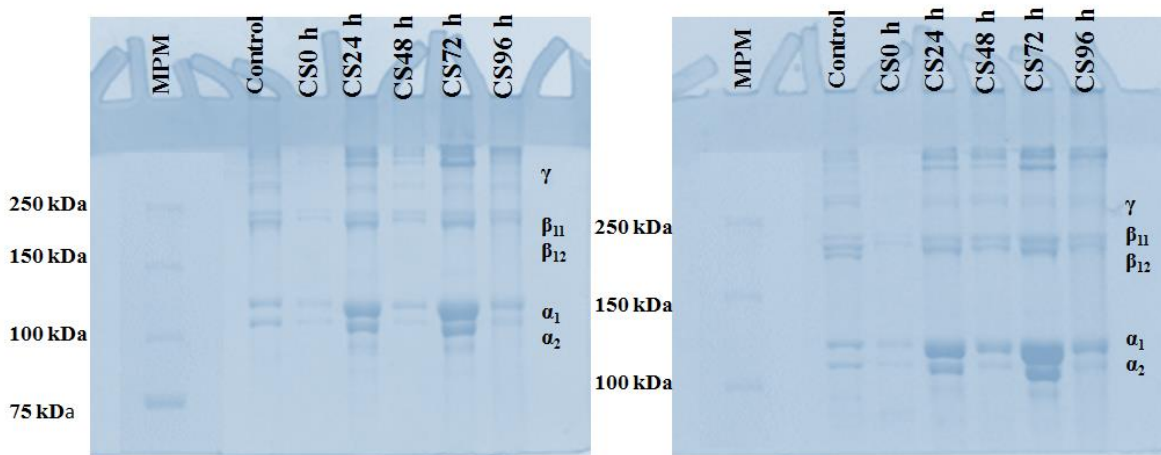


Figura 26. SDS PAGE al 6% de la comparación de la fracción soluble de colágeno con respecto al tiempo bajo condiciones desnaturalizantes (urea 3.5M y SDS 10%) (Izquierda) y reductoras (urea 3.5M, SDS 10% y  $\beta$ -mercaptoetanol 5%) (Derecha) extraídas del músculo cuádriceps femoral de conejos raza California de  $70 \pm 3$  días durante las 96 h *post-mortem*

La letra CS corresponde a fracción de colágeno soluble precedida por un número el cual indica el tiempo *post-mortem* de la extracción. La muestra control es de fibras de colágeno del tiempo 0 h. MPM: Precision All Blue (Bio Rad de 10 a 250 kDa)

La fracción soluble del colágeno se puede obtener a partir de diversos métodos, los que se basan en la adición de soluciones salinas, ácidos y/o enzimas, con un uso individual, secuencial o combinado (Nalinanon *et al.*, 2007; Sivakumar *et al.*, 1998; Mc Clain *et al.*, 1971a).

En esta investigación, con el fin de obtener las fracciones de colágeno se realizó la adición de pepsina en combinación con ácido acético debido a que esta enzima requiere pH bajo para llevar a cabo su actividad, la cual según Matmaroh y colaboradores (2011) y Nalinanon y colaboradores (2007) escinde en el dominio no helicoidal del telopéptido del tropocolágeno (región que se caracteriza por la formación de enlaces entrecruzados durante la interacción de moléculas de tropocolágeno en la conformación de fibras de colágeno).

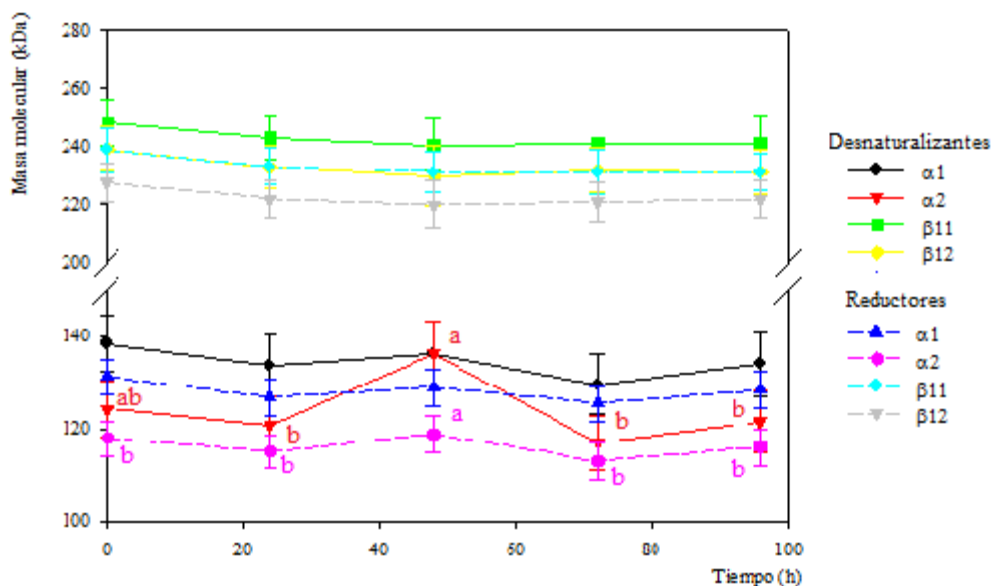


Figura 27. Masa molecular aparente (kDa) de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de la fracción soluble de colágeno bajo desnaturalizantes (Urea 3.5 M y SDS 10%) y condiciones reductoras (Urea 3.5 M, SDS 10% y  $\beta$ -mercaptoetanol 5%) del músculo cuádriceps femoral de conejos raza California de  $70 \pm 3$  días durante las 96 h *post-mortem*

<sup>a-c</sup>Prueba de Tukey significativamente diferente entre tratamientos ( $p > 0.05$ )

De acuerdo con la masa molecular, a las 48 h las cadenas  $\alpha_2$  para los patrones bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras presenta diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Mientras que las cadenas  $\alpha_1$ ,  $\beta_{11}$  y  $\beta_{12}$  son estadísticamente iguales con respecto al tiempo ( $p > 0.05$ ) (Figura 27) (Anexos 2 y 4).

En la Figura 28 se observan los valores de la concentración de cada una de las subunidades del colágeno bajo condiciones desnaturalizantes, donde las cadenas  $\alpha_1$  y  $\beta_{12}$  en los geles desnaturalizantes con respecto al tiempo son estadísticamente iguales ( $p > 0.05$ ) y las cadenas  $\alpha_2$  y  $\beta_{11}$  a las 24 h presentan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) (Figura 27). Mientras que bajo condiciones reductoras las cadenas  $\alpha_1$  son similares con respecto al tiempo ( $p > 0.05$ ) (Anexos 2 y 4).

En el patrón electroforético de las subunidades en condiciones reductoras se observa que las cadenas  $\alpha_1$  presentan mayor intensidad en comparación con las desnaturalizadas, esto se debe a que en el colágeno tipo III (colágeno fibrilar homotrimérico) las cadenas  $\alpha$  están unidas

por un enlace disulfuro. En 1979, un grupo de investigadores encabezados por Hayashi, realizó el perfil electroforético del colágeno tipo I, tipo III y una mezcla de estos, donde observó el enriquecimiento de las cadenas  $\alpha_1$  y  $\beta_{11}$  al adicionar un agente reductor al colágeno tipo III, con las condiciones utilizadas en la caracterización por electroforesis del colágeno fibrilar realizada por estos investigadores en la mezcla obtuvieron una banda superior a la que en este trabajo se denomina  $\alpha_1$ ; ellos la denominaron  $\alpha_1$  (III), sin embargo en esta investigación por la diferencia en las condiciones utilizadas las bandas obtenidas se denominaron de acuerdo con los patrones electroforéticos realizados en músculo esquelético por Wu (1982) y McClain (1971a y b) y la revisión realizada por Deyl y colaboradores (2000). Así mismo, Wu y colaboradores (1982) observaron que el aumento de la concentración de  $\alpha_1$  en las muestras con agentes reductores se debe a la presencia de colágeno tipo III en las muestras de colágeno intramuscular.

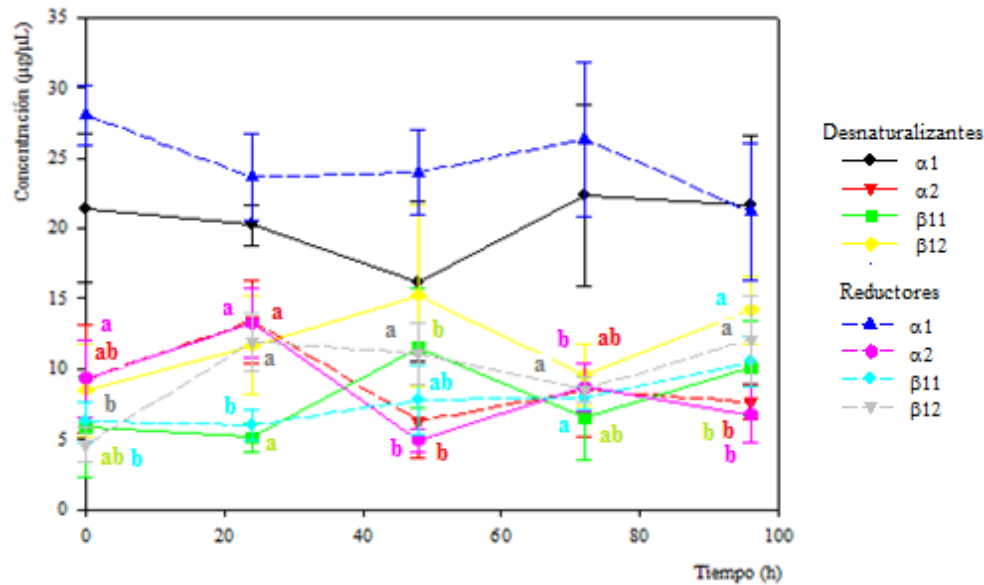


Figura 28. Concentración ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de la fracción soluble de colágeno bajo desnaturalizantes (Urea 3.5 M y SDS 10%) y condiciones reductoras (Urea 3.5 M, SDS 10% y  $\beta$ -mercaptoetanol 5%) del músculo cuádriceps femoral de conejos raza California de  $70 \pm 3$  días durante las 96 h *post-mortem*

<sup>a-c</sup>Prueba de Tukey significativamente diferente entre tratamientos ( $p > 0.05$ )



En general, la intensidad de cada una de las subunidades debería ser directamente proporcional con la concentración, sin embargo, al promediar los valores de las réplicas para cada tiempo, la variabilidad entre unidades experimentales (canal-miembro pelviano) así como entre los músculos que las constituyen, el intervalo de edades utilizadas en la investigación, la metodologías empleadas en la extracción de las fracciones y la preparación de estas para la electroforesis pudieron ser la causa de la variación entre estos.

