

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ACTIVIDAD DE LAS PROTEASAS
(CATEPSINAS B, D Y L) EN LOS CAMBIOS FÍSICOS Y QUÍMICOS DEL
MÚSCULO DE BAGRE SIERRA (*Oxydoras sifontesi*) EN DIFERENTES
ESTADIOS DE MADUREZ SEXUAL.

Trabajo Especial de Grado
Presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela
Por la bachiller Rosangela Lugo Páez
Para optar al título de **Licenciada en
Biología.**

Tutor: Dra. Marínela Barrero

Jurados: Dra. Guerrero Hilda
Dr. Valls Jaime

Caracas, Venezuela
2010



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

ACTA

Los abajo firmantes, miembros del jurado designado por el Consejo de la Facultad de Ciencias para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Bachiller Rosangela Lugo Páez, C.I., V-14.568.114, titulado: **Estudio del efecto de la actividad de las proteasas (catepsinas B, D y L) en los cambios físicos y químicos del músculo de Bagre Sierra (*Oxydoras sifontesi*) en diferentes estadios de madurez sexual.**, nos hemos reunido hoy, 15 de Enero de 2010, a las 9:00 am, en el Instituto De Ciencias y Tecnología de Alimentos, para atender a la defensa pública de su trabajo; después de lo cual, consideramos que amerita la calificación de Dieciocho puntos (18) puntos. Certificamos así que este Trabajo Especial de Grado, cumple con los requisitos exigidos por la Universidad Central de Venezuela para optar al título de Licenciado en Biología.

Dra. Guerrero Hilda
Jurado

Dr. Valls Jaime
Jurado

Dra. Marínela Barrero
Tutor

DEDICATORIA

Enciende tu luz interior, la luz de la sabiduría y de la bondad. Ten fortaleza de ánimo para resistir a todos los embates y tempestades del camino. El momento presente es el creador del mañana por eso siempre debemos confiar y darle gracias a dios por todos los aprendizajes en los caminos recorridos en nuestras vidas.

A mis padres que siempre y sin importar el tiempo me apoyaron durante toda la etapa de mi carrera universitaria, en especial a esos dos seres maravillosos y especiales quiero dedicarle este inicio de mi desarrollo profesional. El tiempo de Dios es perfecto madre tu siempre me lo has dicho gracias.

A mis dos hermanos José Alfredo y José Alberto gracias por estar siempre presente y por animarme a continuar por mis metas, a toda mi familia por permanecer siempre cerca de mi.

Las líneas se quedaron cortas por todas las personas que han estado presentes en mi vida y que son y fueron significantes para mí. A mi tía Silveria Páez cuyas palabras nunca faltaron y transformaron cada tristeza en himno de alegría.

A mi gran amiga y hermana del alma Licenciada Elianyelina Roselly García, de ella recibí y sigo recibiendo cooperación y muchísimo apoyo, dándome su brazo de amistad y cariño de corazón, y teniéndola allí a mi lado todos los días recordándome que todo tiene su momento en la vida.

Los amigos son ángeles que nos levantan sobre sus pies cuando nuestras alas tienen problemas para recordar como volar, es por esta razón y en especial agradecimiento a mi amiga Licenciada Sarahi Mena quien nunca dejo de apoyarme y llamarme a reflexionar cuando mas lo necesite.

A todos mis amigos y compañeros de la Facultad de Ciencias que siempre los llevo presente en mis pensamientos, a ti Licenciada Fatima Dos Ramos quien ayer, hoy y siempre estarás a mi lado.

A mi tutora Dra. Marinela Barrero por darme la oportunidad de trabajar a su lado, a la Prof. Maira Oropeza por toda su colaboración prestada para la realización de la parte experimental de este trabajo de investigación a ellas muchísimas gracias.

A todos mis amigos que laboran en la biblioteca Alonso Gamero; al personal administrativo del servicio comunitario: Mirian Prieto, Yadira y a todos los obreros que nos prestan su apoyo en cada uno de los pasillos de la Facultad de Ciencias a esos seres gracias.

A la prof. Nancy Prieto quien más que compartir sus conocimientos en las aulas se convirtió en una gran amiga para mí.

INDICE

RESUMEN	IX
I. INTRODUCCIÓN	11
II. ANTECEDENTES	14
1. Bagre Sierra (<i>Oxydoras sifontesi</i>).....	14
2. Estadios gonadales.....	15
3. Estructura de las proteínas miofibrilares.....	17
4. Enzimas presentes en el tejido muscular del pescado y su acción como agentes proteolíticos.....	18
5. Características de las Catepsinas B, D y L.....	22
6. Efecto del ciclo reproductivo del pescado sobre las propiedades bioquímicas del músculo.....	23
III. OBJETIVOS	29
1. Objetivo General.....	29
2. Objetivos Específicos.....	29
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	30
1. Materiales.....	30
2. Métodos de Análisis.....	31
2.1. Análisis proximal.....	31
3. Actividad Enzimática de las catepsinas.....	32
a. Catepsina B.....	32
b. Catepsina D.....	32

c. Catepsina L.....	33
d. Determinación de Proteínas.....	33
f. Proteinas solubles.....	33
4. Textura.....	34
5. Análisis Estadístico.....	34
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
1. Caracterización del músculo del Bagre Sierra (<i>Oxydoras sifontesi</i>).....	35
2. Efecto del pH en músculo de Bagre Sierra (<i>Oxydoras sifontesi</i>) durante su ciclo reproductivo.....	37
3. Proteínas solubles en músculo de Bagre Sierra.....	39
4. Concentraciones de catepsinas B y D en músculo de Bagre sierra (<i>Oxydoras sifontesi</i>):.....	40
5. Actividad Enzimática de las Catepsinas.....	47
VI. CONCLUSIONES.....	53
VII. RECOMENDACIONES.....	54
VIII. BIBLIOGRAFÍAS.....	55
APENDICE 1.....	73
Tabla 5. Concentraciones de Catepsina B y D ($\mu\text{g/g} \pm \text{DS}$) en músculo de hembras de Bagre Sierra (<i>Oxydoras sifontesi</i>) durante las diferentes fases de su ciclo reproductivo.....	74
Tabla 6. Concentraciones de Catepsina B y D ($\mu\text{g/g} \pm \text{DS}$) en músculo de machos de Bagre Sierra (<i>Oxydoras sifontesi</i>) durante las diferentes fases del ciclo reproductivo.....	74
Tabla N° 7. Concentración de las enzimas proteasas ($\mu\text{g/g} \pm \text{DS}$) en músculo entre hembras de referencias y muestra congeladas de Bagre Sierra (<i>Oxydoras sifontesi</i>).....	74
Tabla N° 8. Actividad enzimática de las Catepsina B, D y L ($\text{mg/g} \pm \text{DS}$) en músculo de hembras de Bagre Sierra (<i>Oxydoras sifontesi</i>) durante las diferentes fases del ciclo reproductivo.....	75

Tabla N° 9. Actividad enzimática de las catepsina B, D y L (mg/g± DS) en músculo de machos de Bagre Sierra (*Oxydoras sifontesi*) durante las diferentes fases del ciclo reproductivo..... 75

Tabla N° 10. Actividad enzimática de las catepsina B, D y L (mg/g± DS) en músculo de hembras de referencias y muestras congeladas de Bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*)..... 75

INDICE DE TABLAS:

1. Composición proximal (% ±DS) del músculo fresco de machos y hembras de Bagre Sierra (<i>Oxydoras sifontesi</i>).....	36
2. Efecto del pH en músculo de hembras y machos de Bagre Sierra (<i>Oxydoras sifontesi</i>) durante su ciclo reproductivo.....	38
3.- Proteínas solubles (% ±DS) del músculo de Bagre Sierra (<i>Oxydoras sifontesi</i>).....	40
4. Parámetros de dureza (g ±DS) y cohesividad en muestras del músculo de machos y hembras de Bagre Sierra (<i>Oxydoras sifontesi</i>).....	50

INDICE DE FIGURAS:

1. Efecto del pH en el músculo de machos y hembras de Bagre Sierra (<i>Oxydoras sifontesi</i>) durante su desarrollo gonadal.....	38
2. Concentración de catepsina D ($\mu\text{g/g} \pm \text{DS}$) en músculo de hembras en fase (IV) maduración gonadal de bagre sierra (<i>Oxydoras sifontesi</i>).....	42
3. Concentración de Catepsina B ($\mu\text{g/g} \pm \text{DS}$) en músculo de hembras en fase (IV) maduración gonadal de Bagre Sierra (<i>Oxydoras sifontesi</i>).....	42
4. Concentración de catepsina D ($\mu\text{g/g} \pm \text{DS}$) en músculo de hembras de Bagre Sierra (<i>Oxydoras sifontesi</i>).....	43
5. Concentración de catepsina D ($\mu\text{g/g} \pm \text{DS}$) en músculo de machos de Bagre Sierra (<i>Oxydoras sifontesi</i>).....	44
6. Concentración de catepsina D ($\mu\text{g/g} \pm \text{DS}$) en músculo comparación entre machos y hembras de Bagre Sierra (<i>Oxydoras sifontesi</i>).....	45
7. Concentración de catepsina B ($\mu\text{g/g} \pm \text{DS}$) en músculo de machos de Bagre Sierra (<i>Oxydoras sifontesi</i>).....	46
8. Concentración de catepsina B ($\mu\text{g/g} \pm \text{DS}$) en músculo de hembras de Bagre Sierra (<i>Oxydoras sifontesi</i>).....	46
9. Concentración de catepsina B ($\mu\text{g/g} \pm \text{DS}$) en músculo comparación entre machos y hembras de Bagre sierra (<i>Oxydoras sifontesi</i>).....	47
10. Actividad enzimática de catepsina D (mg/g) en músculo de hembras de Bagre Sierra(<i>Oxydoras sifontesi</i>) durante la fase de maduración gonadal.....	49
11. Actividad enzimática de catepsina L (mg/g) en músculo de hembras de Bagre Sierra (<i>Oxydoras sifontesi</i>) durante la fase (IV) de maduración gonadal	49
12. Actividad enzimática de catepsina B (mg/g) en músculo de hembras de Bagre sierra (<i>Oxydoras sifontesi</i>) durante la fase (IV) de maduración gonadal.....	50
13. Actividad enzimática de catepsina L (mg/g) en músculo de hembras de Bagre sierra(<i>Oxydorassifontesi</i>).....	51

14. Actividad enzimática de catepsina L (mg/g) en músculo de machos de Bagre Sierra (<i>Oxydoras sifontesi</i>).....	51
15. Actividad enzimática de catepsina B (mg/g) en músculo de hembras de Bagre Sierra (<i>Oxydoras sifontesi</i>).....	53
16. Actividad enzimática de catepsina B (mg/g) en músculo de machos de Bagre Sierra (<i>Oxydoras sifontesi</i>).....	54
17. Actividad enzimática de catepsina D (mg/g) en músculo de hembras de Bagre Sierra (<i>Oxydoras sifontesi</i>).....	55
18. Actividad enzimática de catepsina D (mg/g) en músculo de machos de Bagre Sierra (<i>Oxydoras sifontesi</i>).....	56
19. Fuerza (g) del músculo de machos de Bagre Sierra (<i>Oxydoras sifontesi</i>).....	61

RESUMEN

Oxydoras sifontesi, conocido como Bagre Sierra, representa un grupo de peces neotropicales, de aguas dulces continentales. Su nombre se deriva de la presencia de una serie de placas óseas laterales con espinas centrales curvadas y dirigidas hacia atrás, a manera de sierra, que pueden o no cubrir todo el cuerpo. Son de constitución robusta y poseen fuertes espinas en la aleta dorsal y pectoral que utilizan como medida de defensa; puede llegar a alcanzar los 120 cm de longitud y 20 Kg de peso. Se caracterizan por su largo hocico cónico, cabeza estrecha y centralmente son aplanados. Es una especie endémica, la cual se puede encontrar con mayor frecuencia en la Cuenca del Río Orinoco. El presente estudio consistió en evaluar como objetivo la influencia de la actividad de las proteasas (catepsina B, D y L) en los cambios físicos y químicos del músculo de Bagre Sierra (*Oxydoras sifontesi*) en diferentes estadios de madurez sexual. A las muestras de bagre sierra se le realizaron los siguientes análisis: análisis proximal, proteínas solubles, actividad enzimática de las catepsinas B, D y L, determinación de pH. Los resultados fueron analizados en Statgraphics plus 5.1 mediante una prueba de ANOVA de una vía, con un nivel de significancia del 5%. Se concluyó que la acción de las enzimas proteolíticas específicamente catepsinas B, D y L ejercen influencias en el tejido muscular sobre las diferentes etapas del ciclo reproductivo en la especie estudiada.

I. INTRODUCCIÓN

La actividad enzimática es responsable de un gran número de pérdidas en la calidad de los alimentos, incluyendo la decoloración, malos olores y sabores desagradables, y la modificación de la textura. Recientemente, existe gran interés en la actividad enzimática del pescado, por su aplicación potencial en la industria de los alimentos (Villa-Alanis y col., 2005). Según Kaplan y Colowick (1987) las enzimas son catalizadores orgánicos sintetizados por los seres vivos, sustancias de naturaleza proteica caracterizados por una gran actividad catalítica, especificidad de sustrato, y susceptibilidad a la influencia de diferentes factores, como temperatura, pH, humedad y concentración del sustrato.

Si bien han sido aisladas varias enzimas proteolíticas en el tejido del pescado, son las catepsinas las que quizás se han descrito con mayor frecuencia. Según Huss (1999), las define como proteasas "ácidas" que usualmente se encuentran empacadas en diminutos orgánulos submicroscópicos llamados lisosomas. En el tejido vivo, las proteasas lisosomales se cree son responsables de la degradación proteica en los tejidos musculares. De esta forma, las enzimas proteasas están generalmente inactivas dentro del tejido vivo pero son liberadas dentro de los fluidos celulares luego de abuso físico o congelación y descongelación post mortem del músculo.

Un segundo grupo de proteasas intracelulares denominadas "calpainas" o "factor activado por calcio", han sido recientemente asociadas con la autólisis del

músculo de pescado y se les encuentra en carnes, pescados de aleta y crustáceos (Bartoli y col., 2005).

Las calpainas han sido encontradas como las principales responsables de la autólisis post mortem de la carne, debido a la digestión de las proteínas de la línea Z de las miofibrillas. Si bien el endurecimiento es rara vez un problema en el músculo no congelado, el ablandamiento debido a la autólisis es un problema serio que limita su valor comercial. Estas proteasas son endo-peptidasas intracelulares, cisteína y calcio dependientes. La mayoría son activas a pH fisiológico, lo cual hace razonable sospechar su importancia en el ablandamiento del pescado durante el almacenamiento refrigerado Goll y col. (2003).

Por otra parte los bagres, según Aguilar (1982), conforman un grupo con mucha demanda en nuestro país, y han obtenido un creciente interés en los últimos años como especies potencialmente cultivables, debido al hecho de ser una de las variedades dulceacuícolas con alto valor nutricional y buen precio de venta en los mercados. La calidad del músculo de pescado es afectada por numerosos factores extrínsecos e intrínsecos; dentro de estos se encuentran la época de captura, medio ambiente, la especie, edad, sexo, estadio del ciclo reproductivo y desarrollo gonadal.

En Venezuela se posee muy poca información sobre la relación entre el ciclo reproductivo y la actividad enzimática en especies pesqueras cultivadas como el bagre, al igual que la influencia de las características físicas y químicas del músculo durante el desove, de allí la importancia de evaluar los efectos de la

actividad enzimática en el tejido muscular del Bagre Sierra (*Oxydoras sifontesi*)
y su relación a los periodos del ciclo reproductivo.

