

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE BIOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR



**ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL  
DEL COMPONENTE MIOFIBRILAR DE  
LA FIBRA ESQUELÉTICA DURANTE SU  
ALMACENAMIENTO EN CONGELACIÓN EN  
LAS ESPECIES *Gadus morhua*, L., *Merluccius  
merluccius*, L.**



\* 5 3 0 9 8 4 1 2 1 5 \*  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TESIS DOCTORAL

MARÍA LUISA GARCÍA GIL  
FEBRERO 1998.



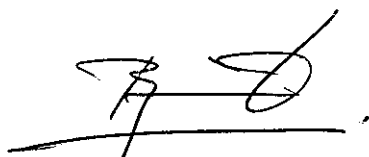
ARCHIVO

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS.  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR.

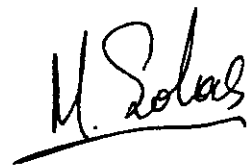
**ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DEL COMPONENTE  
MIOFIBRILAR DE LA FIBRA ESQUELÉTICA DURANTE SU  
ALMACENAMIENTO EN CONGELACIÓN EN LAS ESPECIES  
*Gadus morhua*, L., *Merluccius merluccius*, L.**

Tesis doctoral que presenta Maria Luisa García Gil para optar al grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas.

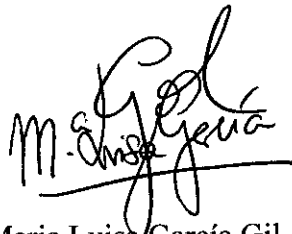
Vº Bº de los directores



Dr. Benjamín Fernández Ruiz  
Departamento de Biología Celular  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Complutense de Madrid



Dra. María Teresa Solas Alados  
Departamento de Biología Celular  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Complutense de Madrid



Maria Luisa García Gil

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1. ESTRUCTURA DE LAS FIBRAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS</b> .....	2
1.1. ORGANIZACIÓN DE LOS FILAMENTOS EN LAS MIOFIBRILLAS .....	2
1.2. LOCALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS EN LOS MIOFILAMENTOS .....	5
1.3. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA MIOSINA.....	8
1.4. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA ACTINA.....	12
1.5. OTRAS PROTEÍNAS ORGANIZADORAS DEL SARCÓMERO.....	13
<b>2. CAMBIOS EN LAS PROTEÍNAS POR CONGELACIÓN Y ALMACENAMIENTO DEL MÚSCULO DE PESCADO</b> .....	15
2.1. EFECTO DE LOS CAMBIOS POSTMORTEM SOBRE LA TEXTURA DEL MÚSCULO.....	15
2.2. FACTORES QUE INFLUYEN EL DETERIORO DEL MÚSCULO DURANTE SU ALMACENAMIENTO EN CONGELACIÓN.....	19
Modo de congelación.	
Temperatura y tiempo de almacenamiento.	
2.3. DESNATURALIZACIÓN-AGREGACIÓN DE LAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES DURANTE SU ALMACENAMIENTO EN CONGELACIÓN.....	21
Estudios bioquímicos sobre actomiosina.	
Estudios bioquímicos sobre miosina y subunidades de miosina.	
Estudios bioquímicos sobre actina.	
Estudios bioquímicos sobre tropomiosina y troponina.	
Estudios por microscopía electrónica de transmisión	
2.4. NATURALEZA QUÍMICA DE LA AGREGACIÓN.....	27
<b>3. ALTERACIONES EN LA ULTRAESTRUCTURA DEL MÚSCULO DE PESCADO ASOCIADAS A LA CONGELACIÓN</b> .....	28
<b>4. FACTORES QUE CAUSAN LA DESNATURALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DURANTE LA CONGELACIÓN</b> .....	32
4.1. DESHIDRATACIÓN.....	32
4.2. FACTORES RELACIONADOS CON LÍPIDOS.....	32

4.3. ÓXIDO DE TRIMETIL AMINA Y SUS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN.....	33
4.4. EFECTO DEL FORMALDEHÍDO.....	33
4.5. MECANISMO DE ACCIÓN DEL FORMALDEHÍDO.....	34
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
<b>MATERIAL.....</b>	<b>43</b>
<b>MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
<b>1. ESTUDIO DE EXTRACTOS PROTÉICOS Y FRACCIONES</b>	
<b>INSOLUBLES.....</b>	<b>44</b>
1.1. EXTRACCIÓN DE ACTOMIOSINA.....	44
1.2. ELECTROFORESIS SDS-PAGE.....	45
1.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN DE LOS EXTRACTOS	
SOLUBLES.....	45
1.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE LAS FRACCIONES INSOLUBLES.....	46
Microscopía electrónica de barrido.	
Microscopía electrónica de transmisión.	
<b>2. ESTUDIO MORFOLÓGICO Y MORFOMÉTRICO.....</b>	<b>48</b>
2.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.....	48
2.2. ESTUDIO MORFOMÉTRICO.....	48
<b>3. INMUNOHISTOQUÍMICA.....</b>	<b>49</b>
3.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	49
3.2. PROCEDIMIENTO INMUNOHISTOQUÍMICO.....	50
3.3. ANÁLISIS CUANTITATIVO.....	50
<b>4. MÉTODO AUTORADIOGRÁFICO.....</b>	<b>51</b>
4.1. ADMINISTRACIÓN DEL COMPUESTO RADIACTIVO.....	51
4.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS.....	52
4.3. AUTORADIOGRAFÍA A MICROSCOPIA ÓPTICA.....	52
4.4. AUTORADIOGRAFÍA A MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	53

<b>5. OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA.....</b>	<b>53</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>
<b>1. ESTUDIO DE EXTRACTOS SOLUBLES Y FRACCIONES INSOLUBLES DE BACALAO (<i>Gadus morhua</i>).....</b>	<b>55</b>
1.1. Músculo picado almacenado a -20°C.....	56
1.2. Músculo almacenado a -20°C.....	61
1.3. Músculo almacenado a -30°C.....	63
<b>2. ESTUDIO DE EXTRACTOS SOLUBLES Y FRACCIONES INSOLUBLES DE MERLUZA (<i>Merluccius merluccius</i>).....</b>	<b>73</b>
2.1. Músculo almacenado a -20°C.....	73
2.2. Músculo almacenado a -30°C.....	75
<b>3. ESTUDIO MORFOLÓGICO.....</b>	<b>83</b>
3.1. Estudio morfológico en fibras musculares de bacalao ( <i>Gadus morhua</i> ) a -20°C.....	83
3.2. Estudio morfológico en fibras musculares de bacalao ( <i>Gadus morhua</i> ) a -30°C.....	84
3.3 Estudio morfológico en fibras musculares de merluza ( <i>Merluccius merluccius</i> ) a -20°C.....	85
<b>4. ESTUDIO MORFOMÉTRICO.....</b>	<b>90</b>
4.1. Estudio morfométrico en fibras musculares de bacalao ( <i>Gadus morhua</i> ) a -20°C y -30°C.....	92
4.2. Estudio morfométrico en fibras musculares de merluza ( <i>Merluccius merluccius</i> ) a -20°C.....	93
<b>5. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.....</b>	<b>96</b>

<b>6. ESTUDIO AUTORADIOGRÁFICO SOBRE EL EFECTO DEL FORMALDEHÍDO EN MÚSCULO IN SITU.....</b>	<b>99</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>105</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>147</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>151</b>

# ABREVIATURAS

**AMN:** Actomiosina.

**DMA:** Dimetilamina.

**DOI:** Densidad óptica integrada.

**FA:** Formaldehído.

**HMM:** Meromiosina pesada

**LMM:** Meromiosina ligera.

**ME:**  $\beta$  mercaptoetanol.

**MEB:** Microscopía electrónica de barrido.

**MET:** Microscopía electrónica de transmisión.

**SDS:** Dodecil sulfato sódico.

**SDS-PAGE:** Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.

**TMAO:** Óxido de trimetil amina.

**TMAO asa:** Óxido de trimetil amina demetilasa.

**P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>:** Fracciones insolubles en C1Na, SDS, SDS-ME respectivamente.

**S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>:** Fracciones solubles en C1Na, SDS, SDS-ME respectivamente.

## **INTRODUCCIÓN.**

---

Desde los tiempos más remotos, los seres humanos se han abastecido de tejidos de origen animal para su alimentación o para su industria. Es conocido que la importancia del músculo reside en su elevado valor nutritivo, determinado en gran parte por su elevado contenido en proteína que representa un 18-23% de éste y a la alta calidad de la misma que contiene todos los aminoácidos y en proporciones muy similares a las requeridas para el mantenimiento y desarrollo de los tejidos humanos. Teniendo en cuenta esta propiedad las investigaciones han sido altamente selectivas de modo que los científicos han enfocado sus estudios sobre aquellas propiedades del tejido muscular que influyen sobre su valor alimentario. Así en animales terrestres las propiedades texturales dependen en gran medida del estado bioquímico de los músculos postmortem, por lo que muchos de los estudios se han enfocado en comprender las causas de la contracción postmortem. Por el contrario las propiedades texturales del pescado fresco son un problema de menor importancia que en los animales de sangre caliente, por lo que en este sentido se dispone de menor información sobre la relación entre la bioquímica del pescado y su textura.



En el caso de considerar los tejidos de los animales congelados el comportamiento es el opuesto. Los músculos de animales terrestres son más estables durante el almacenamiento en congelación, sin embargo en el pescado tiene lugar un deterioro significativo del mismo, por lo que desde hace 7 décadas se han llevado a cabo estudios enfocados en comprender y prevenir la pérdida de calidad del pescado que se manifiesta fundamentalmente en cambios de textura así como una pérdida de las propiedades funcionales como capacidad de emulsión, propiedad de unión a lípidos, capacidad de hidratación o retención de agua y capacidad de formar geles. Estas alteraciones han sido ampliamente atribuidas a cambios experimentados por las proteínas miofibrilares. Numerosos estudios bioquímicos han sido enfocados en clarificar el mecanismo y los factores responsables de la desnaturalización de las proteínas durante la congelación. Al mismo tiempo que se incrementaba el conocimiento de la anatomía microscópica de las fibras musculares aumentaba el interés en correlacionar las alteraciones en textura del músculo y los avances bioquímicos con estudios basados en cambios en la ultraestructura del mismo durante su almacenamiento en congelación, aspectos éstos que serán desglosados detalladamente en los próximos apartados.

## **1. ESTRUCTURA DE LAS FIBRAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS.**

### **1.1. ORGANIZACIÓN DE LOS FILAMENTOS EN LAS MIOFIBRILLAS.**

La estructura del músculo fue determinada como resultado de una combinación entre estudios por microscopía óptica, electrónica y difracción de rayos X.

La microscopía óptica y electrónica permitieron obtener una primera aproximación acerca del aspecto morfológico de las miofibrillas. Estos elementos contráctiles de 1-2  $\mu\text{m}$  de diámetro mostraban un sistema regular de bandas transversales atribuidas a la existencia de elementos repetitivos denominados sarcómeros de 2.3-2.8  $\mu\text{m}$  de longitud. Estas unidades básicas aparecían delimitadas por la línea Z y contenían una zona más densa (banda A) simétrica con respecto a la línea Z y separada de ésta por zonas de menor densidad (bandas I). El aspecto bandeado

anteriormente descrito fue atribuido al hecho de que las miofibrillas están constituidas por una serie de largas proteínas filamentosas parcialmente superpuestas.

Los estudios por microscopía electrónica supusieron una aportación acerca de la disposición de los filamentos en la fibra muscular. Huxley (1957) en secciones ultrafinas observó que los filamentos delgados (50-70 Å de diámetro) eran visibles en la parte del sarcómero correspondiente a las bandas I mientras ambos, filamentos finos y gruesos (100-120 Å de diámetro) se visualizaban en la banda A. Cuando se obtenían secciones en las que los filamentos son paralelos al plano de la sección, se observaba que cada filamento grueso es continuo desde cada extremo de la banda A al opuesto mientras que los filamentos delgados no se extienden hasta el centro de dicha banda, sino que terminan en un punto alrededor de la zona H. Los filamentos gruesos tienen una longitud de característica de 1.55  $\mu\text{m}$  y los filamentos finos de 0.975  $\mu\text{m}$  medidos desde el centro de la línea Z.

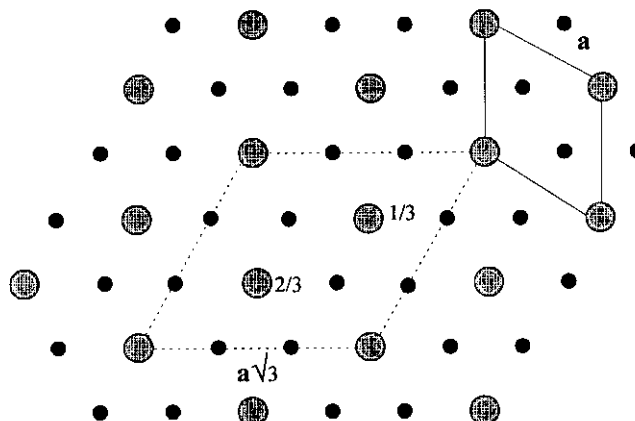
La organización de los filamentos fue mejor comprendida al examinar secciones transversales por microscopía electrónica. En fibras musculares de vertebrados, secciones transversales a nivel de la banda I muestran una organización tetragonal de los filamentos finos. Asimismo una doble disposición de los filamentos es observada a nivel de las zonas laterales más densas de la banda A donde los filamentos gruesos se encuentran organizados formando una red hexagonal y los finos se encuentran localizados en los puntos trigonales del patrón hexagonal formado por los filamentos gruesos.