Para el colágeno insoluble bajo condiciones desnaturalizantes, se observa la presencia de bandas a las 24 h, 48 h y 96 h por encima de las cadenas  $\alpha_1$ . Mientras que en los geles reductores se observa que estas bandas presentan mayor intensidad en comparación con los desnaturalizantes, al verse enriquecidas tal vez por cadenas sean provenientes de colágeno tipo III (Figura 29), lo que concuerda con el postulado de Wu (1982) y los trabajos de Hayashi, (1979).

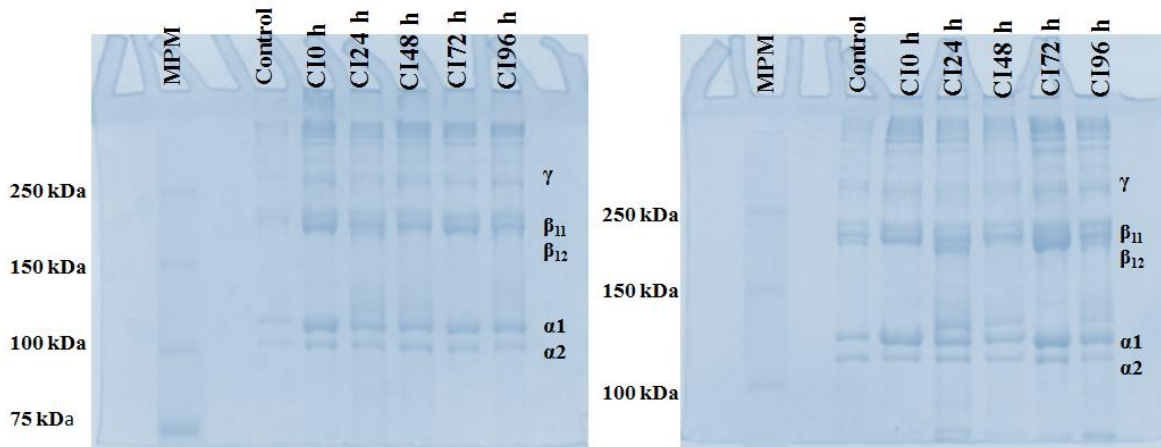


Figura 29. SDS PAGE al 6% de la comparación de la fracción insoluble de colágeno con respecto al tiempo bajo condiciones desnaturalizantes (urea 3.5M y SDS 10%) (Izquierda) y reductoras (urea 3.5M, SDS 10% y  $\beta$ -mercaptoetanol 5%) (Derecha) extraída del músculo cuádriceps femoral de conejos raza California de  $70 \pm 3$  días durante las 96 h *post-mortem*

La letra CI corresponde a fracción de colágeno insoluble precedida por un número el cual indica el tiempo *post-mortem* de la extracción. La muestra control es de fibras de colágeno del tiempo 0 h. MPM: Precision All Blue (Bio Rad de 10 a 250 kDa)

En la Figura 30, se encuentran los pesos moleculares de las subunidades que componen la fracción insoluble de colágeno, donde se observa que bajo condiciones desnaturalizantes las cadenas  $\alpha_1$  son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ). El resto de las cadenas no presentan diferencia estadísticas con respecto al tiempo ( $p > 0.05$ ) (Anexos 2 y 4).

Bajo condiciones reductoras, las cadenas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_{11}$  y  $\beta_{12}$  con respecto al tiempo fueron similares ( $p > 0.05$ ) (Figura 30) (Anexos 2 y 4).

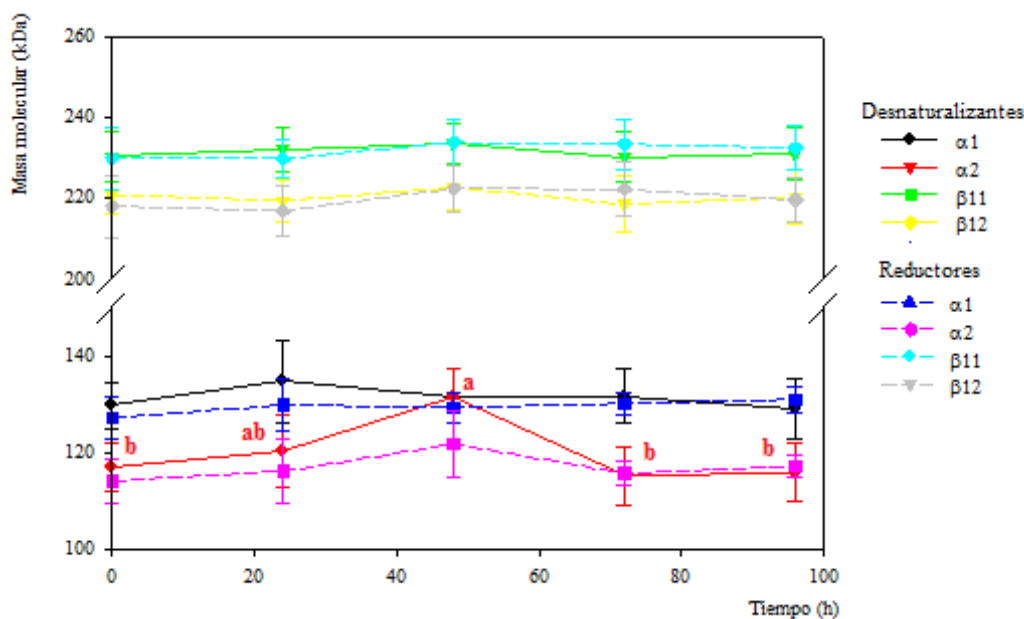


Figura 30. Masa molecular aparente (kDa) de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de la fracción insoluble de colágeno bajo desnaturalizantes (Urea 3.5 M y SDS 10%) y condiciones reductoras (Urea 3.5 M, SDS 10% y  $\beta$ -mercaptoetanol 5%) del músculo cuádriceps femoral de conejos raza California de  $70 \pm 3$  días durante las 96 h *post-mortem*

<sup>a-c</sup>Prueba de Tukey significativamente diferente entre tratamientos ( $p > 0.05$ )

En el patrón electroforético de las subunidades en condiciones reductoras se observa que las cadenas  $\alpha_1$  presentan mayor intensidad en comparación con las desnaturalizadas, esto se debe a que en el colágeno tipo III (colágeno fibrilar homotrimérico) las cadenas  $\alpha$  están unidas por un enlace disulfuro. En 1979, un grupo de investigadores encabezados por Hayashi, realizó el perfil electroforético del colágeno tipo I, tipo III y una mezcla de estos, donde

observó el enriquecimiento de las cadenas  $\alpha_1$  y  $\beta_{11}$  al adicionar un agente reductor al colágeno tipo III, con las condiciones utilizadas en la caracterización por electroforesis del colágeno fibrilar realizada por estos investigadores en la mezcla obtuvieron una banda superior a la que en este trabajo se denomina  $\alpha_1$ ; ellos la denominaron  $\alpha_{1(III)}$ , sin embargo en esta investigación por la diferencia en las condiciones utilizadas las bandas obtenidas se denominaron de acuerdo con los patrones electroforéticos realizados en músculo esquelético por los grupos encabezados Wu (1982) y McClain (1971a y b) y la revisión realizada por Deyl y colaboradores (2000). Así mismo, Wu y sus colaboradores (1982) observaron que el aumento de la concentración de  $\alpha_1$  en las muestras con agentes reductores se debe a la presencia de colágeno tipo III en las muestras de colágeno intramuscular.

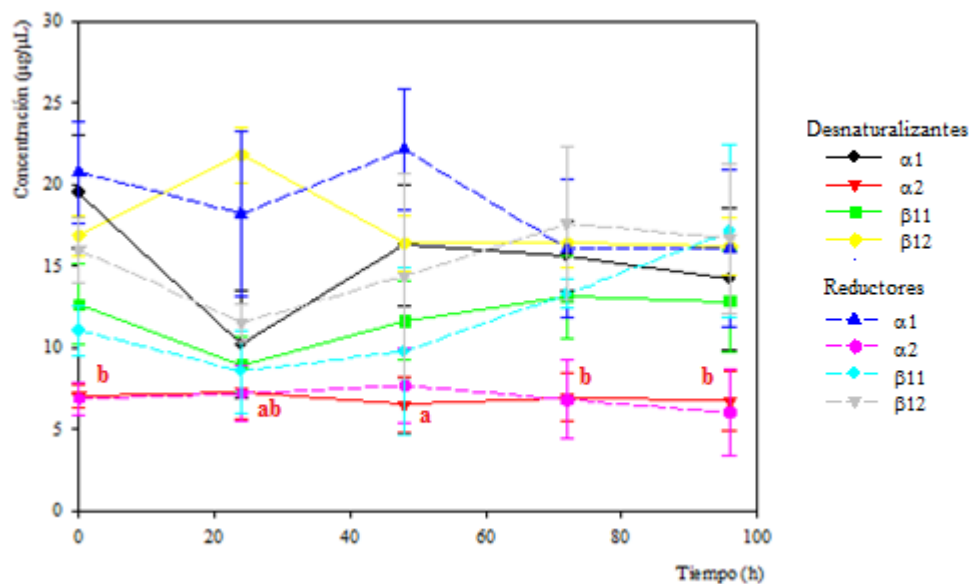


Figura 31. Concentración ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de la fracción insoluble de colágeno bajo desnaturalizantes (Urea 3.5 M y SDS 10%) y condiciones reductoras (Urea 3.5 M, SDS 10% y  $\beta$ -mercaptoetanol 5%) del músculo cuádriceps femoral de conejos raza California de  $70 \pm 3$  días durante las 96 h *post-mortem*

<sup>a-c</sup>Prueba de Tukey significativamente diferente entre tratamientos ( $p > 0.05$ )

En cuanto a la concentración de cada una de las subunidades (Figura 31), las cadenas  $\alpha_2$  son estadísticamente iguales bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras, las cadenas  $\alpha_1$

tienen diferencias significativas en los geles desnaturalizantes y en los geles reductores las cadenas  $\beta_{11}$  y  $\beta_{12}$  ( $p < 0.05$ ) (Anexos 2 y 4).