II. ANTECEDENTES

1. Bagre Sierra (*Oxydoras sifontesi*):

Oxydoras sifontesi, conocido como Bagre Sierra, representa una especie de peces neotropicales, de aguas dulces continentales. Según Provenzano (1980) su nombre se deriva de la presencia de una serie de placas óseas laterales con espinas centrales curvadas y dirigidas hacia atrás, a manera de sierra, que pueden o no cubrir todo el cuerpo. Son de constitución robusta y poseen fuertes espinas en la aleta dorsal y pectoral que utilizan como medida de defensa; puede llegar a alcanzar los 120 cm de longitud y 20 Kg de peso. Se caracterizan por su largo hocico cónico, cabeza estrecha y centralmente son aplanados. Es una especie endémica, la cual se puede encontrar con mayor frecuencia en la Cuenca del Río Orinoco, cuyos afluentes discurren sobre los llanos occidentales y centrales del país (Machado-Allison, 1994). Al igual que otras especies de importancia comercial, *Oxydoras* presenta un ciclo reproductivo estacional, encontrándose estrechamente ligado a los cambios estacionales de los llanos inundables. La mayoría son de hábitos nocturnos y omnívoros, alimentándose de frutos, larvas de insectos y otros organismos bentónicos. Es migratoria y su época reproductiva es entre los meses de marzo y junio. Según Fernandez-Yepez, (1968) los peces más grandes son para el consumo humano; sin embargo su valor comercial es moderado, ya que su piel oscura causa un rechazo y por tanto una reducción en su comercialización.

El ciclo hidrológico anual del Río Orinoco comprende un periodo de inundación, que tiene lugar durante la estación de lluvia (entre mayo y noviembre), y un periodo de aislamiento, que ocurre a lo largo de la estación seca, de noviembre a mayo del año siguiente. Lewis y col., (2000). Durante la inundación, el agua cubre vastas áreas de sabanas formando extensas lagunas poco profundas o esteros.

En la estación seca, estas zonas inundadas se aíslan de la mayoría de los afluentes y eventualmente se secan; Machado-Allison, (1994). La mayoría de los peces que viven en estas regiones exhiben un patrón de maduración gonadal que empieza en la estación lluviosa. Así, el proceso de recrudescencia tiene lugar durante la estación seca, finalizando con el desove (llegada de las lluvias), cuando la disponibilidad de espacio y recursos para los alevines son los más favorables (al principio de las inundaciones) González, (1980).

2. Estadios Gonadales:

La reproducción, es un proceso que involucra una serie de cambios somáticos y fisiológicos tal como, el desarrollo de las gónadas, la maduración gonadal, y finalmente se produce el desove. Nikolsky (1963), estableció una clasificación de los estadios de maduración gonadal para la reproducción de los peces los cuales se presentan a continuación de la siguiente manera:

Estado I: Inmaduro, los sexos no se pueden separar a simple vista.

Estado II: Diferenciables a simple vista. En las hembras los ovarios tienen forma de cinta o bandas pequeñas y estrechas de color rojo, los óvulos no se observan a simple vista. En los machos los testículos tienen forma de cinta multilobulada, son muy pequeños y de color blanco.

Estado III: En ambos sexos las gónadas incrementan rápido de tamaño. En los ovarios se notan los óvulos a simple vista. El color cambia de rojo a amarillo anaranjado. En los testículos los lóbulos se engruesan, el color es blanco lechoso. Este proceso de maduración gonadal comienza con la proliferación oogonial y empiezan a constituirse los folículos ováricos.

Estado IV: Las gónadas alcanzan su máximo desarrollo. Los ovarios ocupan toda la cavidad abdominal, su color es amarillo. En el proceso de la vitelogénesis, ocurre la incorporación de vitelo en los oocitos, controlados por las gonotropinas, que actúan para la maduración de las gónadas. Los testículos ocupan toda la región posterior de la cavidad abdominal, su color es blanco lechoso. La espermatogénesis tiene lugar en las estructuras del testículo.

Estado V: Igual al anterior, solo que al presionar ligeramente el vientre, se liberan los productos sexuales en ambos sexos. Posteriormente, en la ovogénesis el ovocito sufre procesos de maduración y ovulación, con lo cual el óvulo adquiere la capacidad de ser fecundado. Después de experimentar una serie de divisiones mitóticas, la espermiogénesis consiste en la transformación de las espermáticas en espermatozoides, los cuales adquieren su motilidad característica y la capacidad de fertilización.

Estado VI: Post-desove, los ovarios parecen cintas flácidas de color rosado. Los testículos también son flácidos pero mantienen su color blanco. Luego estas gónadas regresan (recrudescencia) estado II.

3. Estructura de las Proteínas Miofibrilares:

Estas presentan un aspecto estriado, debido a la presencia de sarcómeros que se repiten regularmente. Cada sarcómero contiene una serie de filamentos paralelos que se solapan parcialmente: los filamentos gruesos y delgados.

Según Hultman (2002), en *Salmon salar* y *Gadus marhus* los filamentos gruesos se originan por el ensamblaje de moléculas de miosina, además de otras proteínas menores: proteína-C y las proteínas de la línea M. En el músculo esquelético estriado los filamentos delgados están constituidos por filamentos de actina, tropomiosina y el complejo troponina. Estas últimas regulan la contracción muscular dependiente de la concentración de iones Ca^{+2} presentes.

Jarenbäck y Liljemark (1975), trabajando con teleósteos encontraron que las fibras musculares (miómeros) corren de forma paralela formando ángulos que favorecen los movimientos necesarios durante el nado. Este mismo autor señaló además la unión entre el miómero y miocotoma, la cual es realizada por el colágeno, cuya función es envolver cada fibra muscular. Según Huss (1988), el mecanismo de contracción y relajación comienza cuando un impulso nervioso libera Ca^{++} del retículo sarcoplasmático y lo lleva a las miofibrillas. Esta ATP-asa degrada el ATP que se encuentra entre los filamentos de actina y miosina.

La mayor parte de la energía es utilizada para la contracción, haciendo que los filamentos de actina se deslicen entre los de miosina, a modo de “enchufe”, con lo cual la fibra muscular se contrae. Cuando la reacción se invierte o sea, cuando el Ca^{++} es impulsado a su lugar de origen, la actividad contráctil de la ATP-asa se detiene y permite que el músculo se relaje.

La actividad proteolítica del músculo se ha relacionado con cambios en las proteínas miofibrilares, las cuales afectan el músculo y a su vez la calidad del filete de pescado, el tiempo de vida y de almacenamiento de este músculo Cheng y col, (1979). Roura y col. (1990), al analizar actomiosina de merluza en pre-desove observaron una ausencia de la cadena pesada de miosina (205 kDa) y la aparición de un componente de 160 kDa, que no se encontró presente en los geles de actomiosina en post-desove. También encontraron una desnaturalización parcial de la cadena pesada de miosina y la disminución de la relación miosina/actina en la merluza en pre-desove. Según Konagaya, (1983) en salmón capturado en época de migración para el desove se han reportado cambios sustanciales en el perfil electroforético de las proteínas miofibrilares.

4. Enzimas presentes en el tejido muscular del pescado y su acción como agentes proteolíticos:

Es bien conocido el elevado grado de digestibilidad del tejido muscular del pescado. La degradación de las enzimas contra las proteínas en estas estructuras se considera como uno de los factores que causan su rápido deterioro del músculo después que ocurre los cambios autolíticos post-mortem.

El tejido muscular del pescado, contiene catepsinas muy activas capaces de fraccionar hasta 10 mg de proteína por hora por gramo de tejido muscular fresco. Estas enzimas proteasas son de verdadero origen muscular y existen en estado activo (sin inhibidores endógenos). A parte de la acción de las catepsinas, ocurren cambios en el músculo del pescado por efecto de las enzimas digestivas que comienzan a actuar en las vísceras, atravesando las paredes de la cavidad abdominal y finalmente llegan al tejido muscular, a menos que el canal digestivo se elimine inmediatamente después de la captura (Montecchia,1997).

En el músculo de pescado se ha reportado la presencia de diferentes tipos de enzimas y su aplicación potencial en la industria de los alimentos (Jiang y col., 1996; y Pérez-Borla y col., 2002). La firmeza del músculo es un índice de frescura de la carne de forma que el ablandamiento resulta en una disminución de la calidad (Otake, 1991, señalado por Pérez-Borla y col. 2002). Dichos autores encontraron cambios estacionales en la actividad de las proteinasas en el músculo de especies como Mackerel (caballa). Roura y col (1990) reportaron un incremento en la actividad enzimática de las catepsinas en el músculo y el hígado de merluza durante su maduración. Estos autores reportaron la participación de las catepsinas en el ablandamiento del músculo de especies como el salmón (*Salmo salar*) capturado durante su migración para el desove. Concluyeron que la actividad de las enzimas proteolíticas en el músculo en pre-desove y post-desove, se ve afectada por los periodos de congelación, causando un incremento en dicha actividad en los extractos del tejido muscular esto comparado con las muestras frescas.

Yamashita y Konogaya (1990) evidenciaron la acción de la catepsina L, antes que otras enzimas proteasas, en el tejido muscular del salmón durante el desove. Estos demostraron que la electroforesis de miofibrillas purificadas tratadas con la proteasa L mostraban patrones casi idénticos a los patrones de proteínas recuperadas del músculo del pescado en desove. Más aún, la actividad autolítica de esta enzima se correlaciona muy bien con la textura del músculo. Del mismo modo, Huss (1999) señaló que la catepsina L ha sido implicada en los cambios de textura del músculo de salmón durante la migración por desove.

Según Lund y Nielsen (2001), investigaron los cambios en el contenido de los aminoácidos libres y de los péptidos de bajo peso molecular en el tejido muscular del salmón bajo condiciones de refrigeración, observaron actividad de las enzimas exopeptidasas, sin embargo, la mayor parte de la proteólisis del músculo en almacenamiento en frío se debe a la acción de las enzimas endopeptidasas (catepsinas), a su vez que dichas enzimas proteolíticas, originaron un marcado deterioro en la textura en esta especie. Del mismo modo, Roura y col (1995) reportaron que estas enzimas son las responsables de los cambios en el músculo de especies usadas en la producción de pastas de pescado, debilitando la formación del gel. Cherét y col. (2007), en su trabajo sobre actividad de músculo de pescado y músculo post-mortem, reportaron que los niveles de catepsina H tenían un papel insignificante en la proteólisis post-mortem en los músculos de peces y especies bovina.

Por otro lado, Huss (1988) señaló que la proteasa D es de gran importancia, puesto que inicia la degradación de proteínas endógenas de la célula

a péptidos. Este mismo autor señaló que las enzimas D y L desempeñan un papel primordial en la degradación autolítica del tejido del pescado, dado que la mayor parte de las otras catepsinas presentan actividad en un rango relativamente estrecho de pH, demasiado bajo para tener significado fisiológico. Sin embargo, entre estas dos enzimas, la proteasa L contribuye a la autólisis del músculo de pescado más que la D, dado que es mucho más activa a pH neutro, y se demostró que digiere tanto proteínas miofibrilares (actiomiosina) como tejido conectivo, según Huss, (1988). Así también, Reddi y col. (1972) señalaron que una enzima del lenguado de invierno, se cree la proteasa D, es activa dentro de un rango de pH de 3-8 con un máximo cerca del pH 4,0, aunque no se efectuó ningún intento para confirmar la identidad de la enzima empleando un sustrato sintético o inhibidores específicos. Sin embargo, esta es mucho menos activa en presencia de ATP, lo cual sugiere que estaría activa sólo en el músculo de pescado post mortem. Wang y col, (2007), reporta que la alta actividad de la enzima B se encuentra en los músculos de peces especialmente durante el desove, sugiriendo además que es un factor importante de la degradación del músculo de los peces post mortem. Ladrat y col. (2003), estudiando la capacidad de las catepsinas B, D y L para degradar in vitro miofibrillas sarcoplasmáticas y proteínas a partir de músculo de róbalo (*Dicentrarchus labrax* L.), hallaron que las enzimas proteasas degradan la miosina de cadena pesada y α -actinina y que la tropomiosina y actina son sensibles a la acción de la enzima L.

Asimismo, encontraron que la troponina T fue sólo resistente a la acción de la proteasa D y que la desmina fue degradada por las enzima proteolíticas B y L.

Así también estos mismos autores mostraron que la MHC (miosina cadena pesada), α -actinina, desmina, actina, troponina T, tropomiosina y otras bandas de proteínas no identificadas pueden ser degradadas por la acción de las mismas, funcionando en forma sinérgica en las proteínas musculares. Un año más tarde los mismos autores reportaron la contribución relativa de calpaínas (grupo de proteasas intracelulares o factor activado por calcio) y catepsinas en la degradación de músculo de róbalo (*Dicentrarchus labrax* L.), y que estas no funcionan sinérgicamente en los músculos postmortem, pero no excluyeron la acción de la calpaína en la primera fase del envejecimiento postmortem, seguido por la acción de las catepsinas. Massa (2006) señaló que las catepsinas juegan un papel importante en la maduración de productos de pescado marinado los cuales tienen un pH bajo y una disminución del contenido de sal. Además de su efecto perjudicial en la textura, las enzimas proteasa inducen cambios autolíticos intencionales en productos pesqueros fermentados. Por ejemplo, se cree que son responsables de los principales cambios en la textura durante la fermentación del calamar japonés y la carpa cruciana preservados en sal (Makinodan y *col.*, 1991, 1993).

5. Características de las catepsinas B, D y L:

La catepsina B es una cisteína proteinasa lisosomal que se encuentra oculta en los lisosomas e involucrada en varios procesos fisiológicos tales como la degradación de proteínas, la remodelación de la matriz extracelular, el procesamiento de antígenos, la apoptosis. Además está relacionada con un gran

número de enfermedades en humanos como artritis, el Alzheimer, la osteoporosis, etc.

La catepsina L es una enzima lisosomal de la familia peptidasa (familia de proteasas de la papaína tipo I). Tiene una actividad específica superior a la catepsina B o H en la degradación de una gran variedad de sustratos proteicos fisiológicos. Esta juega un papel importante en la proteólisis lisosomal de macromoléculas celulares y endocitosis. Es rápidamente e irreversiblemente inhibida por los inhibidores de diazometano Z-Phe-Phe-CHN₂ o Z-Phe-Ala-CHN₂, es fácilmente inhibida por el inhibidor de la epóxido de E-64, y es reversiblemente inhibida por leupeptina. La catepsina L es estable en el rango de 4,5 a 5,5. Es un dímero de una cadena pesada que hidroliza los tejidos musculares a nivel de troponina y tropomiosina.

La catepsina D es una de las proteinasas ácidas lisosomales envuelta en la degradación proteínica intracelular a nivel de la actina y miosina. El rol de esta enzima en la alteración post-mortem de los atributos texturales produce como consecuencia la formación acentuada de aminoácidos libres, péptidos durante el almacenaje.

Esta enzima presenta las siguientes características principales: incluyen especificidad análoga con la pepsina, capacidad para digerir la hemoglobina, dependencia de pH ácido, deficiencia de activadores e incapacidad para dividir los péptidos sintéticos.

6. Efecto del Ciclo Reproductivo del Pescado sobre las Propiedades Bioquímicas del Musculo:

Las características funcionales del músculo dependen principalmente de las proteínas miofibrilares. Esta dependencia es más notable en el músculo del pescado que en el músculo de mamíferos, por su bajo contenido de colágeno (Brown, 1.986).

Existe un amplio conocimiento relativo a las propiedades bioquímicas y funcionales de la actomiosina. Se ha evidenciado que cuando se compara la actomiosina de la merluza en el periodo de pre-desove y post-desove, la primera presenta una disminución porcentual significativa de miosina por la desnaturalización parcial de la cadena pesada. Durante los meses de octubre a febrero, periodo de desarrollo gonadal y desove, la relación miosina/actina de la actomiosina disminuyó, mientras que en el periodo de reposo gonadal entre marzo a septiembre se observó un incremento significativo, (Crupkin y col. 1982).

Ando y Hatano (1986 a) también evidenciaron una clara degradación de la cadena pesada de miosina en el salmón (machos y hembras) en fase migratoria. Ellos adicionalmente, compararon la actividad autolítica en los homogenizados obtenidos del músculo, a diferentes pH, durante el ciclo reproductivo. Los resultados de este trabajo indicaron que en ambos sexos, la actividad autolítica incrementa significativamente durante la migración para el desove y en el desove, lo que sugirió que los altos niveles de actividad proteasa eran requeridos para la utilización de las proteínas del músculo como fuente de energía para

ascender por el río.

Por otra parte, se ha señalado que en el salmón capturado durante el periodo de migración para el desove, el músculo experimenta un ablandamiento excesivo que es debido a la degradación de las proteínas miofibrilares por la actividad de proteinasas lisosomales presentes en el músculo. Ando y Hatano (1986 b) al estudiar el efecto del ciclo reproductivo de esta misma especie señalaron que la degradación de las proteínas era debido al incremento en la actividad de las proteasas.