Estudios por difracción de rayos X (Huxley, 1951, 1953a) confirmaron dicha organización que se reflejaba en un patrón de reflexiones que corresponde a aquel que sería esperado para una ordenación hexagonal de estructuras en forma de varilla espaciadas 400 Å. Asimismo se observó que en fibras musculares en postrigor las intensidades de las reflexiones mostraban que había una cantidad sustancial de material presente en o cerca de la posición trigonal en la red. Esto fue interpretado en términos de la presencia de un segundo grupo de filamentos situado entre la disposición hexagonal de los filamentos que forman la organización primaria (filamentos gruesos).

Otros detalles relativos a la estructura fueron observados. Los filamentos gruesos presentaban un mayor diámetro en la banda H donde se describía la existencia de puentes que conectaban dichos filamentos que en vistas longitudinales representan la banda M de 600-750 Å. (Pepe, 1967 y Knappeis y Carlsen, 1968).

Una de las características más interesantes aportadas por la microscopía electrónica fue mostrar la presencia de proyecciones que se extienden desde los filamentos gruesos a los filamentos finos a lo largo de toda su longitud excepto en las bandas I. Estas proyecciones aparecen a intervalos de aproximadamente 400 Å entre cada filamento grueso y delgado. Puesto que hay 6 filamentos delgados alrededor de cada filamento grueso deben existir 6 proyecciones emitidas por cada filamento grueso por cada intervalo de 400 Å de su longitud Huxley (1972).

Los estudios de difracción de rayos X mostraron unas reflexiones en el diagrama de fibra muscular con una periodicidad axial de 429 Å que demostraba la presencia de regularidades a lo largo de la longitud de los filamentos gruesos. Análisis detallado de tales resultados por Huxley y Brown (1967) pusieron de manifiesto la existencia de un reordenamiento helicoidal de las proyecciones sobre los miofilamentos de miosina con una vuelta de hélice cada 429 Å y una repetición de estas proyecciones cada 143 Å. Estos estudios además demostraron la presencia de una superred en relación con las proyecciones presentes en la banda A de fibra muscular estriada de vertebrados. Esto significa que los filamentos de miosina en el modelo hexagonal no se organizan con idénticas orientaciones para dar la celda unidad simple **a**, sino que se organizan dando una celda unidad (superred) con un lado igual a  $a\sqrt{3}$ , de modo que los dos filamentos dentro de cada celda unidad estén rotados  $1/3$  430 o  $2/3$  430.



**FIGURA I.** Esquema que representa la sección transversal de músculo esquelético en la banda A. Las líneas continuas muestran la celda unidad simple  $a$  mientras que las líneas discontinuas representan la superred descrita por Huxley y Brown (1967). Los números  $1/3$  y  $2/3$  representan la posición de los filamentos dentro de la superred que están rotados  $1/3$  o  $2/3$  uno con respecto a otros.

## 1.2. LOCALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS EN LOS MIOFILAMENTOS.

Las descripciones morfológicas de miofibrillas y filamentos en términos puramente estructurales fueron completadas paralelamente por estudios que pretendían establecer la localización de las moléculas de proteína en la estructura de la fibra muscular.

Los datos de Hasselbach y Schneider (1951) sugerían que la mayoría de las miofibrillas están constituidas por actina y miosina. En fibra muscular esquelética de conejo la miosina representa el 38% de las proteínas totales presentes en las fibras musculares y el 54% de las proteínas que componen las miofibrillas libres de proteínas solubles. La cantidad que representa la actina puede ser un 20-25% de las proteínas miofibrilares totales.

Preliminarmente se intentó comprobar que los miofilamentos observados por microscopía electrónica estaban compuestos por actina y miosina. Huxley (1953a) realizó un cálculo de las cantidades relativas de material en los dos tipos de filamentos.

Éstas se basan en medidas de filamentos realizadas sobre micrografías electrónicas. La proporción de material localizado en la red hexagonal constituida por los filamentos gruesos con respecto a los filamentos finos es 2.7:1. Si se considera que los filamentos gruesos están constituidos por miosina y los filamentos finos fundamentalmente por actina, estos resultados están de acuerdo con la observación de que la proporción en peso miosina/actina como propusieron Hasselbach y Scheneider (1951) es 3:1.

Información valiosa sobre la localización de estas proteínas fue obtenida por la observación de la estructura de los sarcómeros tras el tratamiento de la fibra muscular con agentes que permitían la extracción selectiva de miosina.

Hanson y Huxley (1953) y Hasselbach (1953) llevaron a cabo la extracción de miosina desde fibras musculares en soluciones salinas de alta fuerza iónica en presencia de agentes que mantienen actina y miosina disociados. La microscopía de contraste de fase demostró que en las miofibrillas a las que se había aplicado dicho tratamiento, la banda A se disolvía dejando un resto de línea Z y segmentos de material de densidad equivalente a los localizados en la banda I, que es la región del sarcómero ocupada por los filamentos finos. Las observaciones por microscopía electrónica llevadas a cabo sobre estas miofibrillas demostraban que los filamentos gruesos habían sido disueltos mientras los filamentos finos formaban parte de la estructura retenida en el sarcómero. Esto es una evidencia de que la miosina está contenida en los filamentos gruesos y que la actina que no resulta extraída forma parte de la estructura que permanecía asociada al sarcómero (filamentos finos).

Un segundo grupo de experimentos se basó en medidas realizadas por microscopía de interferencia que fueron a su vez contrastadas con estimaciones bioquímicas. La microscopía interferencial permite medir el retardo que experimenta la fase del haz de luz cuando éste pasa a través de una parte de la muestra. De tales medidas es posible calcular la concentración de proteína presente en las diferentes bandas de una miofibrilla, incluso después de llevar a cabo procesos de extracción de proteínas en dichas miofibrillas. Los experimentos de Huxley y Hanson (1957) muestran que el material de la banda A por microscopía de interferencia concentra el 50-55% de la

proteína total de la miofibrilla. Al aplicar procesos que permitían la extracción total de miosina de la miofibrilla, el análisis bioquímico de tales extractos mostró que un 62.5% de las proteínas miofibrilares resultaban extraídas, de las que un 51% podían ser precipitadas bajo condiciones usadas para precipitar miosina mientras que el 10% restante permanecía en solución, porcentaje que coincidía con los datos obtenidos por microscopía interferencial.

Perry y Corsi (1958) obtuvieron asimismo evidencia sobre la localización de las proteínas en sus experimentos basados en extracción de miofibrillas en medios de baja fuerza iónica. Estos autores disolvían el material de líneas Z y bandas I sin afectar a la banda A. El extracto contenía actina y tropomiosina por lo que estas proteínas estaban asociadas a la estructura de los filamentos en la banda I. Además se encontró que la actividad ATPasa de la preparación permanecía asociada a la banda A, lo que confirmaba la localización de la miosina en dichos filamentos resistentes a la extracción.

Más evidencia proporcionó el uso de anticuerpos. Szent-György et al. (1964) observaron que anticuerpos contra miosina se unían en la región de la banda A. El anticuerpo contra actina y tropomiosina era unido a parte del sarcómero ocupado por los filamentos de la banda I.

Posteriormente fueron obtenidas evidencias en observaciones por microscopía electrónica aplicando la técnica de tinción negativa sobre filamentos de fibras musculares obtenidos tras disrupción física del tejido en un medio que disocia actina y miosina (Huxley 1963). Esta técnica permitió obtener información detallada de la estructura interna de los filamentos. Dos tipos de filamentos se encontraron que se correspondían estrechamente con los observados en secciones de tejido muscular. Los filamentos más delgados a menudo asociados a fragmentos de línea Z mostraban dos cadenas idénticas compuestas por subunidades globulares reordenadas helicoidalmente con una vuelta cada aproximadamente 360-370 Å con un diámetro entre 60 y 70 Å y 0.5-1µm de longitud. Idéntica estructura se observaba en filamentos de actina purificados. La microscopía electrónica mostró que los filamentos gruesos de 100-120Å de diámetro y 1.5-1.6µm de longitud presentan una organización bipolar de modo que

las cabezas están localizadas en ambos extremos de los filamentos orientadas en una dirección y separadas en su parte central por una zona desnuda que se encuentra libre de cabezas. Miosina purificada bajo condiciones iónicas idóneas se agrega en filamentos sintéticos semejantes en dimensiones a los filamentos presentes en la banda A de las células musculares, mostrando asimismo las proyecciones que sin embargo están ausentes en la zona central del filamento.

### 1.3. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA MIOSINA.

Las moléculas de miosina fueron observadas en el microscopio electrónico por la técnica de réplica "shadow-casting" (Rice, 1961 a,b, 1964, Huxley, 1963). Estas tenían la apariencia de estructuras en forma de varilla de 20 Å de diámetro y 1500 Å de longitud con una región globular al final de la molécula de 50 Å de diámetro y 100-200 Å de longitud. Posteriormente esta región globular se determinó que estaba constituida por dos cabezas (Slayter y Lowey 1967, Lowey et al., 1969).

Importante información sobre la estructura de la miosina se obtuvo a partir de estudios basados en la rotura de la molécula en subfragmentos tras su tratamiento con enzimas proteolíticas (Lowey et al., 1967, 1969). La digestión trípica divide la miosina en los fragmentos conocidos como meromiosina pesada (HMM) y meromiosina ligera (LMM). HMM llevaba la actividad ATPásica y la capacidad de unirse a actina. LMM se caracterizaba por su capacidad de agregarse para formar filamentos en condiciones iónicas fisiológicas. La morfología de estos fragmentos fue determinada asimismo por microscopía electrónica. La tinción negativa demostró que LMM tenía el aspecto de estructuras en forma de varilla del mismo diámetro que el dominio en forma de varilla de la miosina intacta y una longitud aproximada de 960 Å. HMM aparecía como una estructura constituida por dos elementos globulares anclados a una corta cola de una longitud de 400-450 Å (Huxley 1963). Lowey et al.(1969) demostraron que la digestión de HMM con papaína liberaba la parte del cuello que conecta cada cabeza a la cola rindiendo los subfragmentos S<sub>1</sub> correspondientes a los fragmentos de cabeza y el subfragmento S<sub>2</sub> que se origina de la porción distal del cuello.

La estructura actualmente reconocida es que las moléculas de miosina constan de dos cadenas pesadas de 220 KDa y cuatro cadenas ligeras (15-22 KDa) con una cola de 140 nm de longitud y dos cabezas de 130 KDa cada una. El extremo carboxiterminal de las cadenas pesadas forma  $\alpha$  hélices que dimerizan para formar el dominio de cola que continua en las dos subunidades  $S_1$  constituidas por el fragmento amino terminal donde se localiza el sitio activo de la ATPasa. A cada una de las cabezas se encuentran asociadas un par de cadenas ligeras que difieren en sus estructuras y propiedades y son conocidas con una variedad de nombres entre ellos reguladoras y esenciales de secuencia semejante a calmodulina y troponina C.

Durante los últimos 40 años se ha empleado gran esfuerzo en comprender la estructura y función de la cabeza de miosina. Walker et al. (1985) llevaron a cabo tinciones negativas introduciendo modificaciones que permitían estabilizar la molécula frente a los efectos adversos introducidos por la tinción negativa. Medidas de micrografías electrónicas demostraban que las cabezas tenían forma de pera de 190 Å de longitud y 65 Å de diámetro en el punto más ancho. Una reconstrucción tridimensional de secciones delgadas a partir de cristales obtenidos de los subfragmentos  $S_1$  revelaron unos resultados semejantes a los anteriormente descritos (Winkelmann et al., 1985).

Micrografías electrónicas de Walker y Trinick (1988) mostraron que las cabezas de miosina constan de al menos tres regiones estructurales. La tinción negativa permitió observar en el 35% de las cabezas estudiadas dos hendiduras perpendiculares al eje mayor de la cabeza que determinan tres dominios. Un dominio grande de 10 nm de longitud y 7 nm de anchura que supone aproximadamente la mitad de la masa de la cabeza y dos dominios pequeños de tamaño variable localizados a lo largo del eje de la cabeza en la zona más cercana a la unión de las dos cabezas. En el 10% de las cabezas se observaba una simple hendidura que determina la aparición de dos dominios. Además las cabezas mostraban una pronunciada curvatura en el sentido de las agujas del reloj desde la unión cabeza-cola a la porción distal de las cabezas.