Las bandas que se encuentran por encima de la cadena  $\alpha_1$  podrían ser cadenas  $\alpha$  con la presencia de mayor número de aminoácidos; la generación de estos péptidos puede ser ocasionada por que el tratamiento con pepsina, la cual rompe enlaces entrecruzados del telopéptido (Nalinanon *et al.*, 2007), por ello durante la escisión del tropocolágeno la ruptura de algún enlace entrecruzado generaría la formación de cadenas con residuos de la interacción de estos enlaces. Estas cadenas se pueden relacionar con la presencia de bandas por debajo de la cadenas  $\alpha$  en el colágeno soluble que podrían ser aquellas que complementan a estas y por ello tienen menor peso molecular. O bien, de acuerdo con lo identificado por Hayashi y colaboradores (1979) estas bandas podrían ser cadenas  $\alpha_1$  (III) lo que sugiere que el uso de pepsina dejó expuesta la estructura del colágeno tipo III por ello bajo condiciones desnaturalizantes se observa ligeramente en el perfil electroforético y al adicionar el agente reductor se observa el enriquecimiento de estas bandas.

En investigaciones realizadas anteriormente, solo se realiza electroforesis de la fracción soluble de colágeno; en consecuencia, ninguno de los experimentos compara la fracción insoluble, por lo que no hay punto de referencia con los resultados obtenidos en este trabajo.

## Conclusiones

El colágeno tiene una estructura rígida insoluble en agua favorecida por la presencia de algunos aminoácidos polares que dan lugar a sus interacciones en el sistema cárnico. Es importante resaltar que en este trabajo se aplicaron diferentes métodos de extracción que permitieran la definición de los diferentes tipos de colágeno y sus fracciones, a lo largo de 96 h posteriores a la matanza, que permitieran dilucidar y relacionar los cambios que ocurren en cada tipo de colágeno y los cambios relacionados con el desarrollo del pH y su posible relación con la actividad metabólica y enzimática en el músculo cuádriceps femoral de conejos de la raza California. Las conclusiones del presente trabajo son.

1. La cinética de descenso de pH en el músculo cuádriceps femoral en un inicio tenía un pH de  $6.64 \pm 0.07$  y durante las primeras 24 h de  $5.75 \pm 0.10$ . A las 48 h de  $5.47 \pm 0.12$ , en las 72 h y 96 h el valor de pH aumenta paulatinamente ( $5.87 \pm 0.043$  y  $5.92 \pm 0.13$ , respectivamente).
2. La cantidad de colágeno en el músculo cuádriceps femoral de conejos de la raza California de  $70 \pm 3$  días de edad, fue en promedio de  $2.24 \pm 0.25$  mg/g. El comportamiento del colágeno total no presentó variación significativa con respecto al tiempo ( $p > 0.05$ ).
3. La desestabilización de las fibras de colágeno en la extracción de la fracción soluble de colágeno puede deberse a la temperatura alcanzada, que ocasiona el rompimiento de los enlaces aldimina y cetoamina. A las 96 h posteriores al sacrificio esta fracción, se obtuvo en mayor proporción en comparación con los tiempos restantes ( $p < 0.05$ ), lo que concuerda con la tendencia del colágeno insoluble y su concentración.
4. Al analizar el comportamiento del pH y relacionarlo con el del colágeno soluble, se observa que existen modificaciones que pueden estar relacionadas con la activación de los sistemas enzimáticos con actividad colagenolítica. Sin embargo, es necesario realizar investigación en torno a los cambios que generan estas enzimas durante la transformación de músculo en carne.

5. Las fibras de colágeno y sus fracciones soluble e insoluble obtenidas en condiciones desnaturalizantes y reductoras presentaron un perfil electroforético que corresponde a las subunidades  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{12}$ ,  $\gamma$  características del colágeno y los polímeros de masa molecular elevada. Sin embargo, el corrimiento de las muestras y modificaciones estructurales están relacionados con el uso de agentes desnaturalizantes (SDS), reductores ( $\beta$ -mercaptoetanol) y caotrópicos (urea).
6. En el patrón electroforético de las fibras de colágeno en condiciones reductoras, se observó la presencia de la cadena  $\beta_{22}$ , mientras que en el perfil reductor y no reductor de la fracción insoluble de colágeno, se observa la presencia de una banda que probablemente sea  $\alpha_{1(\text{III})}$ .
7. El uso de agente reductor en la electroforesis permitió confirmar la presencia de colágeno tipo III. Sin embargo las características estructurales del colágeno, no permitieron determinar si existe un efecto en la solubilidad del colágeno con respecto al tiempo mediante electroforesis.
8. Es necesario el uso de técnicas moleculares, espectrometría de masas, electroforesis bidimensional, microscopía electrónica, etc. para determinar si existe algún cambio estructural en el colágeno durante la transformación de músculo en carne.
9. Para dilucidar con mayor certeza cambios estructurales, se deberán tener las fracciones soluble e insoluble del tipo I y III que constituyen el colágeno muscular.

## Bibliografía

1. AOAC.2006. Official Methods of Analysis (16th Ed.) Assoc. Offic. Anal. Chem. Washington, DC.
2. Apata E.S. Enlolorunda, O. O. Amao K. E. and Okubanjo, A. O. 2012. Quality Evaluation of rabbit meat of affected by different stunning methods. *Int. J. Agric. Sci.* **2**(1): 54-58
3. Avery, N. C. and Bailey, A. J. 1995. An efficient method for the isolation of intramuscular collagen. *Meat Sci.* **1**(41):97-100
4. Bailey, A. J. 1985. The rol of collagen in the development of muscle and its relationship to eating quality. *J. Anim. Sci.* **60**(6):1580-1587
5. Balcerzak, D. Querengesser, L. Dixon, W. T. and Baracos, V. E. 2001. Coordinate expression of matrix-degrading proteinases and their activators and inhibitors in bovine skeletal muscle. *J Anim. Sci.* **79**:94-107
6. Beltran, J. A. Bonnet, M. and Ouali. A. 1992. Comparative action of cathepsins B and L on intramuscular collagen as assessed by differential scanning calorimetry. *Meat Sci.* **32**: 299-306
7. Bergman M. and Loxley R. 1963. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Anal Chem.* **35**(12): 1961-1965.
8. Bhattacharjee, A. y Bansak, M. 2005. Collagen structures: The mandras triple helix and the current scenario. *IUBMB* **57**(3): 161-172
9. Bizkova, K. and Tumova E. 2010. Physical characteristics of rabbit meat: a review. *Scientia, Agriculturae Bohemica.* **41**(4):236-241
10. Blasco, A. and Piles, M. 1990. Muscular pH of the rabbit. *Ann Zotech* **39**: 133-136
11. Bocard, R. L. Naudi, R. T. Cronje, D. E. Smit, M. C. Venter H. J. and Sossouw, E. J. 1979. The influence of age, sex and breed of cattle on their muscle characteristics. *Meat Sci.* **1979**:261-280
12. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254

13. Bromme, D. and Wilson, S. 2011. Role of Cysteine Cathepsins in Extracellular Proteolysis. En: Parcks, W. C. and Mecham, R. P. *Extracellular Matrix Degradation. Biology and Extracellular Matrix Volumen 2.* (pp: 23-33). Berlin. Springer
14. Burleigh, M. C. Barrett, A. J. and Lazarus, G. S. 1974. Cathepsin B: A lysosomal enzymethat degrades native collagen. *Biochem. J.* **137**: 378-398
15. Burson. D. E. y Hunt M. C. 1986. Heat-induced changes in the proportion of types I and III collagen in bovine *Longissimus dorsi*. *Meat Sci.* **17**: 153-160
16. Burson. D. E. Hunt M. C. Unruh, A. y Dikeman, M. E. 1986. Proportion of types I and III collagen in *Longissimus* collagen from bulls and steers. *J. Anim. Sci.* **64**:453-456
17. Canty, E. and Kadler, K. 2005. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J. Cell Sci.* **118**(7): 1341-1353
18. Chang, H. Wang, Q. Xu, X. Li, C. Haung, M. Zhou, G. and Dai, Y. 2011. Effect of heat-induced changes in the connective tissue and collagen on meat texture properties of beef semitendinosus muscle. *International. Journal of Food Properties.* **14**(2): 381-396
19. Combes, S. Lepetit, J. Darche, B. and Lebas, F. 2003. Effect of cooking temperature and cooking time on Warner–Bratzler tenderness measurement and collagen content in rabbit meat. *Meat Sci.* **66**: 91-96
20. Corino, C. Filetti, F. Gambacorta, M. Manchisi, A. Magni, S. Pastorelli, G. Rossi, R. Maiorano, G. 2003. Influence of dietary conjugated lionleic acids (CLA) and age at slaughtering on meat quality and intramuscular collagen in rabbits. *Meat Sci.* **66**:97-103
21. Cross, H. R. Schanbacher, B. D. and Crouse, J. B. 1984. Sex, age and breed related changes in bovine testosterone and intramuscular collagen. *Meat Sci.* **10**:187-195
22. De la Cruz, M. J. 2011. *Evaluación del pH, capacidad de retención de agua, color y dureza en el músculo Longissimus dorsi de conejo durante su transformación en carne* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. México
23. Deyl, Z. and Miksik, I. 2000. Advanced separations methods for collagen parent  $\alpha$ -chains their polymers and fragments. *J. of Chromatogr. B.* **739**:3-31
24. Dingle, J. T. 1973. The role of lysosomal enzymes in skeletal tissues. *The Journal of Bone and Joint Surgery.* **55B**: 87-95



25. Dingle, J. T. Barrett, A. J. and Weston, P. D. 1971. Cathepsin D: Characteristics of immunoinhibitor and the confirmation of a role in cartilage breakdown. *Biochem. J.* **123**:1-13
26. Etherington, D. J. 1976. Bovine spleen cathepsin B1 and collagenolytic cathepsin. *Biochem. J.* **153**: 199-209
27. Eyre D.R. and Wu J-J. 2005. Collagen Cross-Links. *Top Curr Chem.* **247**: 207–229
28. Fujii, K. and Murota, K. 1982. Isolation of skeletal muscle collagen. *Anal. Biochem.* **127**:449-452
29. Furthmayr, H. and Timpl, R. 1971. Characterization of collagen peptides by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide electrophoresis. *Anal. Biochem.* **41**: 510-516.
30. Gelse, K. Pöschl, E. and Aigner, T. 2003. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews.* **55** :1531– 1546
31. Gilbreath, R. L. Thompson, R. W. Vander Noot and Elliott, R. E. 1972. Influence of dietary protein on the soluble collagen of porcine skin and muscle. *J. of Ani. Sci.* **6**(34):952-956
32. Hall, J. B. and Hunt, M. C. 1982. Collagen solubility of a-maturity bovine *Longissimus* muscle as affected by nutritional regimen. *J. Anim. Sci.* **55**(2): 321-328
33. Hayashi, T. and Nagai, Y. 1979. Separation of the alpha chains of type I and III collagens by SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *J. Biochem.* **86**:453-459
34. Hulot, F. and Ouhayoun, J. 1999. Muscular pH and related traits in rabbits: review. *W. Rabbit. Sci.* **7**(1):15-36
35. Hulmes, D.J.S. 2005. Collagen diversity, synthesis and assembly. En Fratzl, P. *Collagen structure and mechanics* (pp: 25). USA. Editorial Springer
36. Hunsley, R. E. Vetter, R. L. Kline E. A. and Burroughs W. 1971. Effects of age and sex on quality, tenderness and collagen content of bovine *Longissimus* muscle. *J. Anim. Sci.* **33**(5): 933-938
37. Jeremiah, L. E. and Martin, H. A. 1981. Intramuscular collagen content and solubility: their relationship to tenderness and alteration by post-mortem aging. *Can. J. Anim. Sci.* **61**:53-61