Arveláiz y Bello (2005) en su trabajo cambios en las propiedades químicas y bioquímicas del músculo de coporo (*Prochilodus mariae*) asociados al ciclo reproductivo, encontraron cambios en el contenido energético y sugirieron que los lípidos del músculo son los primeros compuestos que son utilizados por el pez para el desarrollo gonadal y, luego que estos se agotan las proteínas constituyen la fuente principal de energía durante el período de migración y desove. Encontraron además que la MHC, la actina y el complejo tropomiosina-troponina de la actomiosina disminuyeron significativamente por efecto del desarrollo gonadal al igual que en el desove, y llegaron a la conclusión de que las enzimas son afectadas por el ciclo reproductivo del pescado observándose una pérdida significativa de su actividad con el desarrollo gonadal.

Shimizu y Nandanie-wendakoon (1990) evaluaron el efecto del desarrollo gonadal y el desove sobre la composición del tejido muscular del pez lagarto (*Saurisa elongata*), encontrando que el contenido de proteína cruda disminuyó con el descenso del índice gonadal producto del desove, y luego a partir de

agosto fue incrementando paulatinamente (reposo gonadal). Por lo tanto, los cambios fisiológicos debidos al ciclo reproductivo afectan la composición química del músculo de pescado de especies grasas o donde el pez requiere realizar largas migraciones para desovar.

La firmeza es un factor importante para determinar la calidad de la carne en los productos pesqueros. Esta firmeza se mide como la fuerza que ofrece el músculo a la ruptura. Hatea y col. (1986) reportaron que las diferencias en la firmeza de varias especies pesqueras correlacionada con el contenido de colágeno, lo que sugería un buen grado de asociación entre estas variables.

Touhata y col., (2000) demostraron la degradación del tejido conectivo y una disminución en el contenido de colágeno durante el periodo de maduración gonadal y desove en el pargo, momento en el que la textura del músculo es blanda y de poca firmeza, como fue confirmado mediante el análisis de correlación, lo que sugirió que el colágeno contribuye en la textura del músculo del pescado.

El tejido muscular está sujeto a cambios estacionales que producen variaciones en sus características físicas y químicas tales como pH, grasa, proteína, y contenido de agua que a la vez influyen en sus propiedades funcionales y en su procesamiento. Han reportado variaciones en las características físicas y químicas relacionadas con cambios ambientales y el ciclo reproductivo de varias especies pesqueras. Según Huss (1988), durante todo el año, el pez sexualmente maduro, gasta energía en el fortalecimiento de sus gónadas (huevas y esperma). Este desarrollo gonadal provoca el agotamiento de

las reservas de proteínas y lípidos, porque se lleva a cabo durante un período de escasa o ninguna alimentación. Este mismo autor, reporta que en el bacalao del mar del norte se encontró que, antes del desove, el contenido de agua en el músculo aumenta, mientras que el contenido de proteínas disminuye. Huss (1999), también señala que el agotamiento de las reservas del pez durante el desarrollo de las gónadas puede ser muy grave, especialmente en los casos en que la reproducción se combina con la migración hacia áreas de alimentación. Algunas especies, como por ejemplo el salmón del Pacífico (*Oncorhynchus spp.*), la anguila (*Anguilla anguilla*) y otras, desovan sólo una vez, después de lo cual su estado fisiológico se deteriora en tal forma que las lleva a la muerte. Esto es debido en parte a que dichas especies no se alimentan durante la migración hacia el desove. Tal es el caso del salmón que puede perder durante la migración y reproducción hasta el 92 por ciento de sus lípidos, el 72 por ciento de sus proteínas y el 63 por ciento de su contenido de cenizas (Love, 1970). Por otro lado, Pérez Borla- y col (2002), reportaron cambios de la actomiosina de merluza, influenciada por los cambios metabólicos durante su ciclo reproductivo. Filetes obtenidos en estas especies durante el pre-desove y almacenados a -20C sufrieron un deterioro mayor que filetes en estado de post-desove; debido a la insolubilización de las proteínas y la reducción en la viscosidad.

Suárez y col. (2007), señalaron que la disminución post mortem en el pH del músculo de pescado tiene un efecto en las propiedades físicas del músculo. A medida que el pH disminuye, se reduce la carga neta de la superficie de las proteínas musculares, causando su desnaturalización parcial y disminuyendo su

capacidad de enlazar agua. Además del pH y la temperatura, la humedad es otro de los factores que afecta la actividad enzimática. La pérdida de agua tiene un efecto perjudicial en la textura del músculo. Ha sido demostrado por Love (1975), que existe una relación inversamente proporcional entre la dureza del músculo y el pH, donde los niveles inaceptables de dureza (y pérdidas de agua por cocción) ocurren a menores niveles de pH.

III. OBJETIVOS

1. Objetivo General

Estudiar la influencia de la actividad de las proteasas en los cambios físicos y químicos del músculo de Bagre Sierra (*Oxydoras sifontesi*) en diferentes estadios de madurez sexual.

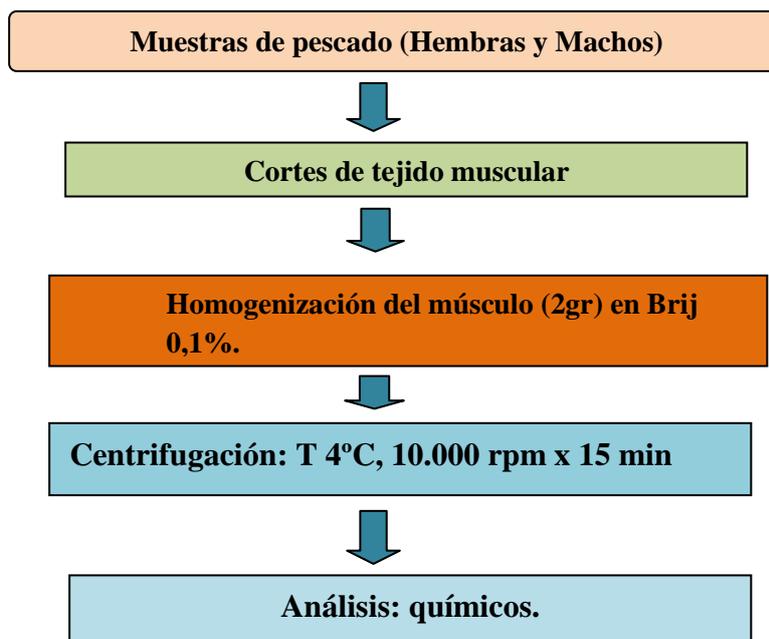
2. Objetivos Específicos:

- Evaluar los cambios de las proteínas presentes en el músculo de Bagre Sierra (*Oxydoras sifontesi*), mediante la actividad de las catepsinas B, L y D.
- Evaluar los efectos de la actividad de las proteasas en los cambios físicos, pH y textura en el músculo de Bagre Sierra durante su ciclo reproductivo.
- Evaluar los efectos de las proteasas B, D y L y su influencia en los cambios de la solubilidad de proteína en el músculo de Bagre Sierra durante su madurez sexual.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales:

El estudio se llevó a cabo con ejemplares hembras y machos del Bagre Sierra (*Oxydoras sifontesi*) que fueron capturados bimensualmente mediante pesca artesanal, y posteriormente se mantuvieron en tanques en la Estación de acuicultura en la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA) ubicada en Barquisimeto Edo. Lara. El periodo de recolección de ejemplares abarcó los meses comprendidos entre mayo y noviembre de 2006. Se obtuvieron las muestras de músculo y se almacenaron a una temperatura de -80°C en el Instituto de Medicina Experimental. Dichos muestras se trasladaron, en hielo seco, al Instituto de Ciencias y Tecnología de Alimentos (I.C.T.A.) Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, para su análisis. En la figura 1 se muestra un diagrama de flujo del procedimiento realizado para el análisis de las muestras del tejido muscular del Bagre Sierra (*Oxydoras sifontesi*):



Para ver si existe interacción entre el tiempo de almacenamiento y la actividad enzimática se tomaron dos muestras de referencias de ejemplares hembras de Bagre Sierra (*Oxydoras sifontesi*) frescas; se encontraban en la fase de maduración gonadal (IV). Y se le realizaron los mismos análisis que las estudiadas en diferentes estadios gonadales.

2. Métodos de análisis para caracterización de la muestra:

Las siguientes determinaciones se realizaron en el musculo de pescado fresco y por triplicado.

2.1. Análisis Proximal.

1.1 Humedad: Se realizó por pérdida de peso en exposición a estufa a $100\pm 5^{\circ}\text{C}$ según método N° 967.03 (AOAC, 1990).

1.2 Proteína cruda: se realizó según método Micro kjeldahl N° 955.04, 988 (AOAC, 1990). (factor 6,25)

1.3 Grasa cruda: se procedió mediante el método de extracción continua, utilizado hexano en un aparato de Soxhlet; según método N° 972.28 (AOAC, 1990).

1.4 Cenizas: se realizó por incineración en mufla a $500\pm 50^{\circ}\text{C}$, pesando el residuo; según método N° 967.04 (AOAC, 1990).

Análisis Físico:

pH: Se utilizó un medidor de pH, modelo Oakton, serie pH 510. Norma Covenin 1315-79.

3. Actividad Enzimática de las Catepsinas:

Para ello se tomaron se tomaron 3 muestras de musculo por cada una de las diferentes fases del ciclo reproductivo y se homogeneizaron en Brij 10 %.

a. Catepsina B:

La actividad enzimática de la catepsina B se analizó usando Z-Arg-Arg-NNap (Sigma # C5520, Sigma Chemical Company, St Louis Mo) como sustrato, de acuerdo al método descrito por Barret y Kirschke (1981). La hidrólisis del sustrato Z-Arg-Arg-NNap liberando 2-Naftilamina fue determinada colorimétricamente luego de acoplarla con una sal de diazodio, Fast Garnet (# F8761, Sigma Chemical Company, St Louis Mo). En un espectrofotómetro (Spectronic Genesys 10 Bio Thermo) a 520 nm. La cantidad de naftilamina producida se determinó utilizando una curva estándar basada en 20 mM 2-naftilamina pura (Sigma A 6640-5, Sigma Chemical Company, St Louis Mo) y conociendo que 100 nmol de 2-naphthylamine corresponden a 10 miliunidades.

b. Catepsina D:

La actividad proteolítica de la captesina D se midió espectrofotométricamente utilizando hemoglobina bovina (5% w/v) como sustrato, de acuerdo a lo descrito en la metodología de Takahashi y Tang (1981). El análisis consistió en la degradación de la hemoglobina por los efectos de la catepsina D, dicha actividad se detiene utilizando una solución de acido tricloroacetico (TCA al 0,1 %). Los péptidos solubles se miden a 280 nm utilizando un espectrofotómetro (Spectronic Genesys 10 Bio Thermo).

c. Catepsinas L:

La actividad enzimática se ensayó utilizando azocaseína (2% w/v) en urea 6 M por 30 minutos a 37°C como lo describe Barrett y Kirschke (1981). La degradación de la azocaseína por la catepsina L produce péptidos, los cuales se cuantificaron a 366 nm utilizando un espectrofotómetro (Spectronic Genesys 10 Bio Thermo). La actividad de la proteasa se obtuvo por la relación de μmol de producto formado por mg de proteína.

d. Proteína:

La determinación del contenido de proteína se realizó en el músculo del Bagre Sierra, según el método descrito por Bradford (1976) mediante el ensayo de Bio-Rad # 500-0006 (Bio-Rad, Hercules, CA). Para la curva estándar se utilizó albumina bovina (2mg/ml). El cambio de coloración da la concentración de proteína fue leído a 590 nm con un espectrofotómetro (Spectronic Genesys 10 Bio Thermo).

f. Proteínas solubles:

Las proteínas solubles en solución salina se determinaron según la metodología señalada por Barrero y col. (2007) y Montechia y col. (1997). Se homogeneizaron 8 g de Músculo, por 1 min, en 160 ml de solución fría de buffer 0,6 moles/L KCl y 0,003 moles/L NaHCO₃, pH 7; se centrifugaron en frío a 5.000 rpm durante 20 minutos, se extrajo el sobrenadante el cual contiene las

proteínas solubles en solución salina. Este sobrenadante se utilizó en la determinación del contenido de proteínas totales por el método Microkjendahl (proteína total extraíble en solución salina) 955.04, 988(AOAC, 1990).

4. Textura:

Se tomaron un total de tres muestras de músculo de cada grupo y se procedió a medir la textura por doble compresión, tomando en cuenta el parámetro por deformación de las muestras usando un Texturometro Analyzer TA.XT2[®] (Stable Micro Systems Haslemere, Surrey, K) equipado con un émbolo cilíndrico (12 mm diámetro). La fuerza (N) fue recorrida continuamente durante la compresión en una curva de textura (Textura profile Análisis TPA60) con una célula cargada de 5 kg y un disparador de fuerza de 0,01 N a una tasa de deformación de 1 mm s⁻¹ hasta haber alcanzado 60% de la altura de la muestra inicial.

5. Análisis estadístico:

Los resultados obtenidos fueron tabulados en Excel y analizados con el programa Statgraphics plus 5.1 mediante una prueba de ANOVA de una vía, con un nivel de significancia del 5%. Las variables dependiente fueron los cambios físicos y químicos en el músculo y la actividad enzimática.

V. RESULTADOS Y DISCUSION

Se debe señalar que en la realización del presente trabajo de investigación para la obtención de los resultados presentados se contaban con una cantidad de muestras de músculo muy pequeña de tal forma que se presenta la ausencia de ciertos resultados de interés como en los parámetros de proteínas solubles y los cambios de textura para muestras congeladas en los diferentes estadios de madurez gonadal, de tal manera que se utilizaron muestras frescas para cumplir objetivos propuestos y constatar las influencias dentro del tejido muscular.

1. Caracterización del músculo de Bagre Sierra (*Oxydoras sifontesi*).

El análisis proximal es útil para conocer la composición de los alimentos, encontrándose que la composición química presenta variaciones dependiendo de factores tanto ambientales como fisiológicos.

El bagre al igual que cualquier otro tipo de pescado, está compuesto básicamente por agua, proteína, grasa y cenizas, así como también de un contenido de vitaminas y minerales Kird (2004). El porcentaje de los componentes del músculo del pescado han sido reportados por muchos autores, sin embargo estos valores varían ampliamente, según sea la especie, el estadio de desarrollo, el hábitat del pez, el tipo de alimentación y el desarrollo gonadal; estos provocan agotamiento de las reservas de proteínas y lípidos.

En esta investigación se evaluó la composición química del músculo de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*) de machos y hembras. Los resultados se

muestran en la tabla N° 1. En ésta se observan los porcentajes de humedad, grasa, proteínas y cenizas, que coinciden con los valores obtenidos por Lovell (1991) quien trabajo con musculo de bagre de canal y obtuvo valores de humedad: 76-78%, proteína: 16%, grasa: 4,7% y cenizas: 1,0%. De igual forma para filetes de Lebranche (*Mugil liza*). Similarmente, Baptista (2004) y INN 1999, reportaron humedad: 71-79%, proteína: 19%, grasa: 2,7-7,2% y cenizas: 1,1%.

Tabla N° 1. Composición proximal (% \pm DS) y pH del músculo fresco de machos y hembras de Bagre Sierra (*Oxydoras sifontesi*).

	HUMEDAD	CENIZAS	PROTEINAS	GRASAS	pH
Macho	75,99\pm0,16	2,02\pm0,07	18,38\pm0,34	1,32\pm0,11	6,02\pm0,05
Hembra	80,58\pm0,17	4,41\pm0,25	14,04\pm0,01	0,52\pm0,02	5,97\pm0,05

Resultados de tres replicas \pm DS.

Se observó que en la composición proximal del músculo de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*) entre machos y hembras existe diferencias significativas, para el caso de los machos el porcentaje de humedad es menor comparándolo con las hembras, sin embargo el contenido de proteína y grasa es mayor para el caso de los machos lo cual nos indica que resulta un ejemplar con mayor valor nutritivo y de mejor calidad para su consumo.