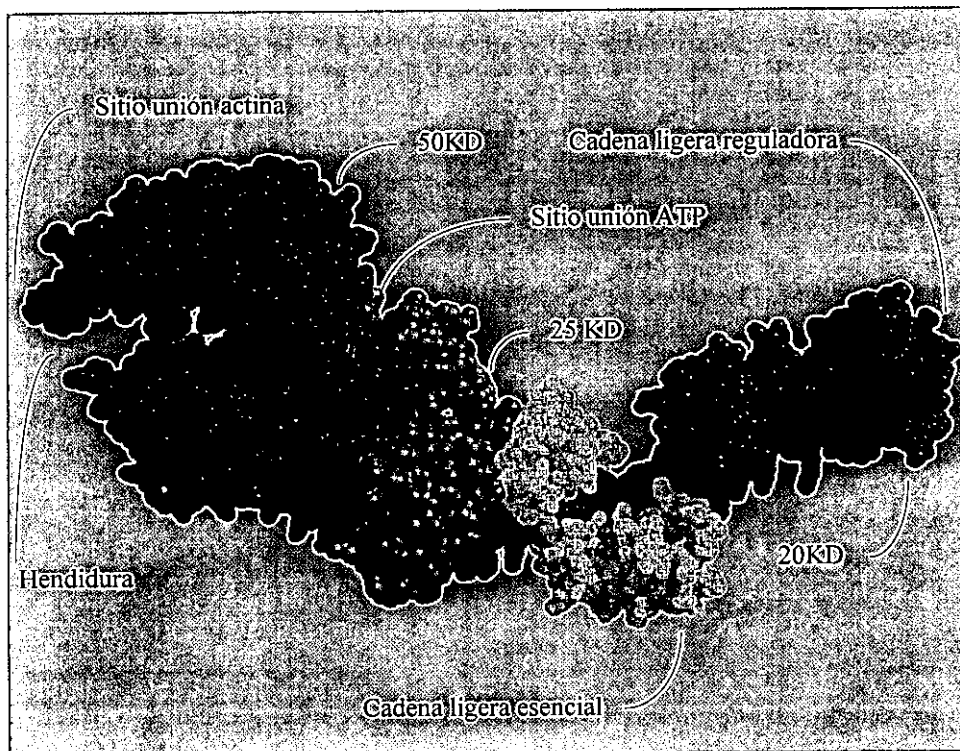
Cristalografía de Rayos X ha revelado información esencial sobre la estructura tridimensional del subfragmento  $S_1$  (Rayment et al., 1993). La cabeza de miosina es un



dominio elongado asimétrico con dimensiones de 165 x 65x 40nm dividida en dos dominios: El dominio catalítico globular que comprende los 783 primeros residuos de la cadena pesada y un dominio de cadena ligera que consiste en las dos cadenas ligeras que se encuentran localizadas en la base de la cabeza alrededor de un dominio de  $\alpha$  hélice de 85Å formado por los 60 últimos residuos de la cadena pesada. Digestión proteolítica hidroliza el subfragmento S<sub>1</sub> dentro de 3 fragmentos de 25kDa, 50 KDa, 20 kDa que se cree que constituyen dominios. Los 80 primeros residuos del extremo amino terminal forman un dominio que es homólogo al dominio SH<sub>3</sub> (src homology 3) de función desconocida. El resto del fragmento de 25 kDa y la porción superior del fragmento de 50 kDa (residuos 81-486) forman un dominio que constituye 6 de 7 cadenas de una estructura  $\beta$  plegada. El sitio de unión del ATP está en este dominio y dista 4 nm del sitio de unión de la actina. La porción superior del fragmento de 50 KDa proporciona aproximadamente la mitad del sitio de unión de la actina. El fragmento inferior de 50 KDa (residuos 487-600) forma un dominio bien definido que constituye la otra mitad del sitio de unión de la actina. La primera parte del siguiente dominio de 20 KD (residuos 648-689) es una parte del dominio de 25-50 KDa y consiste en una larga hélice que corre distalmente desde el sitio de unión de la actina a la 7<sup>a</sup> cadena que forma parte de la estructura  $\beta$  plegada. Esta es seguida por un giro de una hélice que contiene dos grupos tioles reactivos (SH<sub>1</sub> 701 y SH<sub>2</sub> 697). Distal a éste y rígidamente conectado a la  $\alpha$  hélice que constituye la cola del subfragmento 1 existe un dominio compacto (residuos 711-781) que se ha denominado dominio transformador. Este aparentemente funciona como una cuenca para el dominio  $\alpha$  hélice de cola de S<sub>1</sub> que lleva las dos cadenas ligeras y que ha sido denominado dominio regulador o cuello. La función de este último dominio parece ser la de un brazo que actúa a modo de palanca que amplifica movimientos rotacionales experimentados por el dominio transformador durante la hidrólisis del ATP.

Este modelo puso de manifiesto que la hendidura entre los dominios superior e inferior de 50 kDa se extiende desde el sitio de unión del ATP al sitio de unión de la actina de modo que la apertura y cierre de dicha hendidura puede proporcionar un eslabón que conecte ambos sitios estando probablemente implicado en la generación de

movimientos del dominio de cabeza. Se piensa que la unión de la actina favorece la forma cerrada de la hendidura. La estructura atómica del subfragmento 1 ha proporcionado la base para interpretar los estudios bioquímicos y biofísicos previos confirmando la existencia de un mecanismo de motilidad distinto del propuesto hasta el momento que se basaba en la inclinación de la cabeza de miosina sobre la superficie del filamento de actina. En la hipótesis del brazo en forma de palanca “swinging lever arm” la cabeza se une a la actina con una geometría más o menos establecida y sólo la parte distal carboxiterminal de la cabeza se mueve (Holmes 1997), de modo que el mecanismo por el que la hidrólisis del ATP y unión de actina conduce a los movimientos de dicho brazo es el siguiente: La unión actina-miosina tiene lugar por un movimiento rotacional del dominio más bajo de 50 kDa inducido por la hidrólisis del ATP, que tras dicho movimiento permite que el brazo gire sobre un punto cercano a la hélice que contiene el residuo SH<sub>1</sub>. El regreso de este estado al estado rigor constituye lo que se conoce como golpe de fuerza.



**FIGURA II.** Estructura tridimensional del subfragmento S<sub>1</sub> de la molécula de miosina según el modelo de Rayment et al., 1993.

Los dominios de cola (LMM) de la miosina muscular conocida como miosina tipo II oligomerizan en los filamentos gruesos para dar la estructura anteriormente descrita, de modo que las moléculas de miosina aparecen situadas en pares una a cada lado de un filamento grueso, y en pares sucesivos escalonados a una distancia de 143 Å y rotados uno con respecto a otro para situar las proyecciones en una hélice con una vuelta cada 429 Å.

#### 1.4. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA ACTINA.

Análisis llevados a cabo por Moore et al. (1970) basados en reconstrucciones tridimensionales de la estructura de los filamentos de actina aportó información sobre la forma de los monómeros de G-actina. Estos parecían ser elementos globulares con unas dimensiones de 55 Å x 35 Å x 50 Å. Asimismo las tinciones negativas confirmaban la morfología globular de dichos monómeros.

Análisis cristalográficos de rayos X de G-actina revelaron que dicha molécula está separada en dos lóbulos de tamaño equivalente por una profunda hendidura. El conjunto formado por los lóbulos y la hendidura componen un pliegue (dominio) con actividad ATPásica donde el ATP y el  $Mg^{2+}$  son unidos por puentes de hidrógeno e iónicos a cadenas laterales de aminoácidos.

Desde los estudios de difracción de rayos X de los filamentos de actina así como de los monómeros los científicos han establecido un modelo en que las subunidades de actina consisten en dos masas globulares de 3.8 nm separadas por 3 nm. La orientación de las subunidades es tal que la distancia de la esfera más interna desde el eje es de 1.2 nm y el de la esfera más externa es de 3 nm mientras que el eje largo de la subunidad está inclinado 20° de la perpendicular al eje (Egelman y De Rosier, 1983).

Una característica de estos filamentos de actina es que son estructuras polares de manera que todos los monómeros en ambas cadenas están orientados en la misma dirección, polaridad que revierte en las líneas Z. Los filamentos de actina solos muestran detalles insuficientes en el microscopio electrónico para poder discernir su polaridad, pero esta puede ser deducida de los experimentos de “decoración” que se

basan en la capacidad de la miosina para unirse a los filamentos de actina. En este tipo de experimentos filamentos de actina se combinan con fracciones  $S_1$  dando filamentos decorados que al microscopio electrónico presentan la característica apariencia en punta de flecha (Huxley, 1963) donde las flechas siempre apuntan en una dirección constante a lo largo de cada filamento de actina. Esta apariencia surge como consecuencia del modo característico de anclaje de las subunidades  $S_1$  de miosina a los filamentos de actina que debe ser el mismo para cada monómero de actina. Las subunidades  $S_1$  aparecen como estructuras elongadas y ligeramente curvadas que están ancladas a los monómeros de actina no sólo inclinados con respecto al eje del filamento de actina unos  $45^\circ$  sino también rotados sobre un eje perpendicular al eje del filamento y pasando a través de la subunidad  $S_1$  con el mismo ángulo. Es la combinación entre la inclinación y esta rotación lo que produce la apariencia en forma de punta de flecha característica (Moore et al., 1970).

#### **1.5. OTRAS PROTEÍNAS ORGANIZADORAS DEL SARCÓMERO.**

Asociados a los filamentos de actina se encuentra la tropomiosina que es una molécula fibrosa de 40 nm. Sus subunidades se unen cabeza a cola formando una cadena continua a lo largo del filamento de actina. Cada molécula de tropomiosina tiene 7 sitios de unión a actina y se une a 7 monómeros de actina en el filamento delgado. Asociada a la tropomiosina se encuentra la troponina (un complejo de tres proteínas TN-T, TN-I y TN-C) similares en secuencia a la calmodulina y las cadenas ligeras de miosina.

La  $\alpha$  actinina está formada por dos subunidades polipeptídicas de masa similar con un peso molecular de 180.000 daltons. Se encuentra en el disco Z implicada en el anclaje de los filamentos de actina a la línea Z junto con la proteína Cap Z, esta última involucrada probablemente en prevenir la despolarización de los filamentos de actina en su extremo positivo.

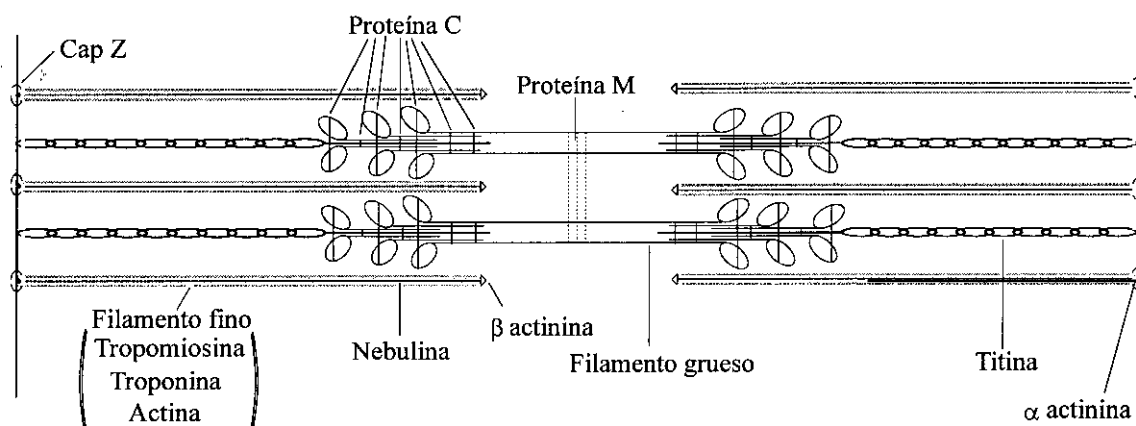
La B actinina es una proteína dímica formada por dos polipéptidos de 27.000 y 34.000 daltons que se localiza en el extremo libre de los filamentos delgados y puede ser que participe en la regulación de la longitud de dichos filamentos.

La proteína C es una cadena polipeptídica única de 140.000 daltons que forma una serie de 7 bandas transversales de 7 nm de anchura y espaciadas en intervalos de 43 nm a cada lado de los filamentos gruesos (Bechtel, 1986). Esta proteína constituye aproximadamente el 3% de las proteínas del filamento grueso y actúa evitando su destrucción por las fuerzas tensionales o por las modificaciones del entorno iónico.

Un tercer sistema de filamentos, compuesto por un grupo de proteínas extremadamente largas organiza los filamentos gruesos y finos en sus disposiciones tridimensionales proporcionando a la fibra muscular muchas de sus propiedades elásticas.

La titina conecta el final de los filamentos gruesos a la línea Z, extendiéndose a lo largo del filamento grueso hasta una región cercana a la línea M (Fürst et al., 1988), de esta manera mantiene los filamentos gruesos centrados durante la contracción.

La nebulina forma filamentos largos no elásticos que se extienden desde cada lado de la línea Z a lo largo de los filamentos finos, pudiendo actuar como una regla regulando el número de monómeros de actina que polimerizan dentro de cada filamento delgado durante la formación de fibras musculares maduras.



**FIGURA III.** Representación esquemática de la localización de las principales proteínas implicadas en la organización del sarcómero de músculo esquelético.