38. Kadler, K. E. Holmes, D. F. Trotter, J. A. and Chapman J. A. 1996. Review: Collagen fibril formation. *Biochem J.* **316**:1-11
39. Kadler, K. Baldock, C. Bella, J. and Boot-Handford, R. 2007. Collagens at a glance. *J. Cell Biol.* **120**(12): 1955-1958
40. Kemp, C. M. Sensky, P. L. Bardsley, R. G. Buttery, P. J. and Parr, T. 2010. Review. Tenderness- A enzymatic view. *Meat Sci.* **84**: 248-256
41. Klont, R. E. Brocks, L. and Eikelenboom G. 1998. Muscle fibre type and meat quality. *Meat Sci.* **49**(1): S219-S229
42. Koivu, J. 1987a. Disulfide bonding as a determination of the molecular composition of types II and III procollagen. *J. FEBS L.* **212**(2): 216-220
43. Koivu, J. 1987b. Identification of disulfide bonds in carboxyl-terminal propeptides of human type I procollagen. *J. FEBS L.* **212**(2): 229-232
44. Koohmaraie M. 1994. Muscle proteinases and meat aging. *Meat Science.* **36**: 93-104
45. Kühn, K. 1985. Structure and biochemistry of collagen. *Aesth. Plast. Surg.* **91**:141-144
46. Light, N. Champion, A. E. Voyle C. and Bailey, A. J. 1985. The role of epimysial, perimysial and endomysial collagen in determining texture in six bovine muscles. *Meat Sci.* **13**:137-149
47. Laeemli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-685
48. Mayne, R. and Breakton, R. 1993. New members of the collagen superfamily. *Curr. Biol.* **5**:883-890
49. Mayne, R. and Sanderson, R. D. 1985. The extracellular matrix of skeletal muscle. *Collagen Rel. Res.* **5**: 449-468
50. McClain, P. E. Creed, G. J. Wiley, E. R and Gerrits, R. J. 1970. Cross-linking characteristics of collagen from porcine intramuscular connective tissue: variation between muscle. *Biochim. Biophys. Acta.* **221**: 349-356
51. McClain, P. E. Wiley, E. R. Bodwell, C. E: and Hornsrein, I 1971a. Amino-acid composition and cross-linking characteristics of collagen from intramuscular connective tissue of striated muscle (*Bos Taurus*).. *Int J. Biochem.* **2**:121-124

52. McClain, P. E. Wiley, E. R. and McCague, K. E. 1971b. Species variation in the cross-linking characteristics of collagen from the intramuscular connective tissues of striated muscle (*Bos Taurus*, *Ovis Aries*, *Sus Scrofa*). *Int J. Biochem.* **2**:167-172
53. McCormick, R. J. 1999. Extracellular modifications to muscle collagen: implications for meat quality. *Poul Sci.* **78**:785-791
54. Mills, E. W. Smith, S. H. Forrest, J.C. Aberle, E. D. and Jugde, M. D. 1989a. Effects of early post-mortem ageing on intramuscular collagen stability, yield and composition. *Meat Sci.* **25**:133-141
55. Mills, E. W. Smith, S. H. and Jugde, M. D. 1989b. Early post-mortem degradation of intramuscular collagen. *Meat Sci.* **26**:115-120
56. Nagase, H. Visse, R. and Murphy, G. 2006. Review: Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardio Research.* **69**:562 – 573
57. Nalinanon, S. Benjakul, S. Visessanguan, W. Kishimura, H. 2007. Use of pepsin for collagen extraction from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chem.* **104**:593-601
58. Nishimura, T. 2010. The role of intramuscular connective tissue in meat texture. *Anim. Sci. J.* **81**:21-27
59. Ouali, A. 1992. Proteolytic and physicochemical mechanisms involved in meat texture development. *Biochimie.* **74**(3):251-265
60. Ouhayoun, J. and Dalle Z. A. 1996. Harmonization of muscle and meat criteria in rabbit meat research. *World Rabbit Sci.* **4**(4):211-218
61. Pascual, M and Pla, M. 2008. Changes in collagen, texture and sensory properties of meat when selecting rabbits for growth rate. *Meat Sci.* **78**:375-380
62. Peter, J. B Barnard, R: J. Edgerton, V R. Gillespie, C. A. and Stempel, K. E. 1972. Metabolic profiles of three fibers types of skeletal muscle in Guinea pigs and rabbits. *Biochem.* **11**(14): 2627-2633
63. Pindur, U. 1978. Zur farbreaktion von hydroxiprolin mit 4-dimethylaminobenzaldehyd. *Z. Lebensm. Unter-Forsch.* **166**:148-150
64. Powell, T. H. Hunt, M. C. and Dikeman, M. E. 2000. Enzymatic assay to determine collagen thermal denaturation and solubilization. *Meat Sci.* **54**:307-311

65. Prost, E. Pelczynska y Kotula, A. W. 1975. Quality characteristics of bovine meat. I. Content of connective tissue in relation to individual muscles, age and sex of animals and carcass quality grade. *J. Anim. Sci.* **41**(2): 534-540
66. Purslow, P. P. 2005. Intramuscular connective tissue and its role in meat quality. *Meat Sci.* **70**:435-477
67. Purslow, P. P. 2014. New developments on the role of intramuscular connective tissue in meat toughness. *Annu. Rev. Food. Sci. Technol.* **5**:133-153
68. Purslow, P. P. Archile-Contreras, A. C. and Cha, M. C. 2012. Meat science and muscle biology symposium: Manipulating meat tenderness by increasing the turnover of intramuscular connective tissue. *J. Anim. Sci.* **90**:950-959
69. Ramachandra, G. Bansal, M. and Bathnagar, R. 1973. A hypothesis on the role of hydroxiprolin in the stabilizing collagen structure. *Biochim Biophys Acta.* **322**: 166-171
70. Ramshaw, J. Shah, K. and Brosky, B. Gly-X-Y tripeptides frequencies in collagen: A context for host-guest triple-helical peptides. *J. Struc. Biol.* **122**: 86-91
71. Rich, A y Crick, F. H, 1961. The molecular structure of collagen. *J. Mol. Biol.* **3**: 483-506
72. Sentandreu, M. A. Coulis, G. and Ouali, A. 2002. Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends in Food Sci. and Tech.* **13**:400-421
73. Schaefer, A. L. Dubeski, P. L. Aalhus, J. L. and Tong, A. K. 2001. Role nutrition in reducing antemortem stress and meat quality aberrations. *J. Anim. Sci.* **79**: E91-E101
74. Shoulders, M. D. and Raines, R. T. 2009. Collagen structure and stability. *Annu. Rev. Biochem.* **78**:929-958
75. Siegel, R. C. 1976. Collagen cross-linking. *The J. of Bio. Chem.* **251**(18):5786-5792
76. Silva, J. A. Patarata L. and Martins, C. 1999. Influence of ultimate pH of bovine meat tenderness during ageing. *Meat Sci.* **52**: 453-459
77. Sivakumar, P. and Chandrakasa, G. 1998. Occurrence of a novel collagen with three distinct chains in the cranial cartilage of the squid *Sepia officinalis*: comparison with shark cartilage collagen. *Biochim Biophys Acta.* **1381**:161-169
78. Snoek van, P. A. and Von den Voff, J. W. 2005. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Bio Techniques.* **38**(1):73-83

79. Sociedad Argentina de Histotecnología. (17 de abril de 2014). *Síntesis de colágeno*.  
<http://www.ht.org.ar/histologia/NUEVAS%20UNIDADES/unidades/unidad3/sincola.htm>
80. Strickland, R. D. 1974. Electrophoresis. *Anal Chem* **46**(5): 95R-100R
81. Sylvestre, M. N. Balcerzak, D. Feidt, C. Baracos, V. E. and Bellut J. B. 2002. Elevated rate of collagen solubilization and postmortem degradation in muscles of lambs with high growth rates: Possible relationship with activity of matrix metalloproteinases. *J. Anim. Sci.* **80**:1871-1878
82. Van der Rest, M and Garrone, R. 1990. Collagens as multidomain proteins. *Biochimie.* **72**:473-484
83. Van der Rest, M. and Garrone, R. 1991. Collagen family of proteins. *The FASEB J.* **5**:2814-2823
84. Weston, A. R. Rogers, R. W. and Althen, T. G. 2002. Review: The role of collagen in meat tenderness. *The Professional Animal Scientifics.* **18**:107-111
85. Wu, J. J. Dutson, T. R. and Carpenter, Z. L. 1982. Effect of post-mortem and temperature on bovine intramuscular collagen. *Meat Sci.* **7**:161-168
86. Yamauchi, Mitsuo and Shiiba Masashi. 2008. Lysine hydroxylation and crosslinking of collagen. En Kannicht, C. *Methods in molecular biology*. (pp: 95-108). USA. Humana Press

Anexos

Anexo 1. Resumen de resultados

Cuadro I. Resumen de resultados de pH, CT, CTc, CI, CS y %CS del músculo cuádriceps femoral de conejos raza California de 70±3 días durante las 96 h *post-mortem*

Valor	Tiempo (h)				
	0	24	48	72	96
pH	6.64±0.07 a	5.75±0.10 b	5.47±0.12 c	5.87±0.04 b	5.92±0.13 b
CT	2.17±0.13	2.14±0.30	2.33±0.23*	2.30±0.32	2.28±0.24*
CTc	2.17±0.20	2.31±0.30*	2.07±0.26	2.17±0.10	2.18±0.13 <sup>+</sup>
CI	1.99±0.17a	1.88±0.23ab*	1.77±0.24ab*	2.00±0.1a	1.57±0.19b* <sup>+</sup>
CS	0.19±0.04bc	0.44±0.11ab	0.29±0.07bc	0.16±0.01c	0.61±0.13a
%CS	8.62±1.366c	18.59±2.59b	14.55±3.16b	7.50±0.71c	28.18±5.62a

<sup>a-c</sup>Prueba de Tukey significativamente diferentes entre tiempos (p>0.05)