En las muestras de hembras en músculo de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*) se observó un alto porcentaje de humedad y de cenizas, estos resultados coinciden con los observados por Sato (1992), quien trabajo con muestras de truchas donde obtuvo un incremento marcado en el contenido de humedad debido a la disminución en el contenido de proteína del músculo, esto se puede asociar a que la hembra gasta parte de su energía en el desarrollo y mantenimiento de los huevos

durante la fase cercana al desove en dicha especie, una vez que ocurre la hidrólisis de dicha proteína miofibrilar se sustituye por el agua. Bradford (1993) sugirió que estas estructuras son utilizadas para apoyar el desarrollo gonadal.

Los resultados que se muestran en la tabla N° 1, en lo que respecta al pH de las muestras se obtuvieron en muestras frescas de bagre sierra. En pescados recién capturados el pH del tejido muscular se sitúa en valores cercano a 7, se observó que en ambas muestras frescas del tejido muscular no existen significativas de pH, posteriormente la glucólisis post-mortem ocasiona la transformación de glucógeno en ácido láctico con lo cual el pH final baja entre 6-6,5.

2. Efecto del pH en músculo de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*) durante su ciclo reproductivo.

Los resultados de pH del músculo de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*), tanto para hembras como para machos durante los diferentes estadios del ciclo reproductivo se muestran en la figura N° 1 (tabla N° 2). Se observa en las hembras diferencias significativas entre las diferentes fases del ciclo reproductivo al igual que un aumento de este parámetro físico a medida que ocurre el desarrollo gonadal hasta la recrudescencia de la especie. Según Tarr, (1966) el pH post mortem inicial varía con las especies, área de pesca y época del año. La variación estacional del pH de la carne está relacionada con la reserva de energía del pescado. Sin embargo después de la muerte, mucho del glucógeno se descompone hidrolíticamente en glucosa por lo que hay una correlación directa entre el contenido de glucógeno y el pH post mortem.

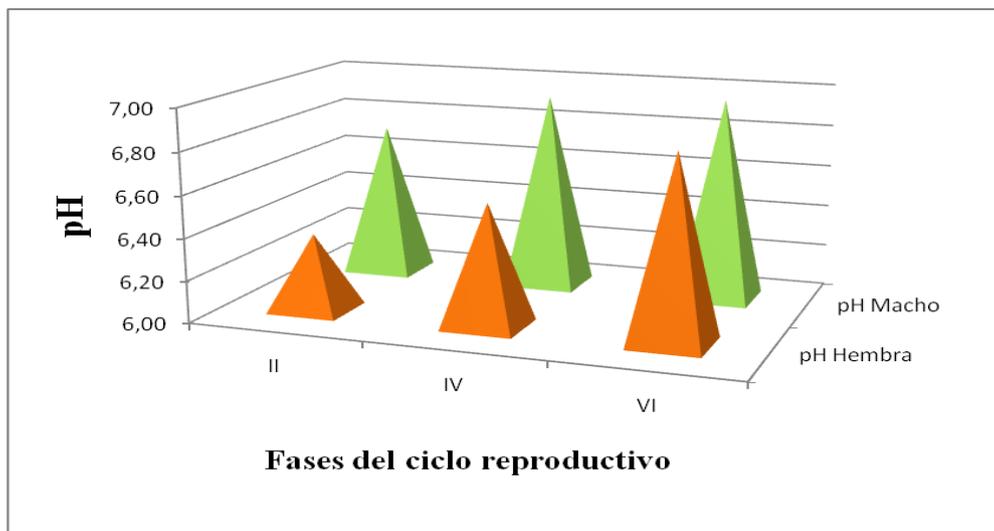


Figura N° 1. Efecto del pH en el músculo de machos y hembras de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*) durante su desarrollo gonadal.

Tabla N° 2. Efecto del pH en músculo de hembras y machos de bagre sierra (*oxydoras sifontesi*) durante su ciclo reproductivo.

	Hembra	Macho
Fase II	6,36 ± 0,03 ^{aa}	6,73 ± 0,07 ^{ab}
Fase IV	6,57 ± 0,05 ^{ba}	6,93 ± 0,04 ^{bb}
Fase VI	7,09 ± 0,06 ^{ca}	6,96 ± 0,07 ^{bb}

Resultados de tres replicas ± DS.

En la tabla N° 2 se observan los valores numéricos obtenidos sobre el efecto del pH en músculo de machos de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*); en donde se observó diferencias significativas entre la fase II (pre-desove) y post-desove; incrementando los valores de pH a medida que ocurre la maduración gonadal. Se puede inferir que a medida que aumenta el pH la actividad enzimática tiende a aumentar por dicho efecto durante la maduración gonadal.

Según Moreno (1985) las propiedades físico-químicas de las cadenas laterales del grupo de aminoácidos dependen en gran proporción del pH del medio en que se encuentre así también los cambios de pH ejercen una gran influencia sobre la actividad biológica de las enzimas; no solo por modificar el estado de ionización de los diferentes grupos químicos que componen el sitio de unión y sitio catalítico necesario para la unión y catálisis del sustrato sino que también modificando grupos químicos esenciales para el mantenimiento de la estructura terciaria, los cuales pueden producir una pérdida de esa conformación necesaria y por ende una disminución de la función catalítica.

Las catepsinas contenidas en los lisosomas celulares, son las endo-enzimas musculares de mayor actividad proteolíticas, tanto en condiciones acidas como alcalina, variando su nivel de actividad y los subtipos presentes según las especies. La actividad optima de las catepsinas se ejercen a bajos valores de pH (acido) Bertullo (1989).

3. Proteínas solubles en músculo de bagre sierra:

Las proteínas miofibrilares son muy importantes en el músculo de pescado para propósitos tecnológicos, pero estas, son muy propensas a sufrir alteraciones durante el almacenamiento en congelación. La desnaturalización de las proteínas ha sido definida como un cambio en su estructura que conlleva a la pérdida de sus propiedades funcionales, entre ellas la solubilidad.

El contenido de proteínas solubles para las muestras de bagre sierra frescas en las diferentes especies tanto hembra como machos, se muestran en la tabla N°3.

En ésta se observan diferencias significativas en el porcentaje de solubilidad de las proteínas entre las sexo, sin embargo en macho es mayor el contenido de proteínas solubles existiendo por tanto una menor degradación de las proteínas totales en el tejido muscular.

Tabla N° 3.- Proteínas solubles (% \pm DS) del músculo de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*).

	Proteínas Solubles
Hembra	6,97\pm0,04^a
Macho	7,44\pm0,56^b

Resultados de tres replicas \pm DS.

En esta investigación como parte de los objetivos planteados se quería observar el efecto de la solubilidad de las proteínas del bagre sierra en los diferentes estadios de madurez gonadal sin embargo esto no se pudo realizar por no contar con la cantidad de muestras necesarias para cubrir este objetivo.

Según González (2001), observo al estudiar los cambios en proteínas en filetes de bagre (*Tachysurus dussumien*) durante 300 días de almacenamiento a -20°C una disminución en la proteína soluble en solución salina, lo cual indico desnaturalización de las proteínas en almacenamiento prolongado. Por otra parte, Jiang y col (1998) encontraron una disminución de las proteínas solubles en solución salina en pulpa de bagre sometida al proceso de lavado y sin lavar almacenadas a -20°C durante 3 meses.

4. Concentraciones de catepsinas B y D en músculo de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*):

Hoy se reconoce que uno de los principales mecanismos reguladores de la actividad enzimática se basa en la alteración de la cantidad absoluta de enzima en la célula. La concentración de las enzimas proteolíticas es la resultante entre las velocidades que llevan a su síntesis y degradación. Se denomina inducción al aumento de la concentración de la enzima por aumento en su síntesis y represión a su disminución durante este proceso. La síntesis de proteínas, y por lo tanto de las enzimas, está regulada primordialmente a nivel de la transcripción del DNA, para dar RNA mensajero, Moreno (1985).

En diversos tejidos existen organelos denominados lisosomas que contienen enzimas con gran actividad proteolítica; entre ellos se encuentran las catepsinas, reconocidas por su participación en el ablandamiento *post-mortem*. Los lisosomas tienen membranas lipoproteínicas intactas a los niveles de pH *in vivo* pero que se rompen durante el proceso *post-mortem*, o cuando el tejido sufre una lesión grave, liberando las enzimas proteolíticas. Las catepsinas lisosomales tienen un efecto conjunto con las calpainas del músculo durante el proceso de acondicionamiento, pero se ha sugerido que las catepsinas son más importantes que las calpainas en el rompimiento de la miofibrilla después del *rigor mortis* (Hui y col, 2006).

La concentración de las enzimas proteolíticas (catepsina B y D) en músculo de hembras control (referencia) y músculo congelado se observan en las figuras N° 2 y 3 (tabla 7, apéndice 1), dicho músculo se encontraban en fase IV maduración gonadal observándose diferencias significativas entre ambas muestras, sin embargo se observó que para las muestras control existe mayor contenido de las captesinas B y D durante este ciclo reproductivo.

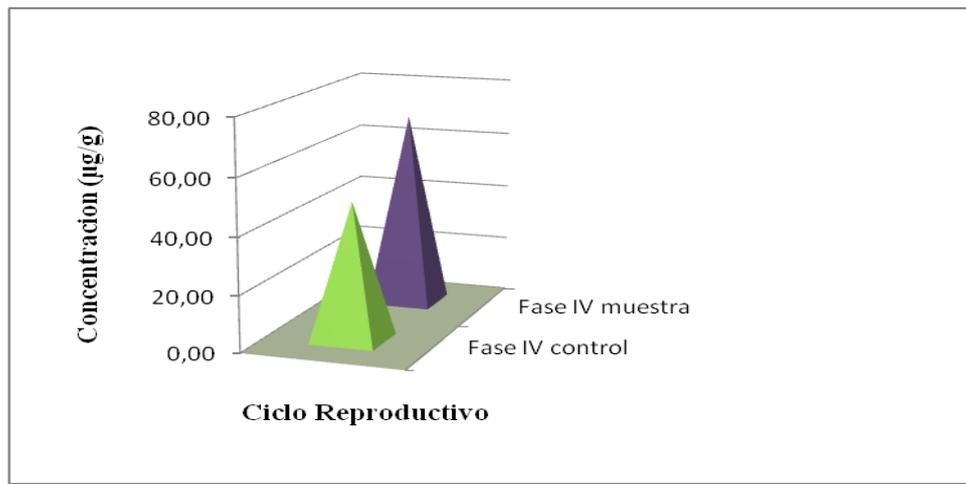


Figura N° 2. Concentración de catepsina D ($\mu\text{g/g} \pm \text{DS}$) en músculo de hembras en fase (IV) maduración gonadal de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*).

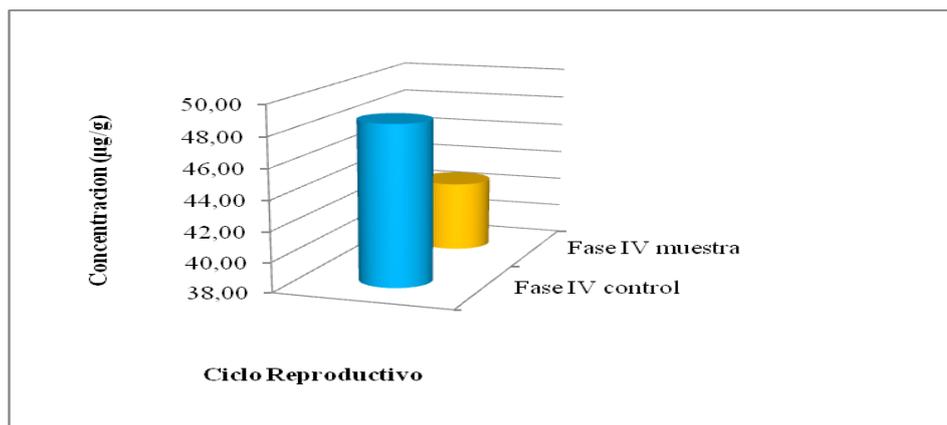


Figura N° 3. Concentración de catepsina B ($\mu\text{g/g} \pm \text{DS}$) en músculo de hembras en fase (IV) maduración gonadal de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*).

Los resultados nos permitieron observar un mayor aumento de la catepsina D y B en esta fase IV con respecto al control y se observó que si existe influencia del tiempo en congelación de dichas muestras por periodos prolongados de almacenamiento.

En la figura 4 (tabla 5, apéndice 1) se muestran los resultados obtenidos para la concentración de las catepsina D para muestras en músculo de hembras de bagre sierra, Se observa que existe diferencia significativas ($p > 0,05$) entre las diferentes fases del ciclo reproductivo, observándose que la mayor concentración de la enzima se presenta durante la fase de pre-desove. En la figura 5 (tabla 6, apéndice 1) se muestra los resultados de la concentración de la catepsina D en músculo de machos de bagre sierra se observa diferencias significativas entre las fases de la maduración gonadal, y una disminución a medida que ocurre la maduración sexual.

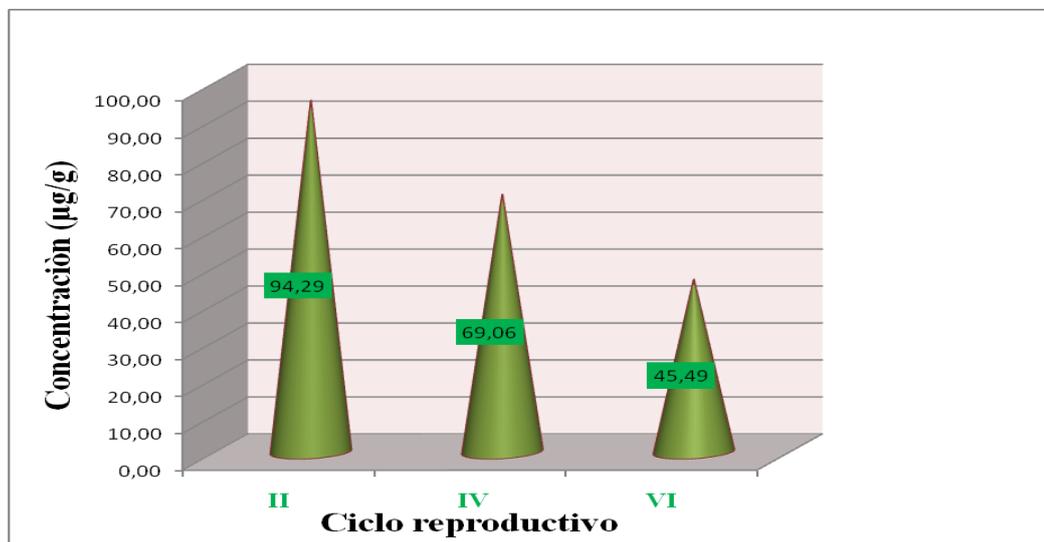


Figura N° 4. Concentración de catepsina D ($\mu\text{g/g} \pm \text{DS}$) en músculo de hembras de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*).

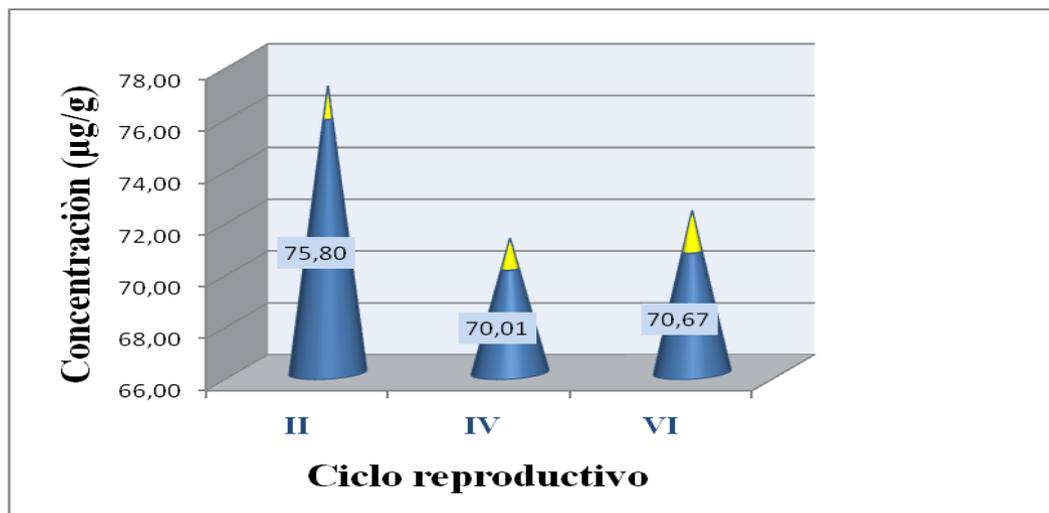


Figura N° 5. Concentración de catepsina D ($\mu\text{g/g} \pm \text{DS}$) en músculo de machos de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*).