## **2. CAMBIOS EN LAS PROTEÍNAS POR CONGELACIÓN Y ALMACENAMIENTO DEL MUSCULO DE PESCADO.**

### **2.1. EFECTO DE LOS CAMBIOS POSTMORTEM SOBRE LA TEXTURA DEL MÚSCULO.**

Los cambios que ocurren durante la congelación y almacenamiento posteriores del músculo, están influenciados en cierta medida por el estado del mismo antes de tal procesamiento. En primer lugar la calidad del músculo de pescado depende en gran medida de los factores antemortem. Este hecho es atribuible en parte a la variabilidad genética de los animales y en parte a que los peces son muy sensibles al entorno de modo que la temperatura del agua, la naturaleza de la zona donde habitan, la cantidad de ejercicio que realizan, madurez sexual y la dieta que consumen son factores importantes e incontrolables que influyen en la calidad final del músculo.

Uno de los acontecimientos bioquímicos más importantes que tienen lugar en el tejido muscular postmortem es la reducción del PH debido fundamentalmente a la glicolisis. Dos factores son importantes en relación con el PH, uno se refiere a la magnitud y otro a la velocidad a la que ocurre dicha reducción. Si este desciende a valores suficientemente bajos mientras la temperatura es elevada se produce una notable desnaturalización de las proteínas contráctiles y/o sarcoplásmicas influyendo en la capacidad de las primeras para retener agua, fenómeno que puede ocurrir en los peces de "carne roja" como el atún. Por otro lado está el PH final que alcanza el tejido muscular, valor que también tiene gran influencia en la calidad textural del músculo, la capacidad de retención de agua por alteración de las proteínas miofibrilares y resistencia a la putrefacción como resultado del desarrollo microbiano. En animales de sangre caliente si con anterioridad al sacrificio el animal se ve sometido a estrés o ejercicio intenso el contenido en glucógeno desciende sustancialmente, resultando un PH final elevado, puesto que no existe sustrato para que la glicolisis se prolongue. Se encuentran discrepancias en este aspecto en músculo de pescado en función de la fuente bibliográfica. Según algunos autores el estrés y ejercicio al que se encuentran sometido el pez previamente a la muerte tiene un efecto importante sobre los niveles de glucógeno almacenado y el PH postmortem último. En un estudio reciente Chiba et al., 1991

encontraron que sometiendo a estrés durante varios minutos el pez previo a la captura se producía un decrecimiento de 0.50 unidades de PH en 3 horas en relación a especímenes no estresados cuyo PH disminuyó sólo 0.10 unidades en el mismo periodo de tiempo. Estos autores asimismo demostraron que la pérdida de sangre del pez reducía significativamente la producción de ácido láctico. Según otros autores el PH final que alcanza el músculo no está relacionado con el estrés o ejercicio al que se ve sometido el pescado antes de su muerte.

Es conocido que el lactato producido como resultado de la glicolisis anaerobia puede atravesar la membrana celular y en gran parte ser arrastrado por la sangre desde donde llega al hígado y es reutilizado para la síntesis de glucosa. La glucosa es transportada de nuevo al músculo donde finalmente se convierte en glucógeno. En los pescados vivos, el lactato producido durante el ejercicio que realiza durante la pesca es drenado lentamente del músculo y se necesita un largo periodo de tiempo para agotarlo, así cuando un pez lucha antes de la muerte se produce mucho lactato, la mayor parte del cual permanece en el músculo postmortem. Por el contrario un pez que apenas lucha antes de la captura contiene sólo una pequeña cantidad de lactato en el momento de la muerte, pero la glicolisis postmortem hará aumentar los niveles de lactato de modo equivalente al aumento experimentado por el pez que luchó antes de morir. Dado que la cantidad de lactato formado es groseramente proporcional a la cantidad de ATP formado por vía glicolítica anaeróbica y puesto que todo el ATP del pescado postrigor es degradado para producir iones hidrógeno, el efecto de estrés o lucha con anterioridad a la muerte no afecta al PH final. El PH final de la carne roja de pescado es 5.5 y el del pescado blanco es de 6.2 a 6.8 y es superior al de los mamíferos, pero depende de la estación del año, debido principalmente a los aspectos relacionados con la nutrición y los cambios estacionales. Sólo ocasionalmente se observa un PH último bajo en el músculo de pescado y esto ocurre en aquellos que han vuelto a alimentarse después de un periodo de ayuno pudiéndose producir el fenómeno de desconexión “gaping”, fenómeno relacionado con la rotura de los elementos conectivos que interconectan los miotomos, fenómeno que se exagera durante la congelación por la acción de los

cristales de hielo, que dañan más fácilmente el tejido conectivo más lábil al PH existente.

Otro fenómeno que afecta a la textura son los aspectos relacionados con la interacción de actina y miosina una vez que se ha agotado el ATP (rigor mortis). Uno de estos aspectos se refiere al proceso denominado “resolución del rigor” que consiste en una pérdida de dureza del músculo postrigor cuando éste se almacena a temperaturas de refrigeración. Este fenómeno ha sido atribuido por algunos investigadores a cambios en las interacciones actina-miosina durante el periodo postrigor (Takahashi et al., 1981), debido en parte a la acción de proteinasas endógenas que atacan a proteínas constituyentes de la estructura muscular, mientras que estos cambios no han sido observados por otros autores (Wolfe y Samejima, 1976). También se ha señalado que las cantidades de tropomiosina y troponina sufren un descenso con el almacenamiento postrigor.

El acontecimiento más significativo durante el proceso de ablandamiento postrigor es la desintegración del disco Z, atribuida a la acción de enzimas proteolíticos en la fibra muscular, calpaínas o factor activado por el calcio (CAF), que provoca la desintegración de los discos Z in vitro y cuyo principal papel en la fisiología del músculo es el recambio de las proteínas miofibrilares en el animal vivo lo que puede producirse por degradación del disco Z, de la proteína C y de la desmina que actúa como enlace intermiofibrilar. Muramoto et al. (1989) demostraron que las calpaínas de peces digieren específicamente la cadena pesada de miosina para formar un fragmento de Pm 150.000 Da. Estos autores además observaron que las calpaínas de peces eran más activas a bajas temperaturas que las de mamíferos y que el grado de ruptura era específico para cada especie siendo más activa contra miosinas con más baja estabilidad al calor. Así especies de peces adaptadas a temperaturas ambientales más frías son más susceptibles a autólisis por calpaínas que los de aguas tropicales. Aunque las calpaínas han sido identificadas en muchas especies de teleósteos existen pocos datos sobre la relación causa efecto entre la actividad de calpaínas y medidas instrumentales de textura.



Asimismo se ha demostrado que la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  a concentraciones fisiológicas conduce a un debilitamiento postrigor de los discos Z de la fibra muscular. Además de este fenómeno el  $\text{Ca}^{2+}$  también causa la liberación de una proteína de las miofibrillas, probablemente un componente del disco Z que debilita la interacción entre actina y miosina (Takahashi et al., 1981). Este debilitamiento de la interacción actina-miosina puede participar en la resolución del rigor mortis y en el aumento de la longitud del sarcómero durante la fase postrigor del músculo.

Otro grupo de proteasas presentes en el tejido muscular son las catepsinas (B, D, H y L) localizadas en los lisosomas de la célula muscular o lisosomas de los componentes del tejido conectivo o sistema circulatorio. Como consecuencia de la degradación de las membranas celulares en el tejido muscular postmortem catepsinas que se activan al PH final del músculo pueden actuar sobre componentes de la célula muscular. Así la catepsina B a PH 6 hidroliza preferentemente la miosina aunque también actúa sobre la troponina, tropomiosinas y actina (Noda et al., 1981). Tras la incubación de miofibrillas con catepsina B lo primero en observarse es la desaparición del disco Z, seguido por la pérdida de la línea M y un descenso de la densidad de la banda A. No obstante las catepsinas D y L se cree que tienen un papel más importante en la degradación autolítica del tejido de peces, especialmente la catepsina L puesto que es más activa a PH neutro y se ha demostrado que digiere proteínas miofibrilares (actomiosina) además de tejido conectivo.

La catepsina L ha sido implicada en el endurecimiento de varias especies (Yamashita y Komagaya, 1990, Toyohara et al., 1993a, Toyohara et al., 1993 b) implicaron a la catepsina L en el endurecimiento del salmón durante el desove. Estos autores demostraron que los patrones de electroforesis de miofibrillas purificadas tratadas con catepsina L resultaban idénticos a los de las proteínas extraídas de músculo de pez durante el desove. Asimismo la actividad autolítica de la catepsina se correlacionaba con la textura del músculo cuando éste era medido instrumentalmente. La capacidad autolítica medida por la actividad de la catepsina L era más alta en tejido congelado/descongelado que en tejido fresco.

Un fenómeno relacionado con el acortamiento por el frío es la contracción por descongelación o rigor de descongelación. Si el músculo se congela en prerigor con frecuencia sufre un acortamiento considerable durante la descongelación rápida que puede acompañar al endurecimiento del músculo (si la contracción es inferior al 40%) y una baja capacidad de retener agua (si la contracción sobrepasa el 40%). Por esta razón el músculo debe congelarse una vez establecido el rigor mortis. Este fenómeno es atribuido a que los cristales de hielo desorganizan el retículo sarcoplásmico y/o las mitocondrias en las fibras del músculo prerigor destruyendo su capacidad para mantener niveles bajos de calcio en el sarcoplasma desencadenando la contracción de congelación. Sin embargo en el caso del pescado no es un fenómeno tan crítico de modo que no es tan importante que se resuelva el rigor antes de congelar el músculo ya que siguen desarrollándose reacciones enzimáticas a bajas temperaturas y en periodos cortos de conservación el ATP se degrada, de modo que se puede evitar el rigor de descongelación si los pescados congelados en prerigor se mantienen a temperaturas normales de congelación durante dos meses.

## **2.2. FACTORES QUE INFLUYEN EN EL DETERIORO DEL MÚSCULO DURANTE SU ALMACENAMIENTO EN CONGELACIÓN.**

Los factores que influyen en la alteración posterior del músculo durante el almacenamiento en congelación comprenden los intrínsecos relativos a especies e individuos como se ha citado anteriormente, los de procesado como ha sido demostrado por numerosos autores (Shenouda, 1980, Mackie, 1993) que observan una pérdida de funcionalidad en músculo picado superior a la detectada en músculo entero, y por último factores relacionados con la conservación en congelación, entre los que cabe destacarse:

### **Modo de congelación.**

Se ha considerado que la congelación rápida se traduce en menos cambios químicos-bioquímicos durante el almacenamiento en congelación posterior, aunque los resultados obtenidos al respecto han sido equívocos (Matsumoto, 1979). Asimismo ha sido demostrado que el tipo de congelación puede influir en el deterioro de la calidad. Lee (1982) observó que la congelación en nitrógeno líquido resultaba en menor

endurecimiento y pérdida de agua que la congelación convencional después del almacenamiento del músculo a  $-20^{\circ}\text{C}$  2 meses. Algunos estudios han demostrado que el almacenamiento del músculo a temperaturas escasamente por debajo del punto de congelación podía ser aceptable, sin embargo a tales temperaturas se produce una degradación de la textura y apariencia así como pérdida de agua como resultado del daño celular y aceleración de las reacciones bioquímicas. Estudios más recientes han demostrado que congelación parcial por almacenamiento del músculo a  $-3^{\circ}\text{C}$  donde el 70% del agua está formando hielo puede retardar reacciones bioquímicas que se traducen en unos altos niveles de calidad.

Otros autores han encontrado que en cambio la temperatura de almacenamiento tenía una mayor influencia en el deterioro que el grado de congelación (Reid et al., 1986) de modo que podría establecerse un compromiso entre el grado de congelación y temperatura utilizando métodos rápidos en caso de que el músculo sea almacenado a una temperatura menor de la considerada ideal.

### **Temperatura y tiempo de almacenamiento.**

Un descenso en la temperatura de almacenamiento reduce la velocidad de las reacciones que contribuyen a la pérdida de calidad del músculo.

No obstante hay que tener en cuenta que la temperatura no influye por igual en todos los procesos de deterioro en músculo de pescado, por ejemplo la pérdida de cohesión es menos dependiente de la temperatura que el endurecimiento. Índices químicos tienen más baja energía de activación de Arrhenius que los índices físicos de deterioro en músculo de bacalao congelado a  $-12$  y  $-30^{\circ}\text{C}$  90 días (Le blanc et al., 1988). Por otro lado la estabilidad de las distintas especies difiere durante la conservación a una temperatura determinada e incluso se debe contemplar variación intraespecífica en función de otra serie de factores biológicos, estado nutricional, madurez sexual, y otros tecnológicos anteriormente citados.

Existen discrepancias en las informaciones acerca de la vida comercial en depósito, indicándose que las temperaturas adecuadas de almacenamiento pueden

oscilar entre  $-18$  y  $-29^{\circ}\text{C}$ . La variabilidad se debe a los distintos criterios de calidad y métodos de determinación utilizados por los investigadores. Teniendo en cuenta un elevado número de resultados experimentales se ha determinado la relación existente entre la vida en depósito y la temperatura de almacenamiento conocida como diagrama TTT (Tolerancia térmica temporal). Debido a las pérdidas irreversibles de calidad por temperaturas inadecuadas los diagramas TTT pueden emplearse para evaluar el efecto de las temperaturas de almacenamiento en la calidad de los productos, estableciéndose así modelos de indicadores de temperatura y de instrumentos que integran el binomio tiempo-temperatura con los que puede obtenerse los datos necesarios para predecir la vida comercial de los productos marinos en congelación (Sikorski y Kolakowska, 1990).