<sup>\*,+</sup>Prueba de Tukey significativamente diferente entre tiempos (p>0.05)

Anexo 2

Cuadro II. Masa molecular aparente (kDa) de los monómeros y dímeros de fibras de colágeno bajo condiciones desnaturalizantes (Urea 3.5 M, SDS 10%) y reductoras (Urea 3.5 M, SDS 10% y  $\beta$ -mercaptoetanol 5%) del músculo cuádriceps femoral de conejos raza California de 70 $\pm$ 3 días durante las 96 h *post-mortem*

Cadenas	Tiempo (horas)				
	0	24	48	72	96
Desnaturalizantes					
$\alpha_1$	139.63 $\pm$ 1.53b	136.99 $\pm$ 1.21c	144.72 $\pm$ 1.79a	139.52 $\pm$ 2.14b	138.04 $\pm$ 1.81bc
$\alpha_2$	122.83 $\pm$ 1.67b	123.86 $\pm$ 6.95ab	127.51 $\pm$ 1.39a	123.81 $\pm$ 2.50b	124.88 $\pm$ 6.16ab
$\beta_{11}$	249.29 $\pm$ 3.07b	241.83 $\pm$ 2.13c	254.12 $\pm$ 3.27a	243.02 $\pm$ 3.57c	241.29 $\pm$ 2.22c
$\beta_{12}$	235.76 $\pm$ 2.63b	226.73 $\pm$ 3.55c	241.21 $\pm$ 4.25a	230.78 $\pm$ 6.14c	229.05 $\pm$ 2.42c
Reductores					
$\alpha_1$	138.21 $\pm$ 0.08	137.28 $\pm$ 1.51	136.37 $\pm$ 1.13	138.24 $\pm$ 2.54	137.32 $\pm$ 1.96
$\alpha_2$	122.02 $\pm$ 2.04	121.44 $\pm$ 2.25	120.84 $\pm$ 2.34	124.01 $\pm$ 1.01	122.59 $\pm$ 1.44
$\beta_{11}$	244.69 $\pm$ 15.28	245.50 $\pm$ 14.56	243.40 $\pm$ 14.10	248.42 $\pm$ 16.34	247.51 $\pm$ 16.98
$\beta_{12}$	231.25 $\pm$ 10.73	232.04 $\pm$ 11.81	230.54 $\pm$ 11.79	236.77 $\pm$ 14.17	236.75 $\pm$ 14.78

<sup>a-c</sup>Prueba de Tukey significativamente diferente entre tratamientos (P<0.05)

Cuadro III. Concentración ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) de los monómeros y dímeros de fibras de colágeno bajo condiciones desnaturalizantes (Urea 3.5 M, SDS 10%) y reductoras (Urea 3.5 M, SDS 10% y  $\beta$ -mercaptoetanol 5%) del músculo cuádriceps femoral de conejos raza California de  $70\pm 3$  días durante las 96 h *post-mortem*

Cadenas	Tiempo (horas)				
	0	24	48	72	96
Desnaturalizantes					
$\alpha_1$	13.26 $\pm$ 0.852	15.65 $\pm$ 2.156	15.03 $\pm$ 1.666	16.35 $\pm$ 1.758	16.31 $\pm$ 1.299
$\alpha_2$	10.44 $\pm$ 0.46b	11.61 $\pm$ 1.42ab	12.19 $\pm$ 0.73a	12.63 $\pm$ 1.52a	12.22 $\pm$ 1.13ab
$\beta_{11}$	8.53 $\pm$ 0.982	8.43 $\pm$ 0.6	7.03 $\pm$ 0.606	8.01 $\pm$ 0.921	9.04 $\pm$ 1.459
$\beta_{12}$	17.50 $\pm$ 0.83	20.15 $\pm$ 1.98	18.98 $\pm$ 3.37	18.35 $\pm$ 2.25	15.73 $\pm$ 2.55
Reductores					
$\alpha_1$	16.57 $\pm$ 5.89	12.81 $\pm$ 5.68	12.81 $\pm$ 2.19	16.00 $\pm$ 3.77	20.14 $\pm$ 3.98
$\alpha_2$	15.482 $\pm$ 4.29	12.155 $\pm$ 3.33	10.865 $\pm$ 1.98	12.594 $\pm$ 3.26	13.660 $\pm$ 2.17
$\beta_{11}$	9.80 $\pm$ 2.88	6.59 $\pm$ 1.88	7.02 $\pm$ 2.54	7.43 $\pm$ 2.58	9.79 $\pm$ 2.08
$\beta_{12}$	12.19 $\pm$ 3.69	14.38 $\pm$ 7.27	14.41 $\pm$ 5.84	19.45 $\pm$ 5.62	16.92 $\pm$ 2.97

<sup>a</sup>Prueba de Tukey significativamente diferente entre tratamientos (P<0.05)



Cuadro IV. Masa molecular aparente (kDa) de los monómeros y dímeros de la fracción soluble de colágeno bajo condiciones desnaturalizantes (Urea 3.5 M, SDS 10%) y reductoras (Urea 3.5 M, SDS 10% y  $\beta$ -mercaptoetanol 5%) del músculo cuadriceps femoral de conejos raza California de  $70 \pm 3$  días durante las 96 h *post-mortem*

Cadenas	Tiempo (horas)				
	0	24	48	72	96
Desnaturalizantes					
$\alpha_1$	138.43 $\pm$ 6.06	133.61 $\pm$ 6.81	136.3 $\pm$ 6.83	129.60 $\pm$ 6.41	134.03 $\pm$ 6.85
$\alpha_2$	124.30 $\pm$ 6.17ab	120.86 $\pm$ 6.04b	136.30 $\pm$ 6.83a	117.12 $\pm$ 5.79b	121.50 $\pm$ 6.72b
$\beta_{11}$	247.98 $\pm$ 8.08	242.98 $\pm$ 7.51	240.42 $\pm$ 8.98	240.87 $\pm$ 0.08	241.16 $\pm$ 9.11
$\beta_{12}$	238.95 $\pm$ 7.64	232.77 $\pm$ 7.15	229.80 $\pm$ 10.32	231.84 $\pm$ 7.38	231.15 $\pm$ 7.88
Reductores					
$\alpha_1$	131.30 $\pm$ 3.71	126.84 $\pm$ 4.05	129.00 $\pm$ 3.93	125.53 $\pm$ 3.76	128.42 $\pm$ 4.02
$\alpha_2$	118.01 $\pm$ 3.72b	115.14 $\pm$ 3.57b	129.00 $\pm$ 3.93a	113.03 $\pm$ 3.94b	116.16 $\pm$ 3.69b
$\beta_{11}$	238.69 $\pm$ 7.64	233.07 $\pm$ 6.47	231.14 $\pm$ 7.21	231.14 $\pm$ 7.63	231.07 $\pm$ 6.49
$\beta_{12}$	227.50 $\pm$ 6.92	221.97 $\pm$ 6.18	219.95 $\pm$ 8.28	220.94 $\pm$ 6.85	221.68 $\pm$ 6.41

<sup>a-c</sup>Prueba de Tukey significativamente diferente entre tratamientos (p>0.05)

Cuadro V. Concentración ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) de los monómeros y dímeros de la fracción soluble de colágeno bajo condiciones desnaturalizantes (Urea 3.5 M, SDS 10%) y reductoras (Urea 3.5 M, SDS 10% y  $\beta$ -mercaptoetanol 5%) del músculo cuadriceps femoral de conejos raza California de  $70\pm 3$  días durante las 96 h *post-mortem*

Cadenas	Tiempo (horas)				
	0	24	48	72	96
Desnaturalizantes					
$\alpha_1$	21.41 $\pm$ 5.26	20.21 $\pm$ 1.45	16.17 $\pm$ 5.71	22.33 $\pm$ 6.45	21.61 $\pm$ 4.99
$\alpha_2$	9.27 $\pm$ 3.80ab	13.38 $\pm$ 2.93a	6.27 $\pm$ 2.64b	8.45 $\pm$ 3.29ab	7.64 $\pm$ 1.21b
$\beta_{11}$	5.80 $\pm$ 3.56ab	5.11 $\pm$ 1.06a	11.46 $\pm$ 4.24b	6.51 $\pm$ 3.05ab	10.06 $\pm$ 3.36b
$\beta_{12}$	8.49 $\pm$ 3.29	11.68 $\pm$ 3.50	15.22 $\pm$ 6.42	9.56 $\pm$ 2.19	14.16 $\pm$ 2.44
Reductores					
$\alpha_1$	28.04 $\pm$ 2.12	23.61 $\pm$ 3.05	23.96 $\pm$ 3.03	26.34 $\pm$ 5.46	21.16 $\pm$ 4.84
$\alpha_2$	9.33 $\pm$ 2.77a	13.26 $\pm$ 2.44a	4.93 $\pm$ 0.81b	8.69 $\pm$ 1.74b	6.73 $\pm$ 1.97b
$\beta_{11}$	6.26 $\pm$ 1.44b	5.99 $\pm$ 1.13b	7.79 $\pm$ 2.50ab	7.96 $\pm$ 0.82a	10.49 $\pm$ 1.80a
$\beta_{12}$	4.60 $\pm$ 1.26b	11.92 $\pm$ 2.09a	11.08 $\pm$ 2.22a	8.53 $\pm$ 0.83a	12.10 $\pm$ 3.13a

<sup>a-c</sup>Prueba de Tukey significativamente diferente entre tratamientos ( $p > 0.05$ )

Cuadro VI. Masa molecular aparente (kDa) de los monómeros y dímeros de la fracción insoluble de colágeno bajo condiciones desnaturalizantes (Urea 3.5 M, SDS 10%) y reductoras (Urea 3.5 M, SDS 10% y  $\beta$ -mercaptoetanol 5%) del músculo cuadriceps femoral de conejos raza California de 70 $\pm$ 3 días durante las 96 h *post-mortem*