Al comparar estos resultados con los obtenidos de las concentraciones para las muestras de músculo entre hembras y machos de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*), mostrados en la figura 6 se observó una disminución de la catepsina D entre ambos sexos a medida que ocurre el desarrollo de las gónadas, de forma general se muestra la comparación entre los diferentes comportamientos de la cantidad de enzimas presente en las muestras del tejido muscular, la tendencia en ambos sexos es muy similar, sin embargo la mayor concentración de la catepsina D se presentó en hembras la cual se obtuvo en las primeras fases del ciclo reproductivo para esta especie y la misma disminuye hasta la fase post-desove. Estos resultados son similares al aumento de la expresión de la catepsina D que se ha obtenido durante la atrofia muscular de peces asociados con el desove (Salem y col. 2006). Los autores proponen que el proceso de catabolismo implicado en la activación de la caspasa-9, es un mediador de la apoptosis. La catepsina D ha sido efectivamente registrada como un mediador importante de la

muerte celular (Kagedal, Johansson, y Ollinger, 2001). En el mismo estudio, se demostró claramente que se traslocan catepsinas D, B y L de los lisosomas al citosol durante la apoptosis temprana.

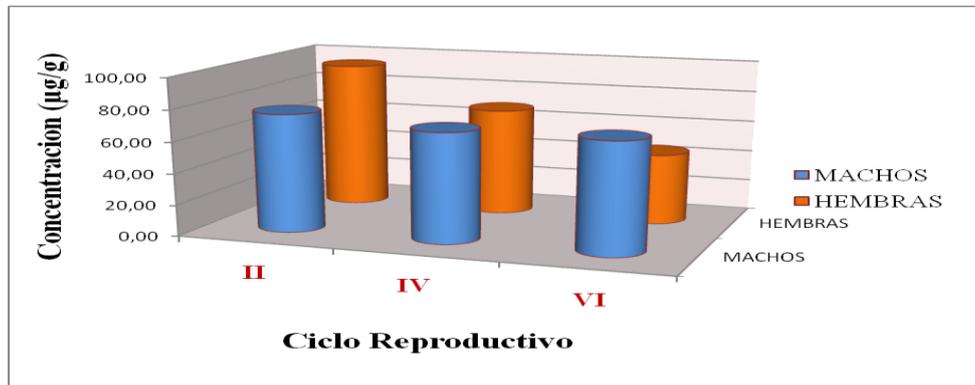


Figura N° 6. Concentración de catepsina D ($\mu\text{g/g} \pm \text{DS}$) en músculo comparación entre machos y hembras de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*).

Según Aoki y Ueno (1997), quienes estudiaron que la catepsinas D podrían participar en la proteólisis post-mortem para la liberación de la α -actina y algunos otros cambios.

En la figura N° 7 (tabla N° 6, apéndice 1) se muestra los resultados de la concentración de la catepsina B en músculo de machos de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*). Se observa que solo existe diferencia significativa en la fase IV (maduración) entre las muestras, y a su vez se presenta en esta fase la menor concentración de esta proteasa en el músculo. Las mayores concentraciones de la catepsina B se obtuvieron en las fases II y VI del ciclo reproductivo.

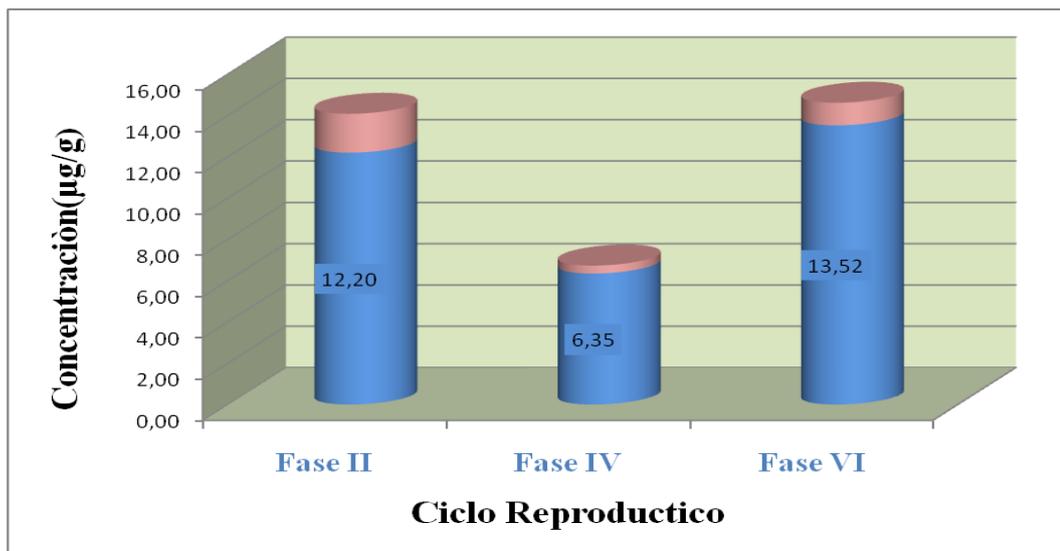


Figura N° 7. Concentración de catepsina B ($\mu\text{g}\pm \text{DS}$) en músculo de machos de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*).

Los resultados de la concentración de la catepsina B para las hembras de bagre sierra se muestran en la figura 8 (tabla 7, apéndice 1), se observó que existen diferencias significativas entre las diferentes fases del desarrollo gonadal y la mayor concentración de la catepsina se puede observar en la fase IV del ciclo reproductivo.

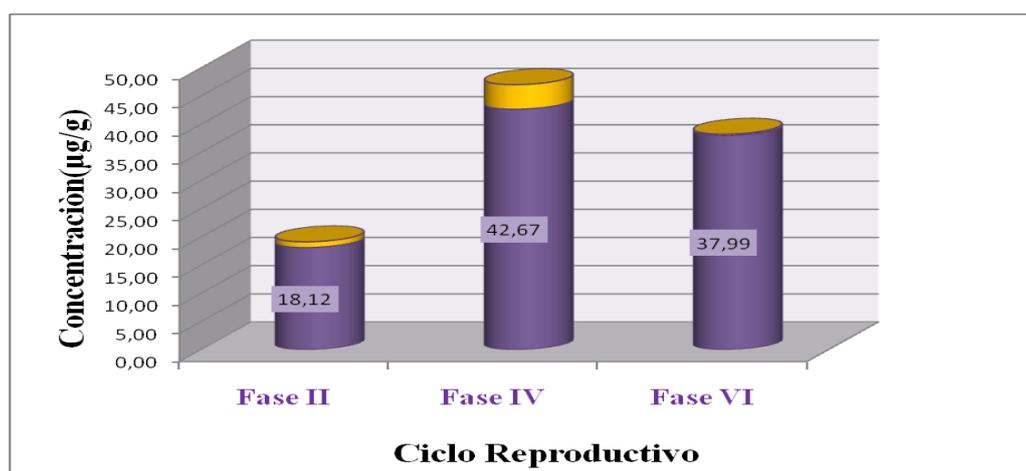


Figura N° 8. Concentración de catepsina B ($\mu\text{g}\pm \text{DS}$) en músculo de hembras de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*).

Al comparar ambos sexos los resultados se muestran en la figura N° 9, el mayor contenido de enzimas proteolíticas B se presentan en las hembras del bagre sierra durante el desarrollo gonadal esto se observó en la fase IV a diferencia de los machos la mayor concentración se obtuvo para la primera fase pre-desove y post-desove del ciclo reproductivo.

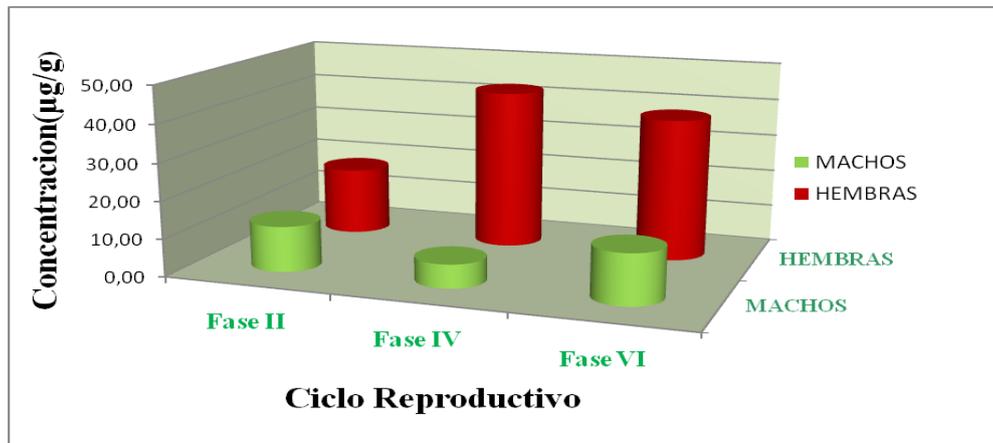


Figura N° 9. Concentración de catepsina B ($\mu\text{g/g} \pm \text{DS}$) en músculo comparación entre machos y hembras de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*).

Los resultados muestran que hay algunas diferencias en las cantidades de proteasa en el músculo, dependiendo de la familia de las proteasas consideradas; y que la que presenta mayor cantidad en el músculo es la catepsina D, que en otros estudios se ha determinado que es la enzima mediadora de la apoptosis muscular.

5. Actividad Enzimática de las Catepsinas:

Según Marcano y col. (2007), en su estudio de la biología de la reproducción en *Oxydoras sifontesi* y *P. sifontesi blochii*; observaron que en ambas especies la maduración gonadal tenía patrones similares de reproducción. Entre Octubre y Marzo las especies recolectadas se encontraban en fase II (post-reproductora y

comienzo de periodos de preparación), la etapa IV-V fueron abundantes entre abril y mayo y la etapa VI en el mes de julio la denominada fase post- desove.

La actividad enzimática se observa en las figuras: 10, 11 y 12, los resultados obtenidos específicamente de las catepsinas B, D y L en músculo de hembras (control) de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*) y las muestras analizadas en donde se observa que existen diferencias significativas entre tratamientos en ambas. También se debe destacar que la mayor actividad de las enzimas proteolíticas se observó en el control durante esta fase IV de maduración gonadal estos resultados son similares a los reportados por Borla y col. (2002) quienes encontraron que en muestras de tejido de músculo fresco de merluza (*Merluccius hubbsi marini*) un incremento de la proteasas. Konagaya (1982) informó que los aumentos en la actividad proteolítica del músculo de salmón es posible atribuirse a catepsinas proteasas provocada por la migración al desove. Los esteroides sexuales, tales como en suero de andrógenos y estrógenos estaban estrechamente relacionados con altos niveles de actividad de las proteasas en el músculo de salmón chum, durante la migración al desove. Ando (1985) trabajo con la especie de caballa, mostrando una mayor actividad proteolítica del músculo que estaba relacionada con el estado fisiológico de los peces. Yamashita (1990) observó aumentos de las actividades proteolíticas en el músculo del pescado, lo cual estaba relacionado con cambios en la actividad de inhibidores de las proteasas y/o intensificación de las actividades lisosomal o extralisosomal. Pudiéndose inferir en los resultados presentados en esta investigación la presencia de altos niveles de actividad proteolítica de las catepsinas B, D y L en músculo en la fase (IV) de

maduración gonadal y de la actividad autolítica luego de largos periodos de almacenamiento en las especies.

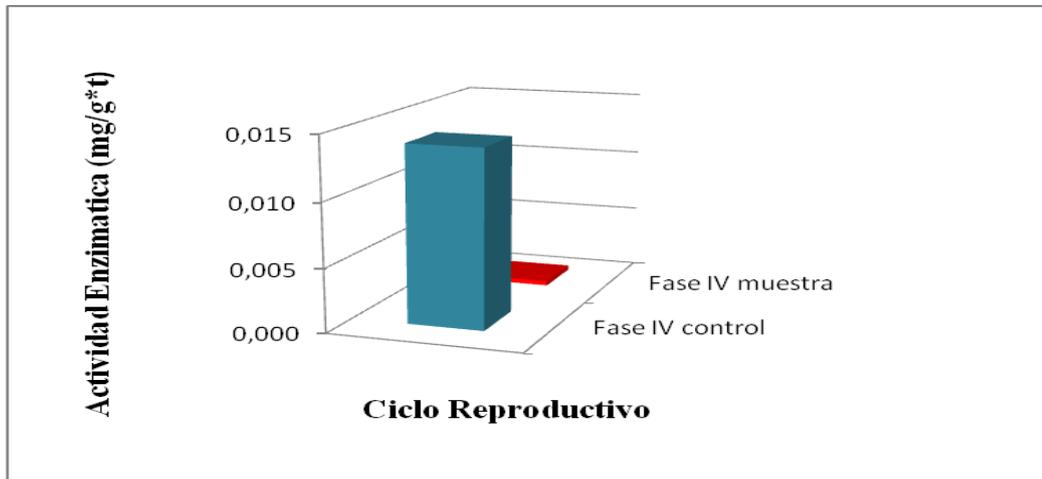


Figura N° 10. Actividad enzimática de catepsina D (mg/g*t) en músculo de hembras de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*) durante la fase de maduración gonadal.

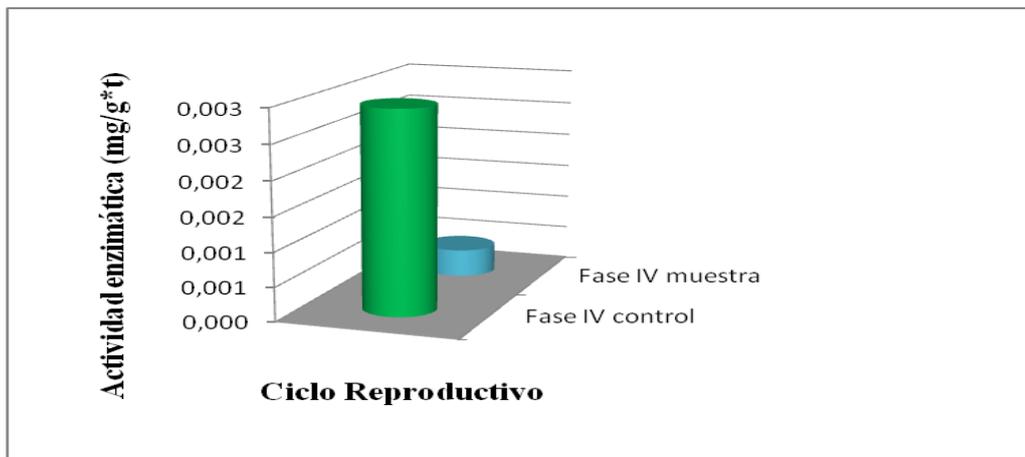


Figura N° 11. Actividad enzimática de catepsina L (mg/g*t) en músculo de hembras de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*) durante la fase (IV) de maduración gonadal.

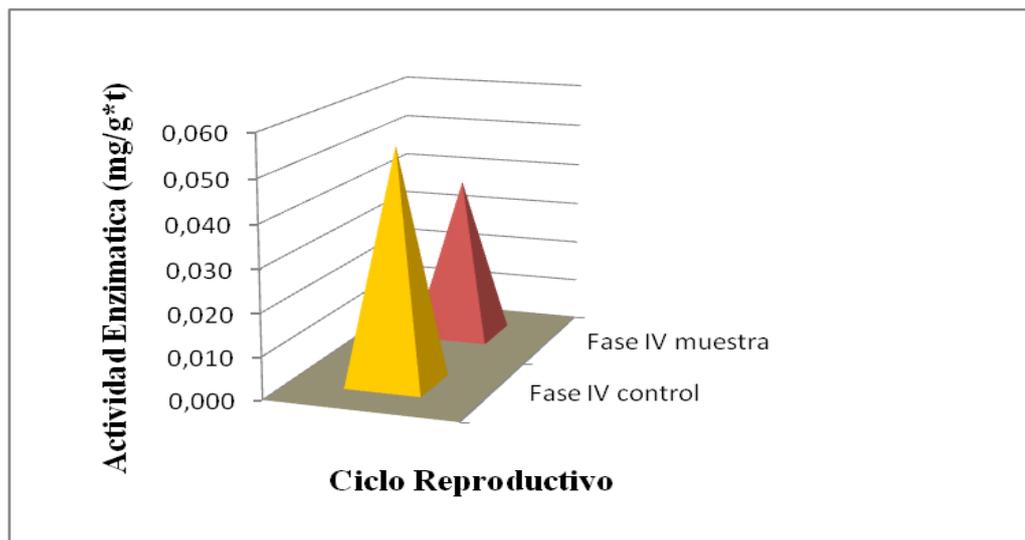


Figura N° 12. Actividad enzimática de catepsina B (mg/g*t) en músculo de hembras de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*) durante la fase (IV) de maduración gonadal.