### **2.3. DESNATURALIZACIÓN-AGREGACIÓN DE LAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES DURANTE SU ALMACENAMIENTO EN CONGELACIÓN.**

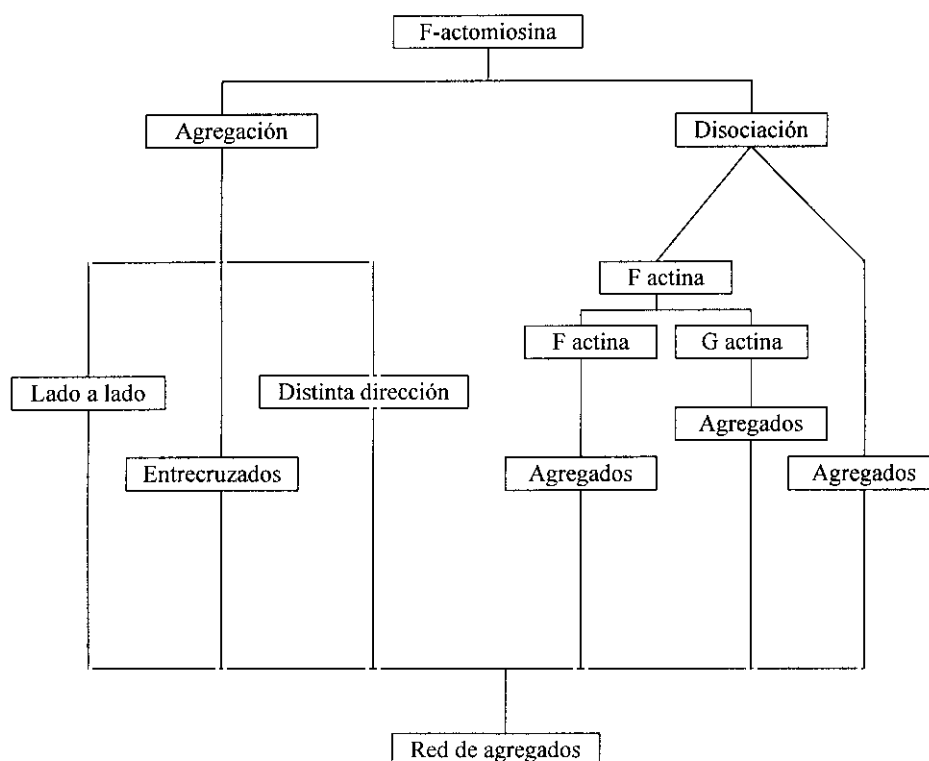
#### **Estudios bioquímicos sobre actomiosina.**

La asociación entre un deterioro de la textura y cambios en las proteínas miofibrilares fue establecido tempranamente por Reay (1933) quien observó que la extractabilidad de esta fracción era menor en músculo congelado. La mayor parte de los estudios desde entonces se han llevado a cabo sobre extractos de actomiosina que es la forma en que más fácilmente se extraen las proteínas miofibrilares.

Los trabajos de Dyer (1951) demostraron que la cantidad de actomiosina extraída decrecía durante el almacenamiento en congelación, mientras que las proteínas sarcoplásmicas no mostraban cambios significativos. Este decrecimiento se atribuyó a una desnaturalización acompañada por una agregación de la actomiosina en el músculo postrigor almacenado en congelación, hecho que fue confirmado por otra serie de evidencias. Así estudios de viscosidad de fracciones de actomiosina mostraban una disminución de este parámetro durante la congelación (Noguchi y Matsumoto, 1970). Estos resultados sugieren que los filamentos de actomiosina habían perdido algo de su morfología filamentosa posiblemente como consecuencia de la agregación de dichos filamentos.

Los análisis de ultracentrifugación de las fracciones solubles de actomiosina llevadas a cabo por distintos autores ponían de manifiesto la formación de agregados durante el almacenamiento del músculo en congelación. El pico correspondiente a actomiosina (20S-30S) decrecía en área, mientras otros picos correspondientes a fracciones que se movían más rápido eran más frecuentes durante la conservación en congelación (Noguchi y Matsumoto, 1970, Oguni et al., 1975).

King (1966) basado en patrones de ultracentrifugación de extractos de músculo de bacalao almacenado en congelación han propuesto que la desnaturalización de F-actomiosina ocurre por dos caminos paralelos. Algunos de los posibles mecanismos de desnaturalización-agregación aparecen recogidos en la figura IV.



**FIGURA IV.** Mecanismo hipotético de desnaturalización-agregación de la actomiosina de pescado por efecto de la congelación propuesto por Matsumoto (1980).

Otros datos que confirmaban la desnaturalización de la actomiosina se referían a la disminución de la actividad ATPásica durante su almacenamiento en congelación. (Tsuchiya et al., 1975).

Connell (1962) propuso que la insolubilización de la actomiosina se debe a la desnaturalización de la miosina más que de la actina. Durante 40 semanas de almacenamiento a  $-14^{\circ}\text{C}$  la extractabilidad de la actomiosina y miosina decrecían paralelamente, mientras que la de la actina permanecía constante. El decrecimiento en extractabilidad de la miosina fue bifásica mientras que la de la actomiosina seguía una curva exponencial. Sin embargo los estudios electroforéticos de los trabajos de Matsumoto (1979) in vitro con actomiosina de carpa aislada mostraban que la actina es desnaturalizada progresivamente con la miosina.

### **Estudios bioquímicos sobre miosina y subunidades de miosina.**

Debido a la dificultad en aislar miosina pura de músculo de peces los estudios sobre el comportamiento de esta proteína durante el almacenamiento en congelación fueron retrasados. La miosina es considerada la más sensible de las proteínas miofibrilares a la desnaturalización. Su pérdida en extractabilidad durante el almacenamiento en congelación alcanza el 80% de la miosina total de músculo de bacalao.

Connell (1959) fue el primero en abordar este estudio. Se llevaron a cabo sistemas modelo en los que soluciones de miosina de bacalao en 0.6M ClK fueron congeladas y almacenadas entre  $-7$  y  $-70^{\circ}\text{C}$  y las soluciones descongeladas examinadas por análisis de ultracentrifugación demostrando la agregación progresiva de monómeros a dímeros, trímeros y otros polímeros de mayor tamaño. Connell sugirió que las moléculas de miosina se agregaban lado a lado sin desplegarse o sufrir cambio alguno en la conformación intramolecular. Este autor también encontró que la cantidad de miosina agregada en preparaciones en las que esta proteína se extraía desde bacalao congelado y almacenado incrementaba en función del tiempo.

Buttkus (1970, 1971) encontró resultados similares a los de Connell en estudios realizados sobre miosinas de músculo de conejo y trucha tras analizar los cambios en solubilidad, viscosidad, actividad ATPásica y perfiles de ultracentrifugación experimentados por las moléculas de miosina durante la congelación .

Hanafusa (1964) encontró que miosina aislada de músculo de conejo y meromiosina pesada sufrían desnaturalización cuando se congelaban a temperaturas entre  $-10^{\circ}\text{C}$  y  $-196^{\circ}\text{C}$  seguidas por descongelación, como mostraban el aumento observado en los valores de viscosidad y cambios en los valores de absorbancia a 278nm (revisado por Matsumoto 1980).

Matsumoto et al. (1977) tras la digestión de la molécula de miosina con tripsina y su posterior purificación y almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$  no detectó cambios en las curvas de solubilidad para HMM y LMM, sin embargo detectó cambios en otras propiedades inherentes a cada uno de los fragmentos de la molécula. Por un lado la actividad ATPasa de HMM desaparecía después de 2 semanas de almacenamiento en congelación. Además la capacidad de HMM para unirse a la F-actina, como se determinó por microscopía electrónica, se perdió después de este periodo de tiempo.

La microscopía electrónica también permitió observar que LMM exhibió una disminución en la capacidad de formar paracrystales bien ordenados.

Estos resultados indicaban que la desnaturalización podía afectar a ambos segmentos de la molécula de miosina HMM y LMM. El decrecimiento en la actividad ATPásica y la unión a F-actina de HMM puede indicar un cambio conformacional en la región  $S_1$ . Por otro lado el decrecimiento en la capacidad de formar paracrystales de LMM durante el almacenamiento en congelación se explica por un impedimento de la estructura helicoidal necesaria para el alineamiento de un paracrystal o por la agregación desordenada lado a lado de dos o más moléculas de miosina que prevengan los alineamientos ordenados de un paracrystal. Frente a esta hipótesis Connell (1959) no cree en la existencia de un cambio conformacional de la molécula de miosina debido a que no detectó cambios de la rotación específica de la miosina durante el

almacenamiento en congelación. Sin embargo determinados autores creen que determinados cambios conformacionales que se puedan producir en la moléculas de miosina no implican cambios en dicho parámetro.

### **Estudios bioquímicos sobre actina.**

La actina ha sido considerada una proteína relativamente estable durante la congelación. Connell (1962) no encontró una cantidad significativa de desnaturalización de actina durante el almacenamiento en congelación del músculo de bacalao durante 100 semanas, pero otros autores si encontraron desnaturalización de actina en otras especies de peces (Matsumoto et al., 1977). Estos autores encontraron una disminución de los valores de solubilidad y viscosidad de soluciones de G y F-actina así como de la capacidad de polimerización de la G-actina, lo cual implicaba que la conformación de la G-actina se había modificado.

### **Estudios bioquímicos sobre tropomiosina y troponina.**

La tropomiosina es la más estable de las proteínas miofibrilares. Durante el almacenamiento en congelación se logra extraer mucho más de esta proteína después de que actina y miosina resultan inextraídas.

Los datos referentes a la alteración de troponinas aisladas desde músculo de peces mostraban una disminución en su función reguladora con respecto al músculo fresco.

### **Estudios por microscopía electrónica de transmisión.**

La microscopía electrónica fue también utilizada como herramienta que demostraba la desnaturalización y agregación de las proteínas miofibrilares, complementando los estudios bioquímicos realizados sobre los extractos proteicos.

Tinciones negativas sobre preparaciones de actomiosina de músculo de carpa mantenidas almacenadas en congelación mostraban una tendencia de los filamentos a agregarse lado a lado y entrecruzarse formando verdaderas redes de filamentos agregados en estadios avanzados de almacenamiento en congelación (Tsuchiya 1975 et al., Oshini et al., 1978, Oguni et al., 1975). Adicionalmente se observaba acortamiento



de los filamentos y la formación de gránulos, de modo que en el fondo de las micrografías se distinguían partículas que pudieran corresponderse con masas agregadas de moléculas de miosina.

Experimentos similares con filamentos de F-actina extraídos de músculo de carpa almacenados en soluciones 0.05 M de ClNa durante 4 semanas a -20°C mostraban agregados de filamentos entrecruzados que apenas se podían delinear (Matsumoto et al., 1977).

Matsumoto et al., 1977 aprovecharon la propiedad que tienen las moléculas de miosina aisladas de formar filamentos en soluciones de baja fuerza iónica. Estos filamentos visualizados por microscopía electrónica presentan forma de huso o de pesa de gimnasia en función del método empleado para su preparación. Después del almacenamiento en congelación de las soluciones de miosina, los filamentos reconstituidos no presentaban la forma descrita para filamentos preparados con miosina intacta.

Jarenbäck y Liljemark (1975b) en las tinciones negativas realizadas sobre extractos solubles en sal obtenidos de músculo de bacalao almacenado en congelación observaron una disminución del número de filamentos de actomiosina y un incremento en el número y tamaño de los agregados. Los cambios más importantes referentes a la morfología de los filamentos de actomiosina se referían a una disminución de su tamaño así como de la cantidad de miosina asociada a ellos de modo que en periodos largos de almacenamiento aparecían como filamentos de F-actina no decorados.

Estos autores además llevaron a cabo un estudio por MET de los residuos que resultaban inextraídos por la solución salina encontrando una mayor retención de los filamentos gruesos en la banda A de dichos residuos miofibrilares durante el almacenamiento del músculo en congelación. Estas observaciones junto con los cambios detectados en la morfología de los filamentos de actomiosina, fueron relacionados con una progresiva agregación de moléculas de miosina dentro de los filamentos gruesos.

## 2.4. NATURALEZA QUÍMICA DE LA AGREGACIÓN.

La elucidación de la naturaleza química de los enlaces es vital a la hora de clarificar y controlar el mecanismo de desnaturalización-agregación de las proteínas durante la congelación.

Se observan numerosas discrepancias en la literatura acerca de la naturaleza de los enlaces responsables de la agregación.