Cadenas	Tiempo (horas)				
	0	24	48	72	96
Desnaturalizantes					
$\alpha_1$	129.63 $\pm$ 4.63	134.62 $\pm$ 8.39	131.59 $\pm$ 5.63	131.59 $\pm$ 5.63	128.91 $\pm$ 6.12
$\alpha_2$	117.03 $\pm$ 4.95b	120.28 $\pm$ 7.33ab	131.59 $\pm$ 5.67a	115.13 $\pm$ 5.98b	115.78 $\pm$ 5.93b
$\beta_{11}$	230.24 $\pm$ 6.45	232.17 $\pm$ 5.54	233.42 $\pm$ 5.04	230.19 $\pm$ 6.38	230.99 $\pm$ 6.48
$\beta_{12}$	220.73 $\pm$ 4.87	219.28 $\pm$ 5.20	222.51 $\pm$ 5.63	218.48 $\pm$ 6.96	220.08 $\pm$ 6.77
Reductores					
$\alpha_1$	127.08 $\pm$ 4.35	129.80 $\pm$ 5.50	129.27 $\pm$ 3.25	130.09 $\pm$ 2.21	130.92 $\pm$ 2.73
$\alpha_2$	114.02 $\pm$ 4.63	116.15 $\pm$ 6.79	121.69 $\pm$ 6.82	115.64 $\pm$ 2.55	117.14 $\pm$ 2.41
$\beta_{11}$	229.78 $\pm$ 7.72	229.71 $\pm$ 4.88	233.75 $\pm$ 5.84	233.28 $\pm$ 6.40	232.41 $\pm$ 5.44
$\beta_{12}$	217.89 $\pm$ 7.73	216.75 $\pm$ 6.03	222.35 $\pm$ 5.68	222.13 $\pm$ 6.87	219.51 $\pm$ 5.32

<sup>a-c</sup>Prueba de Tukey significativamente diferente entre tratamientos (p>0.05)

Cuadro VII. Concentración ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) de los monómeros y dímeros de la fracción insoluble de colágeno bajo condiciones desnaturalizantes (Urea 3.5 M, SDS 10%) y reductoras (Urea 3.5 M, SDS 10% y  $\beta$ -mercaptoetanol 5%) del músculo cuadríceps femoral de conejos raza California de  $70\pm 3$  días durante las 96 h *post-mortem*

Cadenas	Tiempo (horas)				
	0	24	48	72	96
Desnaturalizantes					
$\alpha_1$	129.63 $\pm$ 4.63	134.62 $\pm$ 8.39	131.59 $\pm$ 5.63	131.59 $\pm$ 5.63	128.91 $\pm$ 6.12
$\alpha_2$	117.03 $\pm$ 4.95 <sup>b</sup>	120.28 $\pm$ 7.33 <sup>ab</sup>	131.59 $\pm$ 5.67 <sup>a</sup>	115.13 $\pm$ 5.98 <sup>b</sup>	115.78 $\pm$ 5.93 <sup>b</sup>
$\beta_{11}$	230.24 $\pm$ 6.45	232.17 $\pm$ 5.54	233.42 $\pm$ 5.04	230.19 $\pm$ 6.38	230.99 $\pm$ 6.48
$\beta_{12}$	220.73 $\pm$ 4.87	219.28 $\pm$ 5.20	222.51 $\pm$ 5.63	218.48 $\pm$ 6.96	220.08 $\pm$ 6.77
Reductores					
$\alpha_1$	127.08 $\pm$ 4.35	129.80 $\pm$ 5.50	129.27 $\pm$ 3.25	130.09 $\pm$ 2.21	130.92 $\pm$ 2.73
$\alpha_2$	114.02 $\pm$ 4.63	116.15 $\pm$ 6.79	121.69 $\pm$ 6.82	115.64 $\pm$ 2.55	117.14 $\pm$ 2.41
$\beta_{11}$	229.78 $\pm$ 7.72	229.71 $\pm$ 4.88	233.75 $\pm$ 5.84	233.28 $\pm$ 6.40	232.41 $\pm$ 5.44
$\beta_{12}$	217.89 $\pm$ 7.73	216.75 $\pm$ 6.03	222.35 $\pm$ 5.68	222.13 $\pm$ 6.87	219.51 $\pm$ 5.32

<sup>a-c</sup>Prueba de Tukey significativamente diferente entre tratamientos ( $p>0.05$ )

### Anexo 3. Patrón electroforético de colágeno

En la Figura I se observa el efecto que tiene el uso de urea (agente caotrópico) en el corrimiento de las bandas de colágeno tipo I y tipo III, de acuerdo con el protocolo de Hayashi *et al.*, 1979.



Figura I. SDS PAGE al 5% de mezcla de colágeno tipo I y tipo III de piel de ternero en presencia de varias concentraciones de urea con Tris-glicina pH 8.8. Concentraciones de urea: 0M (1), 1M (2), 2M (3), 4 M (5), 5 M (6), 5.8 M (7) y 8 M (8). Fuente: Hayashi *et al.*, 1979

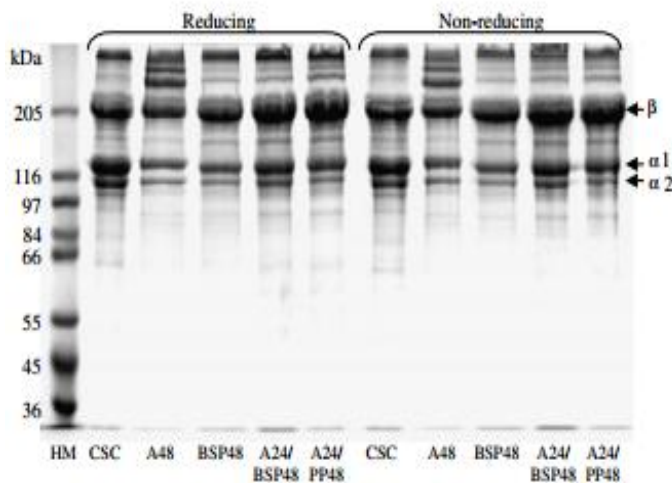


Figura II. SDS PAGE al 7.5% de colágeno extraído de la piel del pardo patudo. A48: Colágeno extraído con ácido durante 48 h. BSPA48: Colágeno extraído con ácido y pepsina del estómago del pardo patudo (20 kUnidades/g) por 48 h. A24/BSP48: Colágeno extraído 24 h con ácido y con pepsina del estómago del pardo patudo por 48 h. A24/PP48: Colágeno extraído con ácido y pepsina del estómago del pardo patudo (20 kUnidades/g) por 48 h. HM: Marcador de peso molecular. CSC: Colágeno tipo I. Fuente: Nalinanon *et al.*, 2007-

Anexo 4. Gráficos del Análisis Estadístico de SDS PAGE

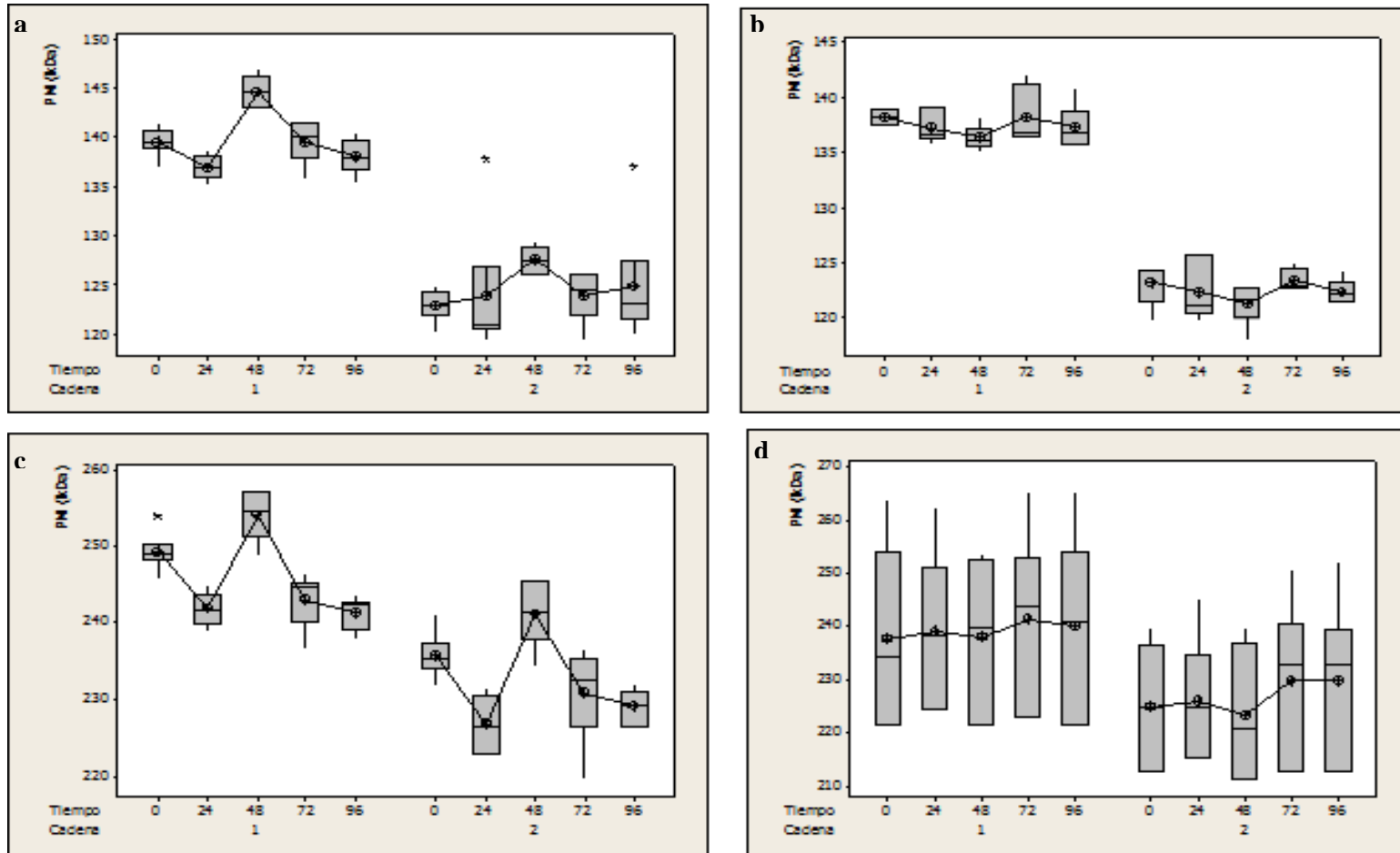


Figura III. ANOVA de 2 vías de la masa molecular (kDa) de las subunidades de las fibras de colágeno del músculo cuadriceps femoral de conejos raza California de  $70 \pm 3$  días durante las 96 h *post-mortem* ( $\alpha$ : 0.05). a. Cadena  $\alpha$  bajo condiciones desnaturalizantes. b. Cadena  $\alpha$  bajo condiciones reductoras. c. Cadena  $\beta$  bajo condiciones desnaturalizantes. d. Cadena  $\beta$  bajo condiciones reductoras