Los resultados presentados en este trabajo demostraron la presencia de niveles altos de actividades enzimáticas de la catepsina L en músculo de hembra de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*), que se muestran en la figura 13 (tabla 8, apéndice 1), donde se observa un incremento de la acción de esta enzima en la fase VI (post-desove), encontrándose que si existen diferencias significativas entre las fases del desarrollo gonadal. En lo relacionado a la determinación de la actividad de la catepsinas L en el músculo de machos de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*), se observa en la figura 14 (tabla 9, apéndice 1), el mayor efecto de la actividad de esta proteasa se presenta en la fase II, seguida de la fase VI (post-desove), y en el análisis estadístico se obtuvo que si existe diferencias significativa entre las diferentes etapas del ciclo reproductivo. Estos resultados obtenidos no coinciden con Carnevali y col. (1999a) quienes encontraron una mayor actividad de la catepsina L en el músculo de dorada (*Dicentrarchus Labraz*) ocurre durante

mediados de la vitelogénesis.

El análisis de las actividades proteolíticas ha indicado que en muestras del pescado fresco en estado de pre-desove tenían una mayor actividad autolítica en los extractos del músculo al igual que post-desove. Esto una vez se someten a congelación, en parte puede explicarse por algunas modificaciones que podrían ocurrir durante el almacenamiento y descongelación; fenómenos tales como la interrupción de las sub-estructuras celulares (Dyer y Dingle, 1961).

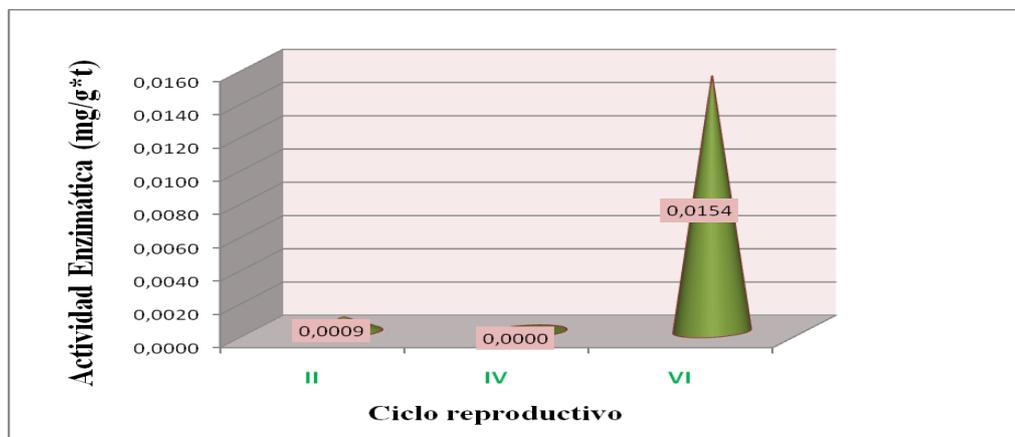


Figura N° 13. Actividad enzimática de catepsina L (mg/g*t) en músculo de hembras de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*).

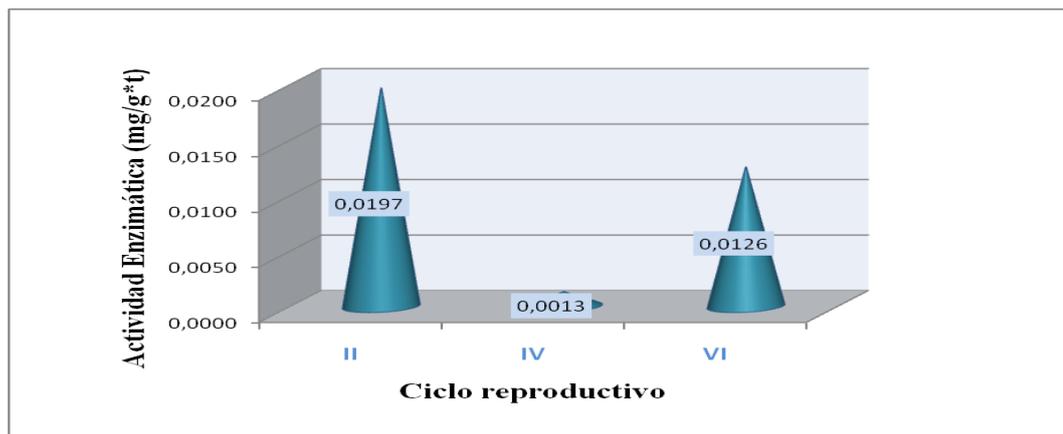


Figura N° 14. Actividad enzimática de catepsina L (mg/g*t) en músculo de machos de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*).

Las catepsinas se encuentran normalmente en los lisosomas y por lo tanto son inactivas en los tejidos vivos debido a que no están en contacto con sus sustratos. Sin embargo, pueden llegar a ser liberados en el citosol debido a la interrupción lisosomal después de la muerte. Se ha demostrado que, en el músculo de especies de mar, se expresa de manera diferente dependiendo de la estación del año Ladrat (2000). Por otra parte, las catepsinas B, D y L, H son las catepsinas importantes dentro de los lisosomas de pescado Aoki, Yamashita (2000).

Zamora (1996) informó que un músculo de carne de vacuno inicialmente rico en enzimas se hace más blando. Las catepsinas B podría tener un papel importante en el deterioro post-mortem en el músculo de pescado pero fue demasiado baja esta actividad en músculo de bovino comparadas con músculo de pescado.

En los resultados presentados en este trabajo relacionado con la actividad enzimática de las catepsinas B en músculo de hembras de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*) que se muestran en la figura 15 (tabla 8, apéndice 1), se observa un mejor desempeño de la enzima proteasa en el etapa VI del ciclo reproductivo de la especie estudiada, presentando diferencias significativas $p (>0,05)$ entre las fases que conforman el desarrollo gonadal.

En la figura 16 (tabla 9, apéndice 1) se presentan los resultados de la actividad de las catepsinas B en músculo de ejemplares machos de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*), en el cual se evidencia que el efecto de la actividad de la enzima proteolítica similar al caso de las hembras, obteniéndose un aumento de

la misma en la etapa VI (ya ocurrida la fase del desove). Sin embargo es de hacer notar que estos resultados no coinciden con los obtenidos por Barrero (2005), quien trabajo con muestras de ovarios en la actividad de la catepsina B durante la ovogénesis en teleósteos. Obteniendo que la actividad de la catepsina B fue la más baja entre los catepsinas. En contraste con las observaciones para catepsinas D y L, la mayor actividad se produjo en noviembre, diciembre y marzo. Sin embargo se puede inferir en este estudio que para el caso de tejido muscular existe una incidencia marcada de la actividad de esta proteasa (catepsina B), este estudio coincide con Kwon y col. (2001) observó alta actividad de la catepsina B en la trucha arco iris en todas las etapas de la ovogénesis.

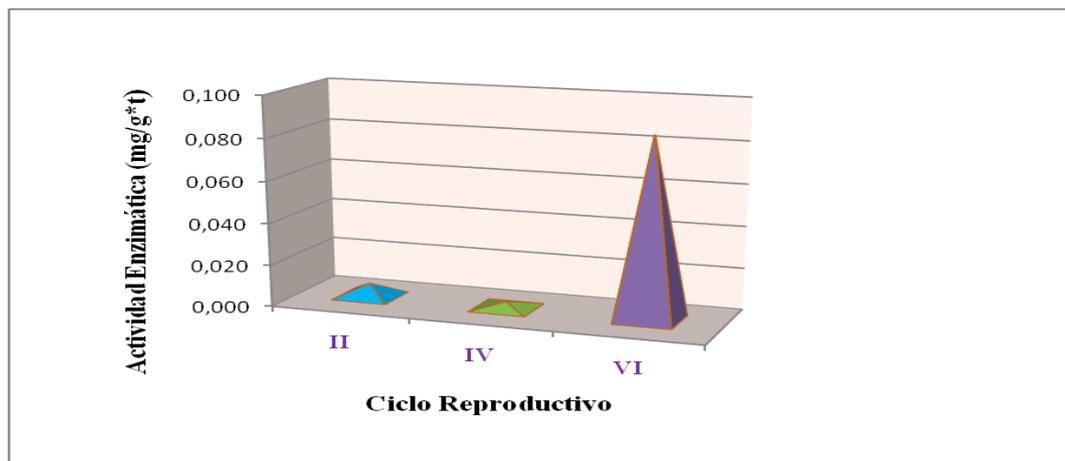


Figura N° 15. Actividad enzimática de catepsina B (mg/g*t) en músculo de hembras de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*).

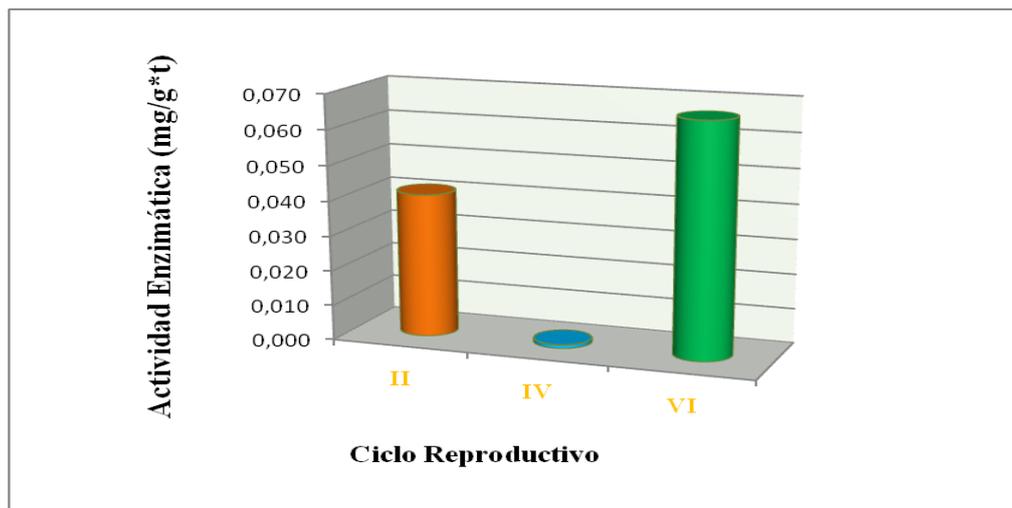


Figura N° 16. Actividad enzimática de catepsina B (mg/g*t) en músculo de machos de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*).

En bagre la actividad de la catepsina D, se observó que es más alta en marzo y mayo. Patiño y Sullivan (2002) declararon que esta proteasa es responsable de la producción de proteínas de la yema en vitelogenesis.

En la figura 17 (tabla 8, apéndice 1), se muestra la actividad enzimática de las catepsina D en músculo de hembras del bagre sierra, en donde se observa que no existen diferencias significativas entre las fases II y IV del ciclo reproductivo, solo en la etapa VI si existen diferencias estadísticamente importantes, a su vez el aumento del efecto de esta enzima proteasa sobre el tejido muscular se ve marcado para la fase VI en la reproducción de la especie. Para el caso del músculo de machos del bagre sierra, la actividad enzimática se muestra en la figura 18 (tabla 9, apéndice 1), que a diferencia de las hembras si existen diferencias significativas en las fases en su reproducción y la acción de la enzima al igual que se muestra para el caso de las hembras este efecto se desempeña más en la etapa VI. Según Kwon

y col. (2001) informó que el máximo de actividad de la catepsina D de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) se produjo antes o al inicio de la vitelogénesis, y se expresa de forma abundante en toda vitelogénico, el crecimiento y la maduración final de los ovocitos. Carnevali y col. (1999a) y Kestemont y col. (1999), llegaron a la conclusión de que la catepsina D en la percha fue más alta a principios de ovocitos vitelogénico cuando la proteína de la yema se estaba depositando en un alto porcentaje. En el bagre de canal la actividad enzimática de la catepsina D se elevó a medida que trascurren las fases luego de la vitelogenesis, con la mayor actividad observada en mayo, cerca de la estación de desove.

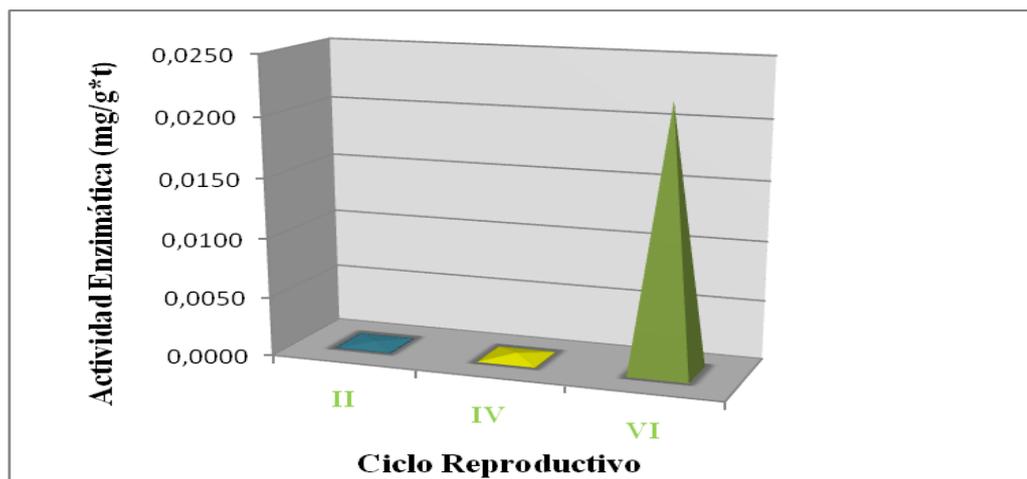


Figura N° 17. Actividad enzimática de catepsina D (mg/g*t) en músculo de hembras de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*).

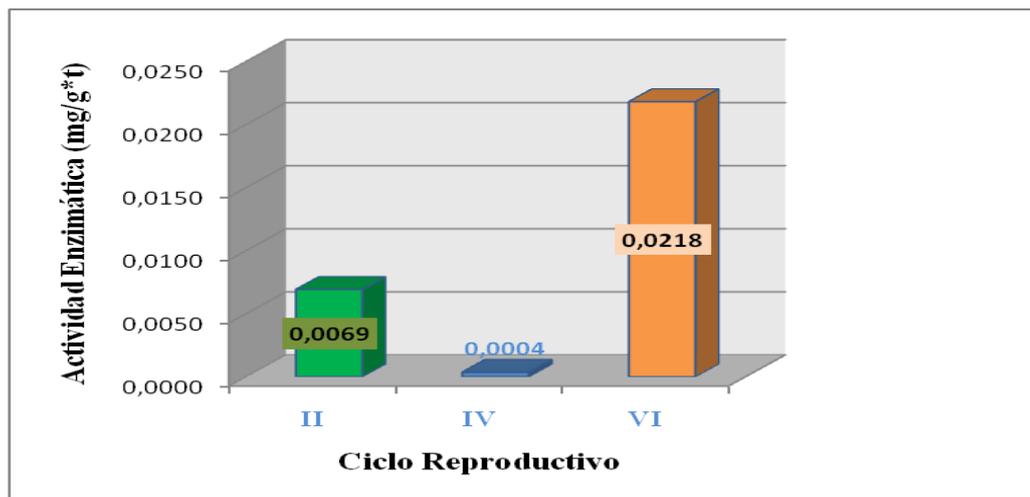


Figura N° 18. Actividad enzimática de catepsina D (mg/g*t) en músculo de machos de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*).