Connell (1959) sugirió que los puentes disulfuro no estaban implicados en la agregación intermolecular de la miosina puesto que no detectó un cambio significativo en el número de grupo sulfhidrilo libres. Adicionalmente este autor en 1965 consiguió solubilizar la casi totalidad de las proteínas miofibrilares de músculo de bacalao almacenado 29 semanas a  $-14^{\circ}\text{C}$  después de su tratamiento con SDS, agente que está implicado en la rotura de enlaces de tipo secundario. Connell atribuyó la agregación a la formación de enlaces de naturaleza no covalente.

Por el contrario, la participación de grupos SH en el proceso de desnaturalización de miosinas de trucha y conejo fue sugerido por Buttkus (1970, 1971, 1974). Este autor atribuyó a los puentes disulfuro, enlaces hidrofóbicos, y puentes de hidrógeno un papel en la agregación. Sin embargo sólo una pequeña proporción de grupos sulfhidrilo decrecía durante el almacenamiento en congelación por lo que los cambios parecían ser el resultado de reordenaciones de puentes disulfuro intramoleculares e intermoleculares a través de una reacción de intercambio sulfhidrilo-disulfuro.

Experimentos similares a los de Buttkus fueron llevados a cabo por Tsuchiya et al. (1975) en soluciones de actomiosina o miosina aisladas de carpa y almacenadas posteriormente a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El tratamiento con diferentes agentes solubilizantes permitió concluir que la desnaturalización e insolubilización de actomiosina y miosina durante el almacenamiento en congelación era resultado de la agregación causada por el incremento progresivo de enlaces intermoleculares debido a la formación de puentes de hidrógeno, puentes iónicos, hidrofóbicos y puentes disulfuro.

Matthews et al. (1980) demostraron la formación de enlaces covalentes durante el almacenamiento de músculo picado de bacalao a  $-7^{\circ}\text{C}$  y que la miosina estaba implicada en dicha agregación. El paso inicial era la formación de enlaces disulfuro, seguido posteriormente por la formación de otros enlaces de naturaleza covalente hasta que la miosina resultaba totalmente agregada.

Lim y Haard (1984) encontraron que las proteínas musculares de *Reinhardtius hippoglossoides* agregadas como resultado de su almacenamiento en congelación eran solubles en un medio que contenía SDS y ME, demostrando la importancia de los puentes disulfuro en el proceso de agregación. La implicación de este tipo de enlaces además quedó puesto de manifiesto por el hecho de que la adición de varios agentes que reducen los grupos tiol en el músculo picado antes de la congelación prevenía la agregación de las proteínas. El análisis por electroforesis de las proteínas extraídas permitió establecer la participación de otros enlaces de naturaleza covalente diferente de los disulfuro.

Recientemente Tejada et al. (1996) y del Mazo (1997) encontraron diferencias en el tipo de enlaces implicados en la agregación así como una evolución diferente en su formación en función de la especie, integridad del músculo y temperatura de almacenamiento considerada.

### **3. ALTERACIONES EN LA ULTRAESTRUCTURA DEL MÚSCULO DE PESCADO ASOCIADAS A LA CONGELACIÓN.**

En estudios con microscopía óptica Love (1966) examinó la formación de cristales de hielo y su efecto sobre el tejido muscular.

Love y Abel (1966) en estudios con microscopía electrónica establecieron una correlación entre la dureza y el aumento de cohesión observado entre las miofibrillas.

Tanaka (1965) concluyó de sus estudios sobre secciones ultrafinas que al cabo de dos meses los miofilamentos de la fibra muscular del abadejo (*Theragra chalcogramma*) resultaban fibrosos, refiriéndose este término a una disminución de la

distancia existente entre ellos así como de su diámetro. Diferencias interespecíficas fueron también observadas en el comportamiento de los miofilamentos durante el almacenamiento del músculo en congelación.

Bello et al. (1981, 1982) observaron en estudios por microscopía óptica y electrónica alteraciones en la organización de los componentes del tejido variables, en función del método de congelación utilizado. Las micrografías electrónicas mostraron en músculo de *Carassus auratus* cuando se utilizaron métodos de congelación rápidos, agujeros dentro de las miofibrillas como consecuencia del crecimiento de pequeños cristales de hielo que modificaban la ordenación de los miofilamentos, por lo que éstos aparecían más separados especialmente en la banda A, que corresponde a los filamentos gruesos. Existían dificultades para observar las uniones entre filamentos de actina y línea Z, así como las bandas A, I, H y la línea M.

Las micrografías electrónicas tras congelación del músculo lentamente mostraban la presencia de grandes espacios libres indicativos de la formación de grandes cristales de hielo desde el sarcoplasma que inciden en la rotura de miofibrillas y una disminución de la separación entre filamentos. En ambos casos independientemente del método de congelación utilizado los órganos celulares y sarcolema resultaban dañados.

Otros estudios se centraron en la observación de posibles alteraciones experimentadas por la red hexagonal. Jarenbäck y Liljemark (1975a) en sus estudios por criofractura observaron modificaciones en la organización de dicha red durante el almacenamiento del músculo en congelación. Sin embargo estos autores no encontraron diferencias en las proyecciones de interacción actina-miosina ni en las dimensiones de los filamentos gruesos. Howgate (1979) recogió en su revisión una hipótesis según la cual las miofibrillas son distorsionadas y comprimidas a lo largo de una línea aproximadamente normal al borde del cristal de hielo. La ordenación hexagonal es alterada, de modo que el espacio entre filamentos gruesos es reducido a lo largo de la línea de compresión. Aunque la distancia interfilamento haya sido reducida en una dimensión, esto no significa necesariamente que el área de la sección transversal de la miofibrilla disminuya en proporción relativa; el examen de algunas miofibrillas sugiere

que cuando el espacio interfilamento disminuye en un sentido, el espacio entre filamentos en la dirección perpendicular de la red aumenta. Cuando el tejido muscular congelado se descongela según esta teoría las miofibrillas recuperan su estructura original y espaciado entre filamentos.

Una hipótesis que ha sido postulada teniendo en cuenta el mecanismo de interacción entre filamentos de actina y miosina durante la contracción muscular es que la extracción de agua inicialmente por efecto de la congelación y posteriormente durante el almacenamiento se traduciría en una reducción de la distancia entre filamentos favoreciendo la formación de enlaces entre ellos (Jarenbäck y Liljemark 1975a). En relación con dicha hipótesis la interacción entre filamentos adyacentes, podría explicar el endurecimiento y los cambios en la capacidad de absorber agua del músculo después de la descongelación.

Basándose en esta idea se han llevado a cabo estudios que tenían por objeto medir las variaciones experimentadas por la red en la distancia interfilamento.

Liljemark (1969) y Connell y Howgate (1969) observaron una disminución de la distancia interfilamento cuando se establece el rigor en el músculo, pero no observaron diferencias en el músculo almacenado en congelación concluyendo que un mayor empaquetamiento de los filamentos gruesos no es un requisito imprescindible para el endurecimiento del músculo. Dado que el método de preparación de muestras para microscopía electrónica convencional podía influenciar los resultados obtenidos por estos autores, Jarenbäck y Liljemark (1975a) llevaron a cabo mediciones similares utilizando la criofractura donde las dimensiones del espécimen que se encuentra hidratado son mejor preservadas. Los valores de distancia interfilamento eran superiores a los encontrados en especímenes tratados para su inclusión en resinas. Asimismo demostraron una disminución significativa de la distancia interfilamento en músculos almacenados en congelación.

La aplicación de otras técnicas como difracción de rayos X que presenta la ventaja de no requerir la preparación de muestras tampoco mostró diferencias en la distancia

interfilamento en músculo durante su almacenamiento en congelación. (Aitken y Connell 1977).

Algunos autores opinan que los cambios químicos sólo proporcionan una explicación parcial de las alteraciones en la ultraestructura de la fibra. Durante el almacenamiento del músculo en congelación se produce una reducción significativa del retículo sarcoplásmico. Según un modelo propuesto por Connell (1968), restos de retículo sarcoplásmico cuando éste se degrada podrían actuar como un pegamento contribuyendo a la cementación de las miofibrillas.

Love (1966) concluyó de un estudio con microscopía de macerados de músculo de bacalao que el endurecimiento del músculo durante la congelación está asociado con una incrementada resistencia de la fibra a ser disgregada en sus componentes fibrilares, en lo cual pudieran estar implicados los cambios sufridos por el retículo sarcoplásmico.

Jarenbäck y Liljemark (1975b) observaron en sus estudios morfológicos sobre residuos insolubles inextraídos con sal una incrementada cohesión entre miofibrillas después de un prolongado almacenamiento del músculo en congelación. Una contribución a esto puede ser la degradación del retículo sarcoplásmico, como corroboraron sus estudios por criofractura (Jarenbäck y Liljemark 1975a). La unión de las miofibrillas puede influir en el sentido de reducir la cantidad de proteína que puede ser extraída con soluciones salinas, ya que esta propiedad puede estar influenciada por el grado de subdivisión de la fibra muscular.

## **4. FACTORES QUE CAUSAN LA DESNATURALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DURANTE LA CONGELACIÓN.**

### **4.1. DESHIDRATACIÓN.**

La estabilidad de la estructura tridimensional de las moléculas de proteína depende en gran parte de los puentes de hidrógeno estabilizados por las moléculas de agua. La migración de las moléculas de agua para formar cristales de hielo durante la congelación se traduce en una alteración del sistema de puentes de hidrógeno así como la exposición de regiones de la superficie de las moléculas de proteína entre las que podrían tener lugar interacciones hidrofóbicas-hidrofóbicas e hidrofílicas-hidrofílicas dentro de la misma molécula de proteína causando alteración de la estructura tridimensional o entre moléculas de proteína adyacentes causando agregación. La deshidratación lleva asimismo consigo un incremento en 10 veces de la concentración de solutos. El efecto de la concentración de sal sobre la desnaturalización y agregación de proteínas se basa en su acción sobre fuerzas secundarias (iónicas, Van der Waals, puentes de hidrógeno e hidrofóbicos) que a su vez estabilizan las configuraciones terciarias y cuaternarias de las proteínas.

### **4.2. FACTORES RELACIONADOS CON LÍPIDOS.**

El efecto de los lípidos sobre las proteínas durante la congelación varía de acuerdo con el estado de los lípidos. El papel de los lípidos intactos sobre la estabilidad de las proteínas no es claro. Hay evidencias de que su presencia juega un papel protector, en cambio estudios sobre sistemas modelo mostraban un efecto adverso sobre las proteínas a través de la formación de complejos lipoproteicos por medio de fuerzas electroestáticas e hidrofóbicas que o bien desnaturalizan las proteínas o intensifican el efecto desnaturalizante ejercido por otros agentes.

Los ácidos grasos derivados de la hidrólisis fundamentalmente de fosfolípidos parecen atacar hidrofóbica o hidrofílicamente sitios apropiados sobre la superficie de las proteínas, lo que ayudaría a crear microambientes más hidrofóbicos responsables de agregaciones que explicarían la disminución en extractabilidad que experimentan las

proteínas miofibrilares en presencia de ácidos grasos. Por último están los efectos asociados a la oxidación de lípidos. El mecanismo de reacción entre lípidos oxidados y proteínas no ha sido elucidado. Se ha propuesto que radicales libres que son transferidos a proteínas puedan iniciar reacciones de agregación con otros lípidos y proteínas. Por otro lado se cree que los productos oxidados de los lípidos se unen a grupos funcionales de las proteínas como cisteína y grupos ε-amino de la lisina, tirosina metionina incrementando la hidrofobicidad de las proteínas de los filamentos o incluso entre filamentos induciendo la formación de agregados.

#### **4.3. ÓXIDO DE TRIMETIL AMINA Y SUS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN.**

Una de las evidencias más significativas era la correlación existente entre la presencia de formaldehído y dimetil amina en determinadas especies y la baja calidad organoléptica y funcional presente en estos músculos.

Amano y Yamada (1965) demostraron que el formaldehído y la dimetil amina son producidas equimolarmente a partir del óxido de trimetil amina (TMAO) por un proceso enzimático en el cual está implicado la TMAasa (óxido de trimetil amina demetilasa) localizada en vísceras y en la fracción microsomal de músculo (Parkin, 1981).

El TMAO es un compuesto presente en especies marinas especialmente las gadiformes dentro de los teleósteos cuyo principal papel fisiológico está relacionado con el mantenimiento del balance de nitrógeno.

#### **4.4. EFECTO DEL FORMALDEHÍDO.**

Se ha aceptado que el deterioro en calidad y textura del músculo almacenado en congelación en relación con la rotura del TMAO está asociado a la acción del formaldehído

Son necesarias pequeñas cantidades de este compuesto (0.5mM por 100 gramos de músculo) tal y como describió Dingle et al., (1977) para inducir las alteraciones anteriormente descritas.