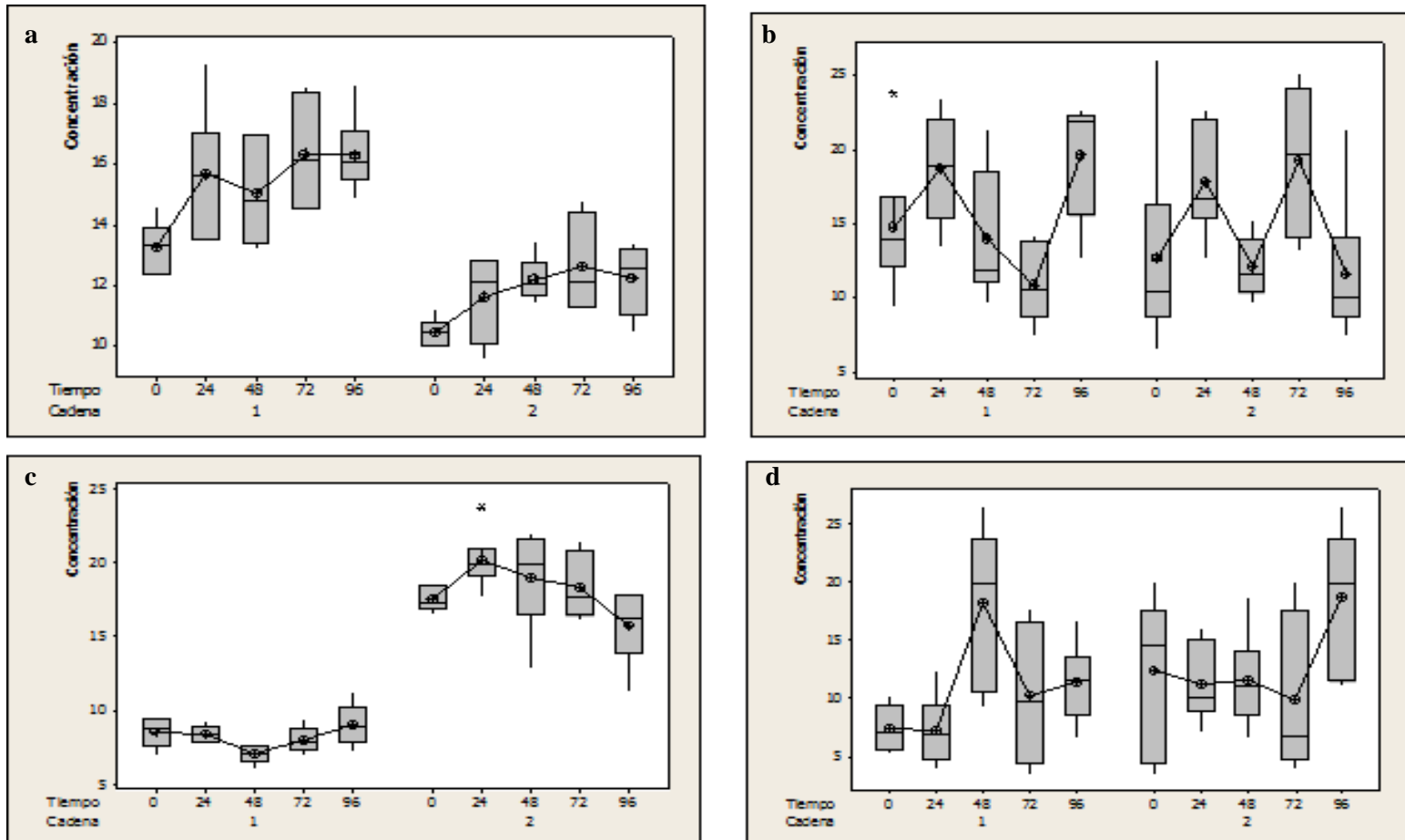


Figura IV. ANOVA de dos vías de la concentración ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) de las subunidades de las fibras de colágeno del músculo cuádriceps femoral de conejos raza California de  $70 \pm 3$  días durante las 96 h *post-mortem* ( $\alpha$ : 0.05). a. Cadena  $\alpha$  bajo condiciones desnaturalizantes. b. Cadena  $\alpha$  bajo condiciones reductoras. c. Cadena  $\beta$  bajo condiciones desnaturalizantes. d. Cadena  $\beta$  bajo condiciones reductoras

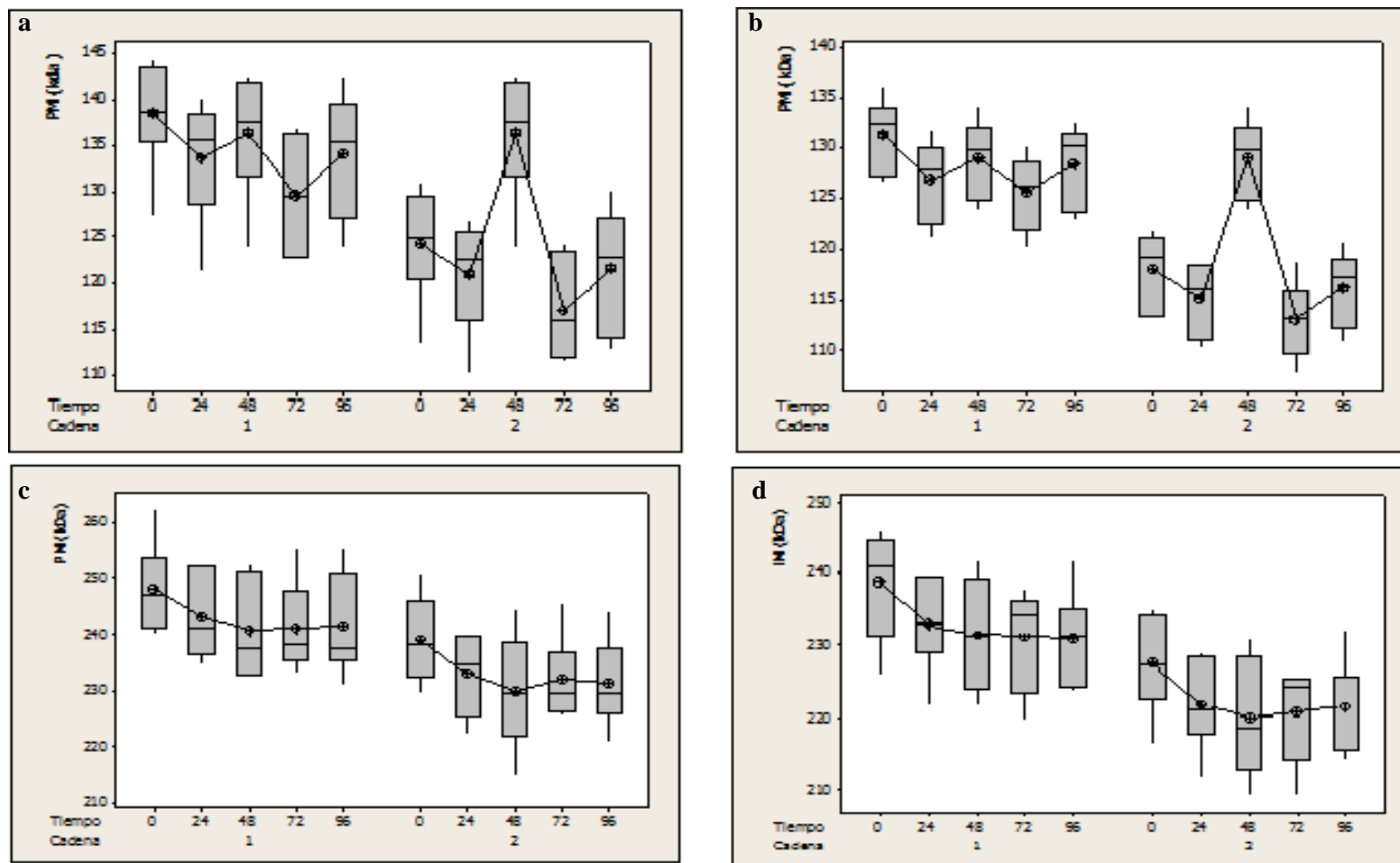


Figura V. ANOVA de dos vías de la masa molecular (kDa) de las subunidades del colágeno soluble del músculo cuádriceps femoral de conejos raza California de  $70 \pm 3$  días durante las 96 h *post-mortem* ( $\alpha$ : 0.05). a. Cadena  $\alpha$  bajo condiciones desnaturalizantes. b. Cadena  $\alpha$  bajo condiciones reductoras. c. Cadena  $\beta$  bajo condiciones desnaturalizantes. d. Cadena  $\beta$  bajo condiciones reductoras