En general en el presente estudio se observo para el caso de la fase II en las hembras que la actividad de la enzimas proteolíticas del músculo de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*), existen diferencias significativas entre las catepsinas, sin embargo la catepsina B fue mayor en esta etapa del ciclo reproductivo comparadas con las otras proteasas. La etapa IV no existen diferencias significativas entre las catepsinas, al igual que la fase anterior se encuentra la proteasa B en mayor actividad en esta etapa. Por último para el caso de la fase VI solo se observaron diferencias para la catepsina L mas no hubo diferencias entre B y D, y a su vez la catepsina L en esta fase del ciclo reproductivo se encuentra en mayor proporción actuando a nivel muscular. Observándose que en el caso de la hembra la utilización de las proteínas presentes en el músculo para la preservación de la madurez de sus gónadas y una vez ocurre el proceso del desove sus reservas energética han sido utilizadas y el músculo se encuentra más deteriorado en esta fase del ciclo reproductivo.

La desmina se ha degradado por la catepsina B y L; tropomiosina y actina se dividieron por la proteasa L, mientras que los 32 KDa troponina T fue degradada por la catepsina L. Las enzimas B y L provocan la degradación extensa de las proteínas. Estos resultados sugieren que la catepsina D podría participar en la proteólisis post-mortem para la liberación de la α - actina y algunos otros cambios.

Crupkin y Roura (1995) trabajaron con miofibrillas de merluza informaron la presencia de cadena de miosina degradadas en el músculo en desove. Las actividades proteolíticas podrían ser responsables de los cambios en las proteínas miofibrilares que produjo una pérdida en la calidad del músculo de pescado.

Las actividades de las proteasas del músculo de machos de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*), observados en este estudio se obtuvo para la fase II, existen diferencias significativas entre las catepsinas B, D y L, y la mayor acción la ejerce la enzima catepsina L. En la etapa IV (maduración) no existen diferencias significativas $p (<0,05)$ entre las proteasas, sin embargo la catepsina D presenta mayor actividad. En lo que respecta a la última fase del ciclo reproductivo la fase post- desove, se encontraron diferencias significativas entre las catepsinas, la mayor acción degradativa sobre el tejido muscular lo ejerce la catepsina D, seguida de la L.

La actividad de la catepsina L disminuyeron tras la de la ovulación y comenzó a reaparecer después de la fertilización de la huevos. Del mismo modo, Hiramatsu y col. (2002b) concluyó que la catepsina L estuvo involucrado en la proteólisis de la secundaria las proteínas de la yema durante la maduración final de los ovocitos en blanco percha.

Lo reportado por Salem (2005), el cual estudio la acumulación de la catepsina-L ARNm en el pez estéril no se ve afectado por la temporada, sin embargo, hubo un caída de la catepsina-L ARNm en los peces fértil durante el desove hasta después de las temporadas de desove catepsina-L, los cuales mostraron una correspondiente disminución de la actividad de las enzimas proteasas en desove para los peces fértil en relación con los peces reproductores fértiles. Del mismo modo, la acumulación de la catepsina D-ARNm en el fértil disminuyó en desove de peces, comparada con post-desove. Sin embargo, la catepsina B, la acumulación de ARNm no muestra una diferencia significativa como resultado de la temporada o de los factores de fertilidad.

Estos resultados de la actividad proteolíticas en la degradación de filamentos musculares, pérdida de textura y la funcionalidad de las proteínas miofibrilares, conllevan a que se limite su uso para la industria pesquera, estos son similares a los de Martínez de Velasco, Rodero, Zapatero, Y Cuéllar, (2002). Que reportaron en el tejido muscular de merlán, infectados con Myxosporidia (Bacterias), observando que contiene altas los niveles de actividad proteolítica. Las proteasas implicadas pueden hidrolizar las proteínas del músculo esquelético de los peces y su tejido conjuntivo que, en a su vez inducen ablandamiento de tejidos lo que afecta su comerciabilidad. Adlerstein & Dorn, 1998; Kabata y Whitaker, (1981), Trabajaron con surimi observando que presentan alta actividad proteolítica en el músculo lo que produce una baja calidad, debido a la degradación de la miosina necesaria para formar el gel del surimi.

Se ha encontrado que ambos, el pH y temperatura óptimas para la actividad de la proteasa están influenciados considerablemente por el sustrato utilizado, según An y col. (1994). Las fuentes de sustrato, como la caseína y la urea de la hemoglobina desnaturalizada, se han utilizado para medir la presencia de actividad proteolítica en el músculo de pescado. Sin embargo, como el desarrollo de textura blanda refleja la hidrólisis de proteínas estructurales del músculo, es más significativo y más práctico, desde el punto de vista de la producción de hidrolizados funcional, para medir la actividad de las proteasa frente a las proteínas miofibrilares.

5. Texturas del Músculo de Bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*):

Los principales parámetros en la calidad del pescado son la frescura, textura, grasa y el color en el mismo. La textura del musculo es un factor decisivo en la aceptabilidad de los productos pesqueros porque contribuye de forma definitiva en la palatabilidad de los mismos Huss (1994).

Los cambios en la textura del musculo han sido relacionados con numerosos fenómenos dentro de los cuales se pueden mencionar, degradación de las proteínas miofibrilares o del colágeno, la formación de agregados de proteínas y cambios ultraestructurales Ogata (1998).

La firmeza es un factor muy importante para evaluar la calidad de la carne de pescado y fundamental al momento de comercializarla. Algunos estudios demuestran que, con cierta frecuencia, la carne de pescado se ablanda después de 24 horas de almacenamiento en frío Toyohara y Shimizu (1991).

Los resultados para la textura en el músculo de bagre sierra se muestran en la tabla N° 4 (figura 19), Se observa que para el caso de los machos el tejido muscular presenta una mayor dureza(g) y fuerza (g), la cual se expresa como la fuerza necesaria para obtener una deformación, pudiéndose inferir que la textura en el músculo del macho del bagre sierra presenta mayor firmeza , característico de la carne de pescado y por tanto el músculo se encuentra en mejor calidad por el contrario para el caso de la hembra del bagre sierra donde se observo una menor dureza en su tejido muscular y su por tanto mayor ablandamiento del músculo.

Se puede inferir que la firmeza del músculo puede estar asociada con la actividad de las enzimas proteasas en dichas muestras, y observadas en la tabla 8 (apéndice 1), en cuyos resultados pudimos observar para las muestras, que estos resultados coinciden con los obtenidos por Ladrat (2006), quien concluyo que la actividad de la catepsina B es mucho menos perjudicial para la firmeza que la catepsina D. La proteasa B induce cambios positivos en la firmeza, como la acumulación de complejos de actina.

Tabla N° 4. Parámetros de dureza (g ±DS) y cohesividad en muestras del músculo de machos y hembras de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*).

Muestras	Dureza(g)	Cohesividad
Machos	6,57±0,72	2019,47±5,77
Hembras	0,07±0,01	22364,92±15,11

Resultados de tres replicas ± DS.

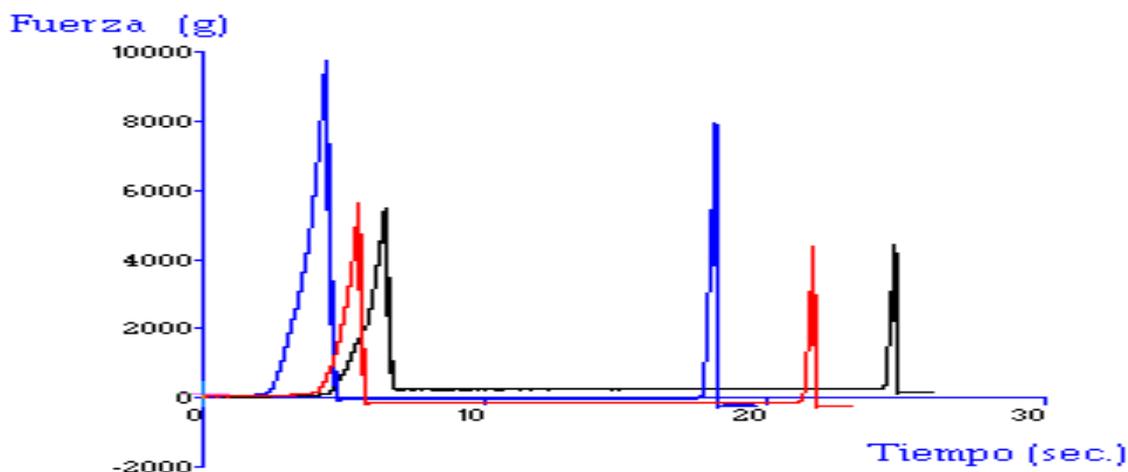


Figura N° 19. Fuerza (g) del músculo de machos de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*).

La mayor parte de los trabajos han sido realizados principalmente en peces marinos para estudiar la causa del ablandamiento *post mortem* de su carne, pero pocas investigaciones ha sido realizadas en especies de agua dulce, siendo algunos en carpa (*Cyprinus carpio*) y trucha (*Oncorhynchus mykiss*, *Salmo irideus*; Ma y Yamanaka, 1991; Ando y col, (1999). citado por Suarez Mahecha y De Francisco, 2007). Algunos autores hacen referencia a la pérdida de textura ocasionada por la acción de proteasas sobre proteínas miofibrilares, en especial catepsinas, calpaínas y enzimas hidrolíticas como elastasas y colagenasas.

En estudios anteriores se encontró que la abundancia de la creatina quinasa relacionado con la firmeza, puede ser hidrolizado por catepsinas B y L y esta creatina puede verse afectada por la proteólisis post-mortem. Un factor clave en los cambios de textura parece asociarse al equilibrio entre las actividades de catepsinas B, y D. En otras palabras se puede inferir que cuando la catepsina B es predominante entre las actividades enzimáticas de las proteasas la firmeza

sería mejor conservada, mientras que cuando predomina la catepsina D podría ser perjudicial para la firmeza.

La firmeza del músculo es también un índice de frescura de la carne, de forma que el ablandamiento resulta en una disminución de la calidad. Es entonces importante entender los mecanismos que provocan este fenómeno para proponer y desarrollar métodos que, usados en la piscicultura, sean capaces de prevenir este proceso de pérdida de textura con la consecuente pérdida de la calidad en la carne. En este sentido, algunos trabajos hacen referencia a este fenómeno y vienen siendo realizados en especies cultivadas Atea y col, (1989); Tachibana y col., (1993); Ando y col, (1999).

Cheng (1979) observó que la degradación de la miosina se relaciona con la fuerza de la textura de los geles de pescado cocido y las enzimas las cuales eran sospechosas de ser responsable de la degradación de la miosina durante el procesamiento térmico, sin embargo, se estableció una correlación entre la actividad proteolítica, la degradación de la miosina y la firmeza de textura en geles preparados a partir de tejido de pescado picado.

VI. CONCLUSIONES

- ❖ La degradación de las proteínas de músculo de pescado es causados por la acción de proteasas. Gran parte de ellas y su función en los procesos post-mortem se ha dirigido hacia catepsinas B, L y D.
- ❖ En el ciclo reproductivo de la hembras de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*), en la etapa II y VI se observo un incremento de la actividad de la catepsina B, afectando de esta forma el tejido muscular de dicha especie.
- ❖ Para el caso del músculo de machos de bagre sierra se observo un aumento progresivo de actividad enzimática en la fase post-desove (VI), el mayor desempeño de esta acción se obtuvo para la catepsina L.
- ❖ El pH afecta el tejido muscular del bagre sierra durante las diferentes fases del ciclo reproductivo, causando incremento de la actividad enzimática a medida que dicho parámetro físico se incrementa una vez ocurrido el proceso post-mortem.
- ❖ La actividad de las enzimas proteolíticas en el musculo para ambos sexos aumentan en la etapas de post-desove y recrudescencia , cuyas acciones son las más altas.

VII. RECOMENDACIONES

- ❖ Realizar estudios en muestras frescas de bagre sierra para observar, el comportamiento de la actividad de las enzimas proteasas en los tejidos musculares del bagre al igual que otras especies dulceacuícola.
- ❖ Estudiar el efecto de la congelación sobre la actividad enzimática en especies dulceacuícola.
- ❖ Estudiar la textura en los diferentes estadios gonadales y su relación con las catepsinas.

VIII. BIBLIOGRAFIA

A.O.A.C. Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemists. 13th Ed. Mowists, W. (Ed)., Washington D.C. 1980.Pag. 69-71.

Adlerstein, S.A., Durn, M. W. 1998. The effect of kudoa paniformis infection on the reproductive effort of females pacific hake Canadian. *Journal of Zoology*. **76**: 2285-2289.

An, H., Sey Mour, T. A., Wu, J. W., Morrissey, M. T. 1994. Assay systems and characterization of pacific whiting (*Merluccius productus*) protease. *J. Food sci.* **59**: 277-281.

Ando, S., Hatano, M. 1.986 a. Biochemical characteristics of chum salmon muscle during spawning migration. *Bull. Japan. Suc. Sci. Fish.* **52(7)**: 1229-1235.

Ando, S., Hatano, M. 1.986 b. Myofibrillar protein degradation in spawning-migrating chum salmon, as evaluated by extractive Nt-methyl histidina level. *Bull. Japan. Coc. Sci. Fish.* **52(7)**: 1237-1241.

Aguilar, N.1982. Estudio sobre el salado de pescado en la zona del río Orinoco. Trabajo Especial de Grado. Facultad de Ciencias Universidad. Central de Venezuela. Caracas, Venezuela

Arveláiz, P. V., Bello, R. 2005. Cambios en las propiedades químicas y bioquímicas del músculo de coporo (*Prochilodus mariae*) asociados al ciclo reproductivo. *Revista Científica: Zulia*. **15(4)**: 798.

Aoki, T., Ueno, R. 1997. Involvement of cathepsins B and L in the postmortem autolysis of mackerel muscle. *Food Research International*. **30**, 585 – 591.

Bartoli, M., Isabelle R. 2005. Calpains in muscle casting. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. **37**, 2115 – 2133.

Barrero M, Castillo., Kodaira M. 2007 . Influence of washing and frozen storage on the myofibrillar protein fraction in sardine mince flesh. *Rev científica Facultad de Ciencias Veterinarias División de Investigación . Universidad del Zulia. Venezuela.* 405- 411.

Barrett, A.L., Kirschke, H. 1981. Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L. Lorand, L. editor, 1981. *Methods in enzymology*, vol 80. Academic Press, New York. Pages 535-559.

Baptista, J. 2004. Desarrollo tecnologico del lebranche (*Mugil spp.*) ahumado en caliente. Instituto de ciencias y tecnología de alimentos. Facultad de ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. PP 93.

Bertullo, M. 1989. Desarrollo del ensilado en America latina. En 11 consulta de expertos sobre tecnología de productos pesqueros en America Latina. Montevideo. FAO. ORLAR/2.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.

Brown, W. 1986. Fish muscle on food. En: Beachtel PJ. Editor. Muscle as food Orlando, FLA: Acedemia press. Pag: 405-451.

Carnevali, O., Centonze, F., Brooks, S., Marota, I., Sumpter, J.P. 1999. Molecular characterization of muscle atrophy and proteolysis associated with spawning in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol. D*. 61: 785-791.

Cheng, C. S., Hamann, D. D., Webb, N. B. 1979. Effect of thermal processing on minced fish gel texture. *Journal of Food Science*. 44, 1080-1083

Chéret, R., Delbarre-Ladrat, C., De Lamballerie-Anton, A., Verrez-Bagnis, V. 2007. Calpain and cathepsin activities in post mortem fish and meat muscles. *Food Chemistry*. 101, 1474–1479.

Crupkin, M., Barassi, C A., Arguello, J. M. And Trucco, R. E. 1982. Effect of post-rigor fish storage on ice on physicochemical properties of actomyosin. *Journal of Science and Food Agriculture*. 33: 1129-1134.

Dyer, W. J., Dingle, J. 1961. Fish proteins with special reference to freezing in: Borgstrom. Pag. 275-327. Edicion sexta New York, U.S.A: Academic Press.

FAO. 1998. Organización de las naciones unidas para la agricultura y alimentación.

Fernandez, Y. 1968. *Oxydoras sifontesi*. *Acta Biologica., Venezolana* (58): 245-262.

Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W., Cong, J. 2003. The calpain system. *Physiological Reviews*. 83: 731–801.

Gonzalez, J. A. 1980. Reproduccion y crecimiento del “Caribe colorado” *serrasalmus notatus* Lutken, en los llanos Venezolanos. Trabajo especial de grado de Biología. Facultad de Ciencias. UCV. Caracas, Venezuela.