El efecto del formaldehído fue establecido por observación directa de que existía una correlación entre la extractabilidad proteica y la cantidad de formaldehído detectado de manera inversa. Así cuanto mayor era la concentración de formaldehído producido menor cantidad de proteína podía ser extraída de músculo con soluciones salinas. Un aspecto destacable es que la cantidad de formaldehído medido en músculo de pescado no apoya la idea de que DMA y FA son producidos en una estequiometría 1:1 desde TMAO ya que la concentración de formaldehído medida era siempre menor que la esperada comparando la cantidad de DMA producida. La explicación fue dada en función de la alta reactividad del formaldehído con aminoácidos libres y proteínas. Existen discrepancias sobre el momento en que dichas interacciones tienen lugar. Una de las hipótesis es que el formaldehído se une preferentemente a las proteínas en los primeros estadios de almacenamiento en congelación cuando todos los blancos de acción del formaldehído estarían libres en las proteínas (Dingle y Hines, 1975 y Castell y Smith, 1973). En contra de esta hipótesis se encuentran observaciones de que la cantidad de formaldehído unido incrementaba con el almacenamiento conforme aumentaba su producción (Kelleher et al., 1981, Sotelo et al., 1994). Estas discrepancias indican que varios factores pueden actuar influenciando la interacción formaldehído-proteína. Por un lado se conoce que cambios en las proteínas durante el almacenamiento del músculo en congelación pueden afectar a la reactividad del formaldehído. Además pueden influir factores relacionados con el nivel de producción de dicho compuesto puesto que los cambios en integridad de las membranas durante el almacenamiento en congelación pueden influir en la liberación de formaldehído y por tanto su acceso a las proteínas ya que la TMAasa se encuentra localizada en estructuras lisosómicas.

#### **4.5. MECANISMO DE ACCIÓN DEL FORMALDEHÍDO.**

La posible naturaleza de la reacción del formaldehído con proteínas se ha estudiado en sistemas modelo utilizando espectroscopía de resonancia magnético nuclear con C <sup>13</sup> que permitió identificar tres tipos de productos como resultado de la reacción entre formaldehído y proteínas. La reacción inicial conduce a la formación de derivados hidroximetil (reversibles). Un segundo tipo de unión es resistente a ácidos (unión de tipo metil-lisina, formil-lisina, y puentes metileno lisina-tirosina). Un tercer

tipo de unión es ácido lábil en la que están implicados puentes metileno que son capaces de crear enlaces inter e intramoleculares implicados en la polimerización y pérdida de solubilidad proteica como demostraron GalembekK et al., 1977. Esta teoría ha sido discutida por Connell (1965, 1975) que llegó a la conclusión de que el formaldehído se podía unir irreversible o covalentemente a proteínas pero que las proteínas probablemente no se agregaban por la formación de los enlaces covalentes. Por el contrario estudios in vitro llevados a cabo por este autor en que el formaldehído se añadía a músculo de pescado a temperaturas de congelación observó la presencia de puentes metileno pero concluyó que este no es un mecanismo que tenga lugar durante el almacenamiento en congelación del músculo.

Regenstein et al. (1982) concluyeron que el formaldehído está implicado en alteraciones de la conformación de las proteínas mediante la formación de enlaces de tipo disulfuro.

Matthews et al. (1980) sugirieron que el formaldehído podía mediar la formación de enlaces covalentes que no podían ser reducidos por el mercaptoetanol, para lo cual se requería previamente la formación de enlaces covalentes disulfuro.

Ang y Hultin (1989) encontraron que la presencia de FA causaba agregación de un bajo porcentaje de miosina purificada por la formación de enlaces covalentes no disulfuro como mostraba la presencia de componentes de elevado peso molecular superior a 200 KDA en sus estudios electroforéticos.

Otros autores (Rehbein, 1985) observaron que el formaldehído es capaz de desnaturalizar proteínas miofibrilares sin la necesidad de formar enlaces de naturaleza covalente.

Owusu-Ansah y Hultin (1987) dedujeron que la insolubilización de las proteínas durante el almacenamiento en congelación se debía a la formación de enlaces hidrofóbicos más que enlaces covalentes y dentro de éstos, la mayoría respondían a enlaces de tipo disulfuro.

Se ha apuntado el hecho de que el formaldehído presente una reactividad mayor hacia proteínas que ya estén desnaturalizadas como sugirió Connell (1975) al encontrar que la inextractabilidad proteica tras la adición de formaldehído era superior en músculo congelado que en músculo fresco. Experimentos llevados a cabo por Singh y Wang (1977) mostraron una relación entre la interacción de aldehídos con respecto a la temperatura de congelación. Estos autores encontraron que el grado de reacción entre miosina y malonaldehído decrecía cuando la temperatura era reducida de 45°C a 0°C, reacción que incrementó cuando la solución fue congelada, encontrándose el máximo nivel a -24°C. Parecía que bajo las condiciones utilizadas en este estudio, algún cambio previo en la proteína es necesario antes de que el formaldehído actúe como agente agregante. De modo similar Ang y Hultin (1989), Sotelo y Mackie (1993) establecieron que el formaldehído aceleraba la desnaturalización de la miosina de bacalao cuando la proteína estaba afectada por la congelación.

Una de las últimas hipótesis que se han postulado es la importancia del formaldehído como un modificador de la conformación que eventualmente hace la proteína más susceptible a una posterior desnaturalización y agregación.

Ang y Hultin (1989) observaron cambios en hidrofobicidad en soluciones de miosina sometidas a procesos de congelación/descongelación, fenómeno directamente relacionado con la temperatura y concentración de formaldehído añadido, de modo que a menor temperatura y concentración de formaldehído añadido el cambio era menor. Se conoce que en estados intermedios de desnaturalización de proteínas globulares en las que la estructura secundaria era equivalente a la de la proteína nativa, pero la estructura terciaria se encontraba escasamente definida, existía una mayor exposición de la superficie hidrofóbica. Estos autores propusieron un modelo en el que la interacción del formaldehído con grupos de las cadenas laterales de aminoácidos se traducía en que la proteína nativa menos estable, fenómeno manifestado entre otros por el aumento de hidrofobicidad. Los datos de Ang y Hultin en relación al comportamiento de la miosina durante el almacenamiento en congelación en presencia de formaldehído pueden indicar la existencia de diferentes estados de desnaturalización que podrían estar reflejando

diferencias en la pérdida de estructura terciaria. Hasta el momento esta teoría es pura especulación que necesita ser comprobada.

Recientemente Sotelo y Mackie (1993) utilizando un sistema modelo con albúmina, dada la simplicidad de esta proteína comprobaron algunos de las hipótesis anteriormente descritas. Estos autores confieren un papel desnaturizador al formaldehído para lo cual se necesita que la proteína esté previamente afectada por la congelación, hechos que podrían influir en procesos de agregación entre las proteínas. El modelo propuesto se basa en que el formaldehído se une a determinados aminoácidos como triptófano e histidina y a minas como asparagina y glutamina que se encuentran en la parte más interna de las proteínas cuando estas se encuentran en su estado nativo. Es probable que durante la congelación las proteínas se desplieguen parcialmente con lo que estos aminoácidos queden expuestos al formaldehído. Puentes mediados por el formaldehído pueden ser formados, impidiendo el plegamiento de la proteína cuando la solución es descongelada. En ausencia de formaldehído, la albúmina tras ser descongelada podía volver a plegarse recuperando su estado inicial.



## **OBJETIVOS.**

La conclusión que puede ser extraída de los estudios precedentes sobre alteraciones de músculo de pescado durante su almacenamiento en congelación es la variabilidad de los resultados obtenidos. En una primera aproximación se debe tener en cuenta que en el proceso de desnaturalización proteica del músculo durante la congelación no está involucrada una sola reacción específica. Numerosos aspectos tanto intrínsecos como tecnológicos influyen en dicho proceso, lo que hace difícil la generalización de un posible mecanismo de desnaturalización y la necesidad de estudiar cada supuesto de modo específico.

Desde el punto de vista bioquímico los resultados aparecen influenciados por el diseño experimental, especie, grado de integridad del músculo y temperaturas de congelación consideradas.

Desde el punto de vista estructural, el problema ha sido escasamente abordado debido a la dificultad del mismo. Los estudios realizados hasta la fecha no han permitido comprender la naturaleza de los cambios que tienen lugar en la ultraestructura de la fibra muscular durante el almacenamiento del mismo en congelación.

En relación con los factores responsables de la agregación proteica y el papel del formaldehído se han planteado numerosas hipótesis sobre el mecanismo de acción de este agente que necesitan ser comprobadas convenientemente.

En recientes revisiones bibliográficas se demanda la necesidad de conocer más profundamente el mecanismo de desnaturalización proteica que permita incidir en los aspectos tecnológicos relacionados con la prevención de dicha desnaturalización, entre los que cabe destacar la adición de crioprotectores y la elección de la temperatura óptima de conservación, así como aplicaciones basadas en la refuncionalización de proteínas.

Teniendo en cuenta estos precedentes en este trabajo se ha pretendido abordar desde un punto de vista ultraestructural algunos de los diversos aspectos relacionados con la alteración que sufre el material miofibrilar de músculo en algunas especies gadiformes durante su almacenamiento en congelación. Para dicho propósito se ha utilizado como herramienta la microscopía electrónica y diferentes técnicas complementarias que aportan información química y numérica en relación con las estructuras microanatómicas.

En consecuencia con lo antedicho, nuestros objetivos han sido:

- Establecer la evolución de la agregación de las proteínas miofibrilares durante el almacenamiento en congelación del músculo de dos especies pertenecientes al orden gadiformes incidiendo en dos aspectos: la naturaleza química de la agregación así como las posibles proteínas y mecanismo por el que dicho proceso tiene lugar.
- Estudiar las alteraciones que afectan al material miofibrilar en la fibra muscular *in situ* durante la congelación, destacando dos aspectos, el relacionado con la ordenación de la red hexagonal y la naturaleza misma de los miofilamentos.
- Estudiar la influencia de la especie, temperatura de almacenamiento y grado de integridad en las alteraciones musculares.

- Establecer los cambios en antigenicidad de la molécula de miosina en músculo de bacalao almacenado a -20°C, lo que aportará información sobre la posible desnaturalización o cambio del epítopo reconocido por el anticuerpo testado en el estudio inmunohistoquímico.
- Se valorará el posible papel del formaldehído, su mecanismo y blanco de acción en el músculo in situ mediante el uso de técnicas autorradiográficas.





## MATERIAL Y MÉTODOS.

### **MATERIAL.**

Este estudio se llevó a cabo en dos especies: bacalao (*Gadus morhua*) y merluza (*Merluccius merluccius*), capturados en Octubre y Diciembre respectivamente. En ambos casos se prepararon filetes a partir de pescados enteros que se encontraban en estado postrigor.

Los filetes de bacalao fueron suministrados por la estación de Investigación de Torry, Aberdeen. Una serie de filetes fueron envasados al vacío, congelados a  $-40^{\circ}\text{C}$  durante 3 horas, enviados por avión en  $\text{CO}_2$  sólido y posteriormente almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $-30^{\circ}\text{C}$ . Otra serie de filetes fueron picados y procesados a continuación del mismo modo que los filetes para ser finalmente almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Los filetes de merluza fueron suministrados por IPIMAR, Instituto Portúges de Investigaçáo Maritima. Estos fueron empaquetados al vacío y congelados a  $-40^{\circ}\text{C}$ . A continuación fueron almacenados a  $-30^{\circ}\text{C}$  para su transporte y finalmente almacenados a la temperatura de estudio  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $-30^{\circ}\text{C}$ .

## MÉTODOS.

### 1. ESTUDIO DE EXTRACTOS PROTEICOS Y FRACCIONES INSOLUBLES.

#### 1.1. EXTRACCIÓN DE ACTOMIOSINA.

El aislamiento de actomiosina natural fue llevado a cabo por el Instituto del Frío (C.S.I.C) siguiendo el método descrito por Kawashima et al. (1973). Cada 100g de músculo descongelado y picado se lavaron con 500 ml de una solución de tampón fosfato PH 7.5, centrifugándose posteriormente la suspensión a 5.000g durante 15 minutos. El precipitado se recogió repitiendo el proceso de lavado varias veces. Al precipitado resultante se le añadió una solución de ClK 0.8M PH 7.5 homogeneizando la mezcla con un homogeneizador Omnimixer. Este extracto proteico permaneció en reposo 2 horas a 0°C en hielo y fue posteriormente centrifugado a 5.000g durante 20 minutos en centrífuga refrigerada. El sobrenadante se vertió sobre 10 volúmenes de agua muy fría y se dejó en reposo 20 minutos hasta que la proteína precipitó. Tras ser centrifugado al precipitado obtenido se le añadió la cantidad necesaria de ClNa 3M para obtener una solución 0.6 M que se dializó obteniéndose el extracto de actomiosina (extracto soluble S<sub>1</sub>) con una concentración final entre 20 y 30 mg/ml.

La fracción insoluble obtenida después de la extracción de actomiosina (P<sub>1</sub>) fue tratada con 4 volúmenes de una solución de dodecil sulfato sódico (SDS) 2.5% en agua obteniéndose una concentración final de SDS de 2% . La mezcla se centrifugó a 5000 g durante 15 minutos obteniéndose un sobrenadante S<sub>2</sub>. El precipitado P<sub>2</sub> no extraído con SDS se trató con 4 volúmenes de una solución acuosa de SDS 2.5% y β-mercaptoetanol (ME) 6.25% alcanzándose una concentración final de SDS 2% y ME 5%. La solución se centrifugó obteniéndose un nuevo sobrenadante (S<sub>3</sub>) quedando una fracción final insoluble P<sub>3</sub> en el caso de que la fracción P<sub>2</sub> no resultó extraída tras el tratamiento con estos agentes.