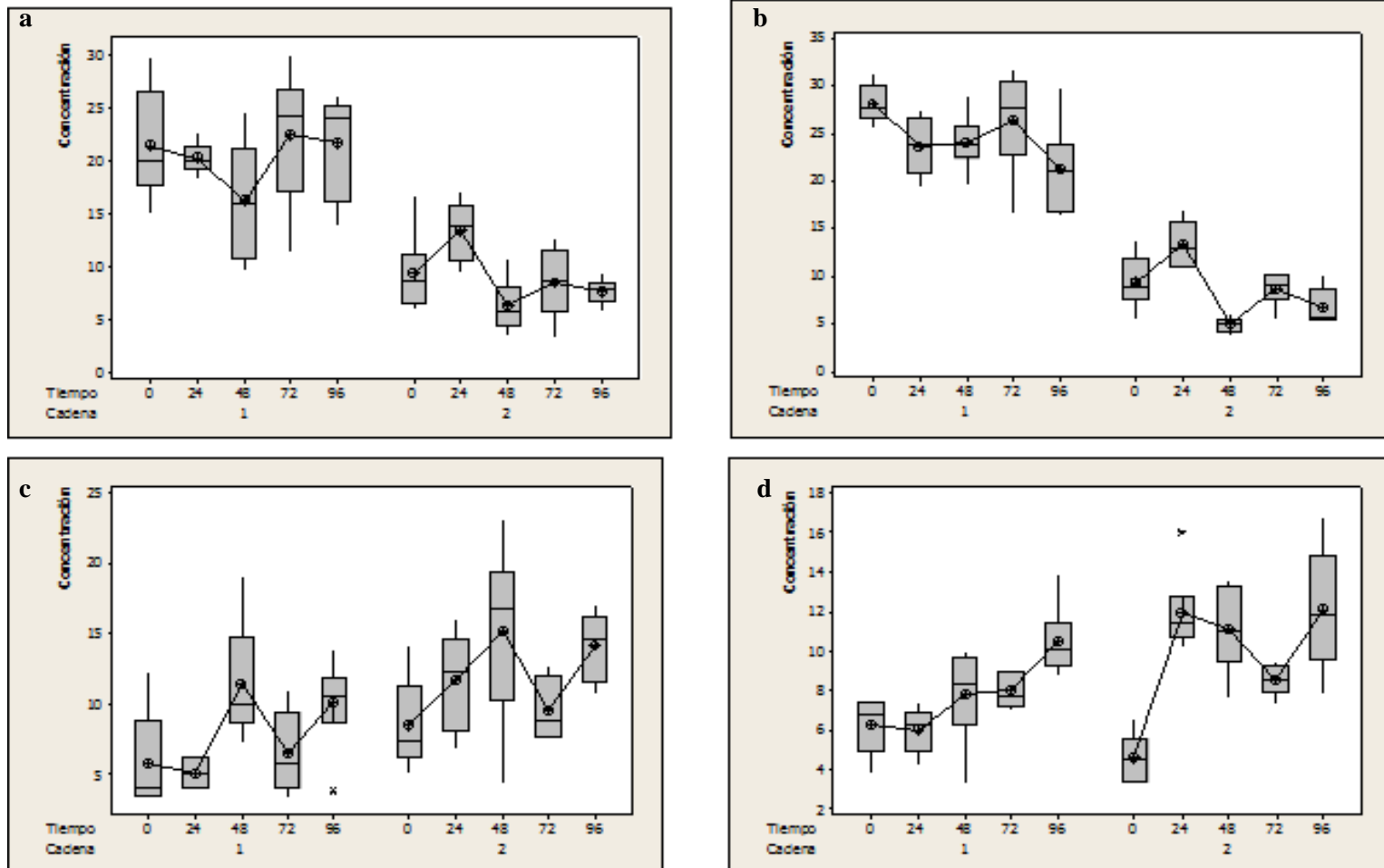


Figura VI. ANOVA de dos vías de la concentración ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) de las subunidades del colágeno soluble del músculo cuádriceps femoral de conejos raza California de  $70 \pm 3$  días durante las 96 h *post-mortem* ( $\alpha$ : 0.05). a. Cadena  $\alpha$  bajo condiciones desnaturalizantes. b. Cadena  $\alpha$  bajo condiciones reductoras. c. Cadena  $\beta$  bajo condiciones desnaturalizantes. d. Cadena  $\beta$  bajo condiciones reductoras

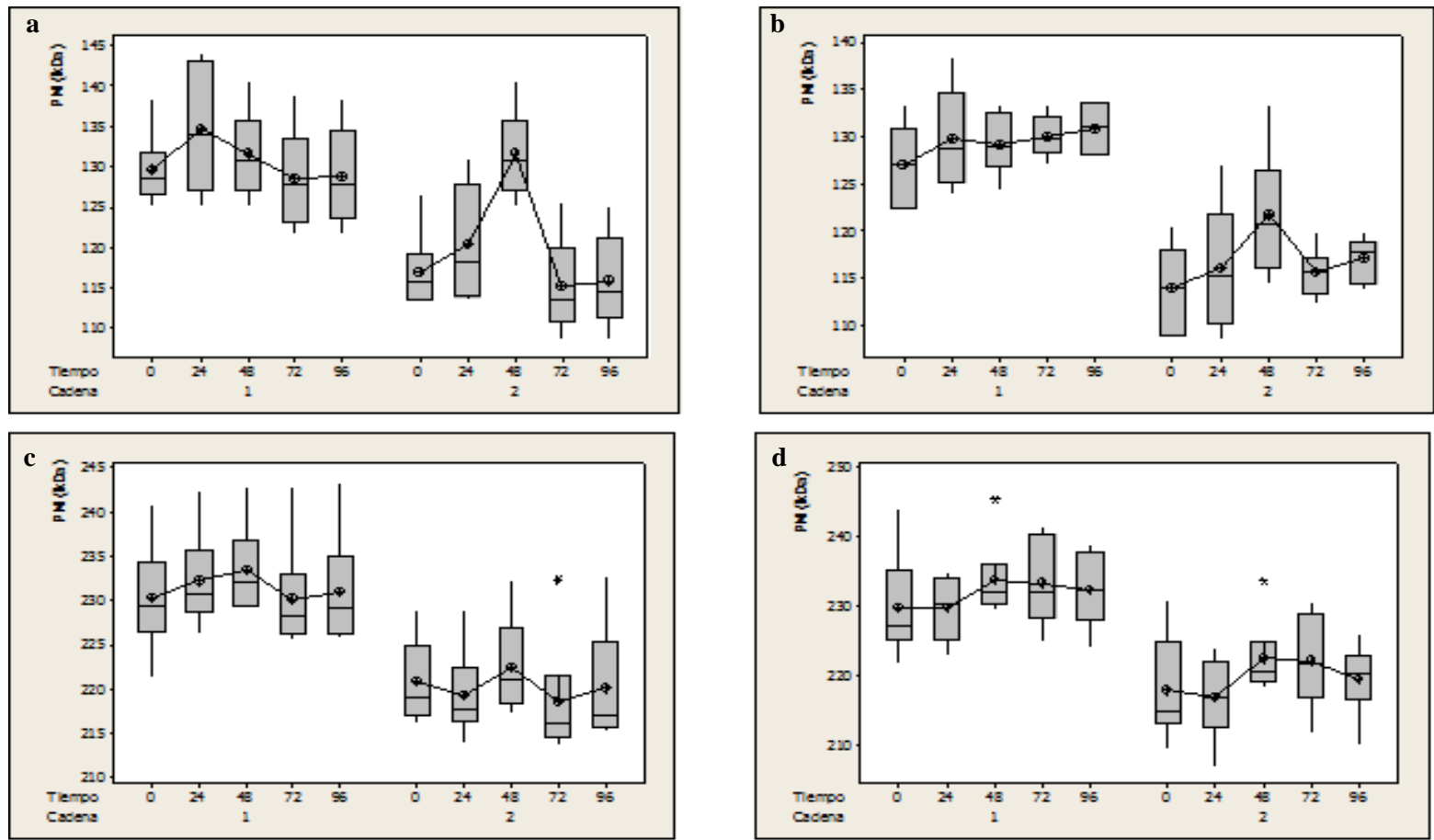


Figura VII. ANOVA de dos vías de la masa molecular (kDa) de las subunidades del colágeno insoluble del músculo cuádriceps femoral de conejos raza California de 70±3 días durante las 96 h *post-mortem* ( $\alpha$ : 0.05). a. Cadena  $\alpha$  bajo condiciones desnaturalizantes. b. Cadena  $\alpha$  bajo condiciones reductoras. c. Cadena  $\beta$  bajo condiciones desnaturalizantes. d. Cadena  $\beta$  bajo condiciones reductoras

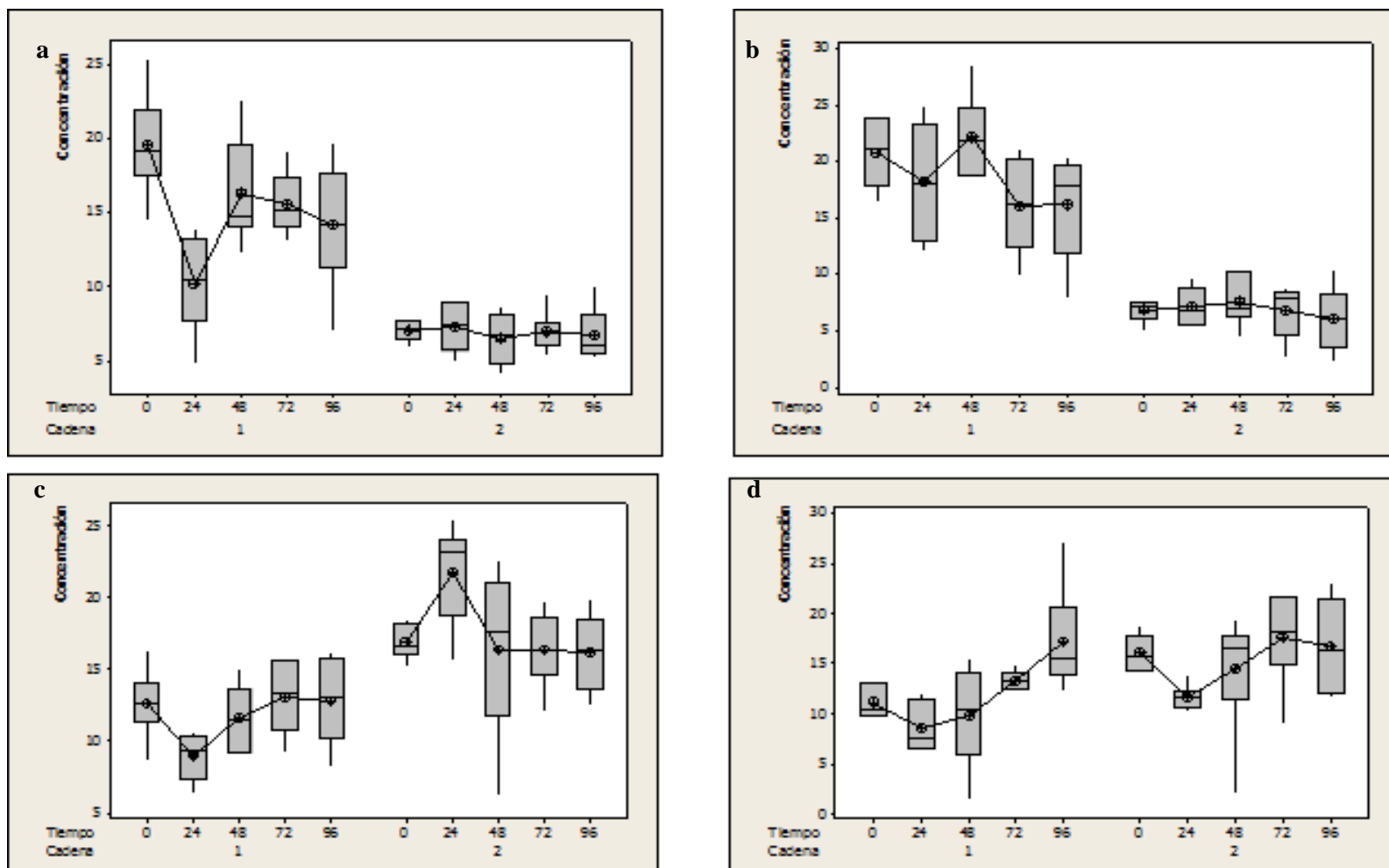


Figura VIII. ANOVA de dos vías de la concentración ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) de las subunidades del colágeno insoluble del músculo cuadriceps femoral de conejos raza California de  $70\pm 3$  días durante las 96 h *post-mortem* ( $\alpha$ : 0.05). a. Cadena  $\alpha$  bajo condiciones desnaturalizantes. b. Cadena  $\alpha$  bajo condiciones reductoras. c. Cadena  $\beta$  bajo condiciones desnaturalizantes. d. Cadena  $\beta$  bajo condiciones reductoras