González, D. 2001. Evaluación física, química y organoléptica de la sardina (*Sardinella aurita*) tipo round durante su almacenamiento congelado. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Hatea, K. Takayama, M.; Matsumoto, H. 1986. Contribution of the connective tissues on the texture difference of various fish species. *Nippon Suisan Gakkaishi*. **52**: 2001-2007.

Hatano, M.; Takahashi, K.; Mathisen, O.; Amma, G. 1996. Biochemical differences in sockeye salmon that are ocean feeding and on the spawning grounds. *Journal of Food Biochemistry*. **19**(4): 269-284.

Hiramatsu, H., Ichnikawa, N., Fukade, H., Fujita, T., Sullivan, C. V., Hara, A. 2002b. Identification and characterization of proteases involved in specific proteolysis of vitellogenin and yolk proteins in salmonids. *Journal of experimental Zoology*. **292**: 11-25.

Hultmann, L., & Rustad, T. 2002. Textural changes during iced storage of salmon (*Salmo salar*) and cod (*Gadus morhua*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*. (7): 125-137.

Huss, H., H. 1988. El Pescado Fresco su Calidad y Cambios de Calidad. Manual de entrenamiento preparado por FAO/DANIDA Programa de entrenamiento en Tecnología Pesquera y Control de Calidad. Dinamarca FI:GCP / INT/ 292/ DEN. Roma. P.P 202.

Instituto nacional de nutrición (INN). Tabla de composición de alimentos para uso teórico-práctico. Serie de cuadernos azules. Publicación N° 52. Caracas. PP 97.

Jarenback L., Liljemark, A. 1975. Ultrastructural changes during frozen storage of cod (*Gadus morhua*) 1. structure of myofibrils as revealed by freeze etching preparation. *Journal of Food Technology*. **10**: 229-236.

Jiang, S. T., Lee, J. J., Chen, H. C 1996. Proteolysis of actomyosin by cathepsins B, L, L-like and X from marckel (*Scomber Australasicus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **44**:769.

Kagedal, K., Johansson, U., Olliger, K. 2001. The lysosomal protease cathepsin D mediates apoptosis induced by oxidative stress. *Faseb Journal*. **15**(9): 1592-1594.

Kaplan, O., N., Colowick, P., S. 1987. Methods in Enzymology. Pag.287-364.

Kestemont, P., Cooremans, F., Abi-Ayad, A., Melard, C. 1999. Cathepsin L in eggs and larvae of *pecahperce fluviatilis*: variations with developmental stage and spawning period. *Fish physiol. Biochem.* **21**: 59-64.

Kird, R. S. 2004. Composicion y analisis de alimentos de pearson. Pag. 563. Segunda Edicion en español. Compañía editorial Continental. Mexico.

Konagaya, S. 1983. Enhanced protease activity in the muscle of chum salmon during spawning migration with reference to softening or lysing phenomenon of the meat. *Bulletin of the Tokai Regional Fisheries Research Laboratory.* **109**: 41-52.

Kwon, J. Y., Prat, F., Randall, C., Tyler, C. R. 2001. Molecular characterization of putative yolk processing enzymes and their expression during oogenesis and embryogenesis in rainbow trout. *Biology of reproduction.* **65**: 1701-1709.

Ladrat, C., V., Verrez-Bagnis, J. N., Fleurence, J. 2000. Neutral calcium-activated proteases from European sea bass (*Dicentrarchus Labrax L.*) muscle: polymorphism and biochemistry studies. *Comparative Biochemistry and physiology.* **125**: 83-95.

Ladrat, C., V., Verrez-Bagnis, J. N., Fleurence, J. 2003. In vitro proteolysis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins of white muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*): effects of cathepsins B, D and L. *Food Chemistry.* **81**: 517-525.

Lewis, W. M- JR., Hamilton, S. K., Lasi, M. A., Rodriguez, M., Saunders III, J. F., 2000. Ecological determinism in the Orinoco floodplain. *Bioscience.* **50**: 681-692.

Love, R.M. 1970. The Chemical Biology of Fishes. Academic Press. London. Vol. 170. no. 3956, pp. 431 - 432.

Love, R.M. 1975. Variability of Atlantic cod (*Gadus morhua*) from the Northeast Atlantic: a review of seasonal and environmental influences on various attributes of fish. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada.* **32**: 2333-2342.

Lovell, R. T. 1991. Foods from aquacultures. *Food technol.* **9**: 87.

Lund, K. E., Nielsen, H. H. 2001. Proteolysis in salmon (*salmo salar*) during cold storage; Effects of storage time and smoking process. *Journal of Food Biochemistry.* **25(5)**: 379-395.

Machado-Allison, A. 1994. Factors affecting fish communities in the flooded plains of Venezuela. *Acta Biol. Venez.* **15**: 59-75.

Makinodan, Y., T. N., M. Hujita 1991. Participation of muscle cathepsin D in rising of funazushi (fermented seafood made of Crucian carp). *Nippon Suisan Gakkaishi*. **57**: 1911-1916.

Makinodan, Y., T. N., M. Hujita 1993. Effect of cathepsins on textural changes during ripening of ika-shiokara (salted squid preserves). *Nippon Suisan Gakkaishi*. **59**: 1625-29.

Marcano, D., Castillo, E., Rodriguez, C., Poleo, G., Gabo, N., Guerrero, H. 2007. Seasonal reproductive biology of two species of freshwater catfish from the venezuelan floods-plains. *Gen comp. Endocrinol.* **153**: 371-377.

Martinez de Velasco, G., Rodero, M., Zapatero, L., Cuellar, C. 2002. Humoral immune response induced by kudoasp. (*Myxosporea multivalvulida*) antigens in BALB/C mice. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. **97**: 1091-1095.

Massa, E., A. 2006. Cambios bioquímicos *post mortem* en músculos de diferentes especies pesqueras. Determinación de la vida útil de las mismas en frío. Trabajo de Doctorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Mar de Plata. Argentina.

Montecchia, C.; Roura, S.; Roldán, H.; Pérez-Borla, O.; Crupkin, M. 1997. Biochemical and physicochemical properties of actomyosin from frozen pre- and post-spawned hake. *Journal of Food Science*. **62**(3): 491-495.

Moreno, Y., Jose, A. 1985. Enzimas. Editorial Espasande, S. R. L. Caracas, Venezuela.

Nikolsky, G. 1963. The ecology of fishes. Academic press London. Pp. 352.

Ogata, H.; Aranishi, F.; Hara, K.; Osatomi, K. 1998. Proteolytic degradation of myofibrillar components by carp cathepsin L. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **76**: 499-504.

Otake, T. 1991. Serum composition and nephron structure of freshwater elasmobranchs collected from Australia and Papua New Guinea. *University Museum, University of Tokyo*. **3**: 55 -62.

Patiño, R., Sullivan, C. V. 2002. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. *Fish physiol. Biochem.* **26**: 57-70.

Pérez-Borla O., Roura S.I., Montecchia C.L., Roldan H., Crupkin M. 2002. Proteolytic Activity of Muscle in Pre- and Post- Spawning Hake (*Merluccius hubbsi* Marini). *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **35**(4): 325-330.

Provenzano, F. 1980. Biología de *pimelodus blochii valenciennes* en los llanos de Venezuela. I. Reproduccion. Tesis de licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Reddi, P.K., M.M. Constantanides, and H.A. Dymaza 1972. Catheptic activity of fish muscle. *Journal of Food Science.* **37**: 643-48.

Roura, S.; Goldemberg, A.; Trucco, R.; Crupkin, M. 1990. Biochemical and physicochemical properties of actomyosin from pre and post-spawned hake (*M. hubbsi*) stored on ice. *Journal of Food Science.* **55**(3): 688-692.

Roura, S. I. And Crupkin, M. 1995. Biochemical and functional properties of myofibrils from pre- and post- spawned hake (*Merluccius hubbsi*) stored on ice. *Journal of Food Science.* **60**: 269-272.

Salem, M., Kenney, P. B., Rexroad, C. E., Yao, J. 2006. Molecular characterization of muscle atrophy and proteolysis associated with spawning in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.* **1**: 227-237.

Sato, K., C. Ohashi, K. Ohtsuki., M. Kawabata 1992. Type V collagen in trout (*Salmo gairdneri*) muscle and its solubility change during chilled storage of muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **39**: 1222-1225.

Shimizu, Y., Nandanie. W. 1990. Effects of maturation and spawning on the gel-forming ability of lizard fish (*Saurida elongata*) muscle tissues. *Journal Science Agriculture.* **52**: 331-338.

Suárez, M., A., De Francisco, A., Beirão, H., L., Pardo, C., S., Cortés, R., M. 2007. Perdida de textura post mortem de la carne de pescado durante el almacenamiento en frío. *Acta Biológica Colombiana.* **12**(1): 3-18.

Takahashi, T., Tang, J. 1981. Cathepsin D from porcine and bovine spleen. in Lorand, L. editor. *Methods in enzymology*, vol 80. Academic Press, New York. Pag: 565-581.

Tarr, H. L. A. 1966. Post mortem changes in glycogen, nucleotides, sugar phosphates and sugar in fish muscles. A review. *J. Food. Sci.* **31**: 846-854.

Touhata, K.; Tanaka, M.; Toyohara, H. ; Tanaka, H.; Sakaguchi, M. 2.000. Seasonal change incollagen content of red seabream muscle. *Fisheries. Sci.* **66**: 553-557.

Toyohara, H., Ito, K., Ando, M., Kinoshita, M., Shimizu, Y., Sakaguchi, M. 1991. Effect of maturation on activities of various proteases and protease inhibitors in the muscle of ayu (*Plecoclossus altivelis*). *Comp. Biochem. Physiol. B.* **99**: 419-424.

Villa Alanis., Noriega-Rodríguez, J.A., Ortega-García, J., Medina-Juárez, L.A., Gámez-Meza, N., Angulo-Guerrero, O., García-Galindo, H.S. 2005. Actividad lipolítica de las vísceras de sardina (*Sardinops sagax caeruleus*). Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad de Sonora. Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz.

Wang, A., Jorgen Stenvik, R., Larsen, H., M., Ragnar L. O. 2007. Cathepsin D from Atlantic cod (*Gadus morhua L.*) Liver. Isolation and comparative studies. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B* **147**: 504-511.

Yamashita, M., Konagaya S. 1990. Participation of cathepsin L into extensive softening of the muscle of chum salmon caught during spawning migration. *Nippon Suisan Gakkaishi.* **56**:1271-77.

Zamora, F., Debiton, E., Lepetit, J., Lebert, A., Dransfield, E., Ovali, A. 1996. Predicting variability of ageing and toughness in beef m. Longissimus lumborum et. Thoracis. *Mect science.* **43**: 321-333.

Apéndice 1. Concentración ($\mu\text{g/g} \pm \text{DS}$) de las catepsinas B, D, ($\mu\text{g/g} \pm \text{DS}$) en muestras preservadas en congelación y de referencias de hembras, Actividad enzimáticas ($\text{mg/g} \cdot \text{t} \pm \text{DS}$) de las proteasas B, D y L del Músculo de Bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*).

Tabla N° 5. Concentraciones de catepsina B y D ($\mu\text{g/g} \pm \text{DS}$) en músculo de hembras de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*) durante las diferentes fases de su ciclo reproductivo.

Ciclo reproductivo	Catepsina D ($\mu\text{g/g}$)	Catepsina B ($\mu\text{g/g}$)
Fase II	94,2911 \pm 0,9015 ^{aa}	18,1242 \pm 1,0118 ^{ab}
Fase IV	69,0626 \pm 0,6392 ^{ba}	42,6674 \pm 4,3548 ^{bb}
Fase VI	45,4872 \pm 1,2494 ^{ca}	37,9876 \pm 0,2481 ^{cb}

Resultados de tres replicas \pm DS. Superíndices iguales entre columnas indican que no existen diferencias significativas. Primera letra indican diferencias significativas entre fases del ciclo reproductivo, la segunda letra indica diferencias significativas entre concentración de enzimas p (<0,05).

Tabla N° 6. Concentraciones de catepsina B y D ($\mu\text{g/g} \pm \text{DS}$) en músculo de machos de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*) durante las diferentes fases del ciclo reproductivo.

Ciclo Reproductivo	Catepsina D ($\mu\text{g/g}$)	Catepsina B ($\mu\text{g/g}$)
Fase II	75,7966 \pm 1,2535 ^{aa}	12,1996 \pm 1,8813 ^{ab}
Fase IV	70,0085 \pm 1,1668 ^{ba}	6,34579 \pm 0,3829 ^{bb}
Fase VI	70,6744 \pm 1,5718 ^{ba}	13,5225 \pm 1,0932 ^{ab}

Resultados de tres replicas \pm DS. Superíndices iguales entre columnas indican que no existen diferencias significativas. Primera letra indican diferencias significativas entre fases del ciclo reproductivo, la segunda letra indica diferencias significativas entre concentraciones de enzimas p (<0,05).

Tabla N° 7. Concentración de las enzimas proteasas ($\mu\text{g/g} \pm \text{DS}$) en músculo entre hembras de referencias y muestra congeladas de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*).

Muestra	Catepsina D	Catepsina B
Fase IV Control	48,6092 \pm 0,4477 ^{aa}	12,4363 \pm 2,0533 ^{ab}
Fase IV (Muestra)	69,0626 \pm 0,6392 ^{ba}	42,6674 \pm 4,3548 ^{bb}

Resultados de tres replicas \pm DS. Superíndices iguales entre columnas indican que no existen diferencias significativas. Primera letra indican diferencias significativas entre muestras en fase IV de maduración gonadal, la segunda letra indica diferencias significativas entre las concentraciones de las enzimas p (<0,05).

Tabla N° 8. Actividad enzimática de las catepsina B, D y L (mg/g*t± DS) en músculo de hembras de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*) durante las diferentes fases del ciclo reproductivo.

Ciclo Reproductivo	Catepsina D	Catepsina B	Catepsina L
Fase II	0,0001±0,0012^{aa}	0,0064±0,0003^{ab}	0,0008±0,0001^{ac}
Fase IV	0,0003±0,0002^{aa}	0,0029±0,0002^{ba}	0,0000±0,0000^{ba}
Fase VI	0,0217±0,0005^{ba}	0,0861±0,0007^{ca}	0,0153±0,0005^{cb}

Resultados de tres replicas ± DS. Superíndices iguales entre columnas indican que no existen diferencias significativas. Primera letra indican diferencias significativas entre fases del ciclo reproductivo, la segunda letra indica diferencias significativas entre las actividades enzimáticas p (<0,05).

Tabla N° 9. Actividad enzimática de las catepsina B, D y L (mg/g*t± DS) en músculo de machos de bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*) durante las diferentes fases del ciclo reproductivo.

Ciclo Reproductivo	Catepsina D	Catepsina B	Catepsina L
Fase II	0,0002±0,0001^{aa}	0,0411±0,0048^{ab}	0,01968±0,0002^{ac}
Fase IV	0,0003±0,0001^{ba}	0,0011±0,0002^{ba}	0,0013±0,0000^{ba}
Fase VI	0,0218±0,0014^{ca}	0,0664±0,0042^{cb}	0,0125±0,0004^{cc}

Resultados de tres replicas ± DS. Superíndices iguales entre columnas indican que no existen diferencias significativas. Primera letra indican diferencias significativas entre fases del ciclo reproductivo, la segunda letra indica diferencias significativas entre las actividades enzimáticas p (<0,05).

Tabla N° 10. Actividad enzimática de las catepsina B, D y L (mg/g± DS) en músculo de hembras de referencias y muestras congeladas de bagre sierra (*oxydoras sifontesi*).

Muestras	Catepsina D	Catepsina B	Catepsina L
Fase IV Control	0,0139±0,0001^{aa}	0,1425±0,0072^{ab}	0,0029±0,0001^{ac}
Fase IV (Muestra)	0,0003±0,0002^{aa}	0,0029±0,0002^{ba}	0,0000±0,0000^{ba}

Resultados de tres replicas ± DS. Superíndices iguales entre columnas indican que no existen diferencias significativas. Primera letra indican diferencias significativas entre muestras en fase IV de desarrollo gonadal, la segunda letra indica diferencias significativas entre las actividades enzimáticas p (<0,05).