La concentración de proteína en las fracciones solubles en sal fue determinada por el método de Lowry y Kjeldahl y por el método de Lowry en las fracciones extraídas

con SDS y SDS-ME. Los resultados en cada fracción fueron expresados como gramos de proteína extraída (AMN) por gramo de proteína total de músculo.

### 1.2. ELECTROFORESIS SDS-PAGE.

Las fracciones proteicas solubilizadas con los distintos agentes ClNa 0.6M, SDS 2% y SDS-ME 5% fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12.5 %. Las muestras fueron tratadas de acuerdo con el método de Hames (2% SDS, 5% ME y 0.002% de azul bromofenol) calentadas 5 minutos a 100°C y posteriormente centrifugadas a 10.000 G durante un minuto. Alícuotas de 1 µl que contenían 1 mg/ml se aplicaron a los geles. Las bandas de cadena pesada de miosina y actina fueron analizadas en un analizador de imagen obteniéndose los valores de densidad óptica integrada (DOI).

### 1.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN DE LOS EXTRACTOS SOLUBLES.

El extracto proteico obtenido tras el tratamiento con ClNa (sobrenadante S<sub>1</sub>) así como las fracciones solubles S<sub>2</sub> y S<sub>3</sub> obtenidas tras el tratamiento de P<sub>1</sub> con SDS y P<sub>2</sub> con SDS y ME fueron estudiadas por tinción negativa con acetato de uranilo. Las soluciones de proteínas extraídas fueron diluidas a una concentración de 0.15 mg/ml usando un tampón 0.45M ClK, 0.05M tris-ClH PH 7.2. Este tampón reduce la formación de precipitados entre el acetato de uranilo y el fosfato presente en la solución empleada para la extracción.

Una gota de 10 µl de la solución de proteína diluida fue depositada durante un minuto sobre una rejilla cubierta por formvar-carbón a la cual se aplicó previamente una descarga iónica "glow discharge" con la finalidad de hacer la película de formvar-carbón hidrofílica, evitando de esta manera la difusión desigual de las proteínas que tiene lugar cuando éstas se depositan sobre soportes hidrofóbicos. El exceso de proteína fue eliminado con un papel de filtro y a continuación se añadió 10µl de acetato de uranilo al 1%. Después de 20 segundos el exceso de acetato de uranilo fue retirado con papel de filtro dejándose secar la rejilla al aire. Un mínimo de 3 rejillas fueron preparadas para cada muestra.

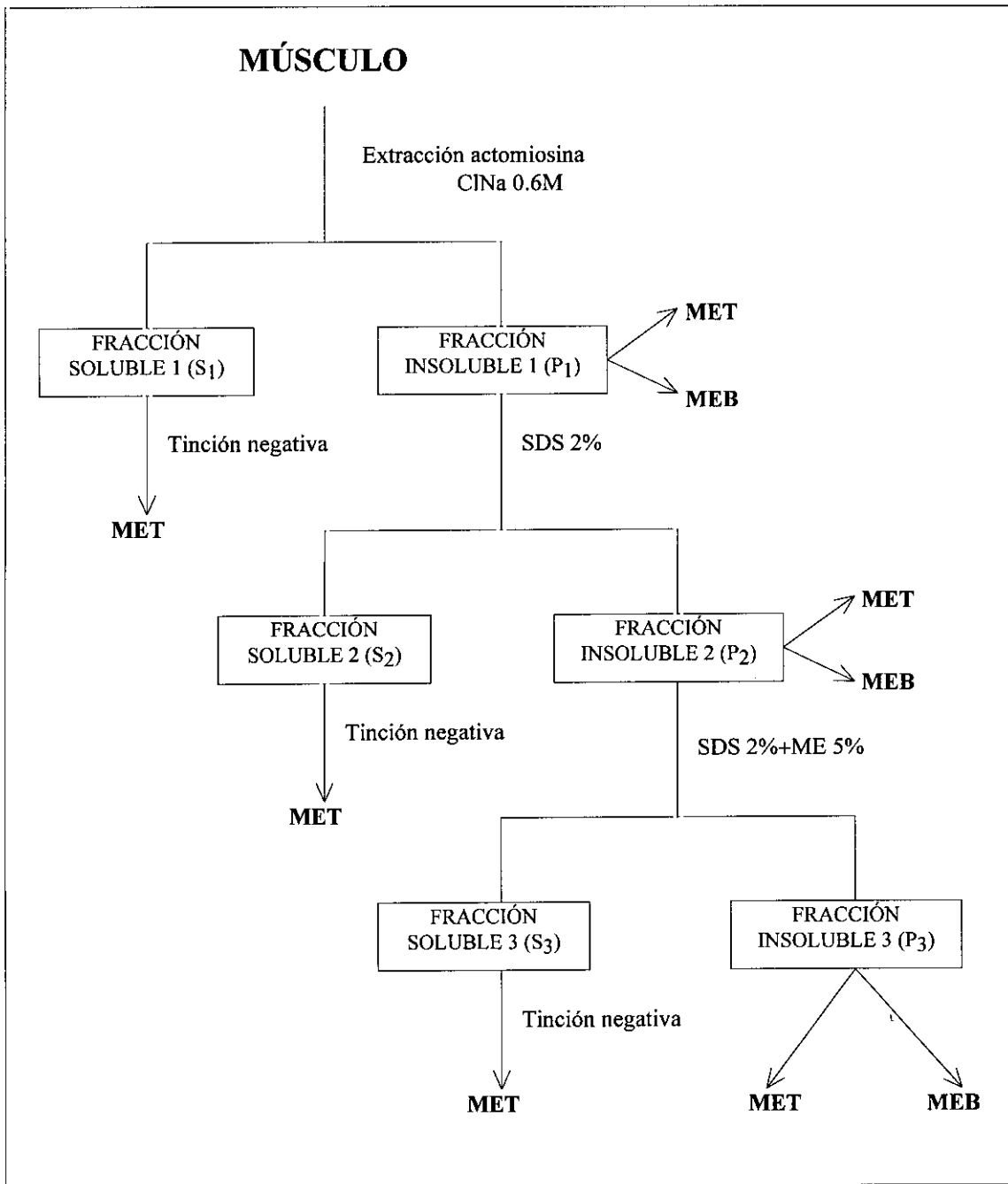
#### 1.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE LAS FRACCIONES INSOLUBLES.

##### **Microscopía electrónica de barrido.**

Fragmentos de los precipitados P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> y P<sub>3</sub> fueron fijados en una solución de glutaraldehído al 2.5% en tampón fosfato (2 horas, 4°C), postfijados en tetróxido de osmio al 1% (1 hora y media), lavados en agua destilada y deshidratados gradualmente en concentraciones crecientes de acetona. A continuación se hizo punto crítico para sustituir el agua por CO<sub>2</sub>. Posteriormente se metalizó la muestra recubriéndola con una capa de oro que la hace más conductora. Las micrografías fueron tomadas en un microscopio Jeol JSM 6400.

##### **Microscopía electrónica de transmisión.**

Fragmentos de las fracciones insolubles P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> y P<sub>3</sub> fueron fijadas en una solución de glutaraldehído al 2.5% en tampón fosfato (4 horas, 4°C), postfijadas en tetróxido de osmio al 1 % (1 hora y media), lavadas en agua destilada, deshidratadas en concentraciones crecientes de acetona e incluidas en Epon. Secciones ultrafinas fueron obtenidas en un ultramicrotomo Reichert-Jung modelo E y posteriormente teñidas con acetato de uranilo al 2% en agua destilada y citrato de plomo (Reynolds).



**FIGURA V.** Esquema que representa el protocolo seguido en la obtención y el procesamiento posterior de las fracciones solubles e insolubles en C1Na y los distintos agentes solubilizantes para su estudio por microscopía electrónica de barrido y transmisión.

## **2. ESTUDIO MORFOLÓGICO Y MORFOMÉTRICO.**

### **2.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.**

Se tomaron fragmentos de músculo rectangulares (3×2 mm) entre miotomos una vez que éste se había descongelado a temperatura ambiente. En estos fragmentos se apreciaba la disposición de las fibras musculares lo que facilita la orientación de éstas, influyendo posteriormente en la obtención de secciones bien orientadas. Un mínimo de dos individuos fueron procesados para cada uno de los tiempos y temperaturas de almacenamiento objeto de estudio en ambas especies. Los fragmentos fueron fijados en glutaraldehído al 2.5% en tampón fosfato PH 7.2 (4 horas 4°C), postfijados en tetróxido de osmio al 1% en agua destilada (1 hora y media), lavados en agua destilada, deshidratados de modo gradual en acetona y finalmente incluidas en Epon. Secciones ultrafinas (70nm) fueron obtenidas con el mismo ultramicrotomo que se ha detallado en el apartado anterior, teñidas con acetato de uranilo al 2% seguidas por citrato de plomo (Reynolds).

### **2.2. ESTUDIO MORFOMÉTRICO.**

El estudio morfométrico se llevó a cabo utilizando el programa Videoplan (Kontron Bildanalyse, Alemania). Este programa permite cuantificar parámetros geométricos de imágenes así como evaluar los datos medidos de acuerdo a las necesidades del usuario. En nuestros estudios se utilizaron micrografías tomadas a partir de secciones transversales de músculo bien orientadas. En ellas se midieron 500 hexágonos en un total de 30 miofibrillas para cada uno de los estadios objeto de estudio obteniendo el valor medio de excentricidad. Se establecieron comparaciones estadísticas de las medidas de excentricidad entre cada dos grupos (tiempo de almacenamiento) para cada una de las temperaturas de conservación aplicando un análisis de la varianza (test de Scheffe).

### 3. INMUNOHISTOQUÍMICA.

#### 3.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

La inclusión se realizó utilizando como resina Lowicryl K<sub>4</sub>M. Piezas cúbicas de aproximadamente 1 mm de arista fueron tomadas de músculo de bacalao almacenado a -20°C, así como de músculo control (congelado sin almacenar) que habían sido previamente descongelados a temperatura ambiente. Los fragmentos de músculo fueron fijados en una solución de paraformaldehído 4% y glutaraldehído 0.1% en PBS PH 7.2 (2 horas , 4°C). Dos ejemplares fueron procesados para cada uno de los tiempos de almacenamiento en congelación. Músculo de ratón (Balb C ) fue asimismo procesado siguiendo el mismo protocolo para ser utilizado como control positivo. Después del lavado de las muestras en PBS se procedió a su deshidratación que se llevó a cabo a bajas temperaturas, utilizando el método de sustitución progresiva a temperatura descendente (PLT). Este procedimiento implica la reducción gradual de la temperatura mientras la concentración del agente deshidratante incrementa. En este estudio se llevó a cabo la deshidratación en etanol en el interior de congeladores tal y como se detalla a continuación: Etanol 30% (0°C 30 minutos) → Etanol 50% (-20°C 1 hora) → Etanol 70% (-35°C 1 hora) → Etanol 95% (-35°C 1 hora) → Etanol 100% (-35°C 1 hora) → Etanol 100% (-35°C 1 hora).

A continuación se llevó a cabo la infiltración a -20°C en mezclas de resina etanol: 1:1 (1 hora) → 2:1 (1 hora) → resina pura (1 hora) → resina pura (toda la noche).

La polimerización de la resina se llevó a cabo en una cámara con una fuente de luz ultravioleta refrigerada a -20°C. Las muestras fueron situadas en cápsulas de plástico que se llenaron hasta el borde para minimizar la cantidad de aire existente sobre la resina y permanecieron en la cámara 48 horas bajo luz ultravioleta a -20°C terminando la polimerización con luz ultravioleta a temperatura ambiente durante 48 horas más.

Secciones ultrafinas fueron depositadas en rejillas de níquel cubiertas con una película de Formvar para posteriormente llevar a cabo un estudio inmunohistoquímico utilizando la técnica del oro coloidal.



### 3.2. PROCEDIMIENTO INMUNOHISTOQUÍMICO.

En primer lugar se llevó a cabo el bloqueo de las uniones inespecíficas. Las rejillas fueron transferidas a gotas que contenían una solución de suero normal de ternera (NCS) 1% y glicina 0.02M (que bloquea los grupos aldehídos libres) en PBS durante 10 minutos. El suero fue previamente descomplementado calentándolo a 50°C 30 minutos. A continuación se incubaron las rejillas con un anticuerpo monoclonal contra cadena pesada de miosina de músculo esquelético (IgG1) desarrollado en ratón (Sigma)<sup>®</sup> diluido en la solución de NCS y glicina (1:100) durante 3 horas. En cada inmunodetección se incluyeron como control positivo músculo de ratón y como negativo secciones de músculo en las que se omitió el primer anticuerpo. Después de sucesivos lavados en PBS las rejillas fueron transferidas a una solución que contenía una IgG de conejo antiratón (Sigma)<sup>®</sup> diluida en la solución de NCS-glicina (1:50) durante 1 hora. El fundamento de utilizar este paso intermedio antes de la aplicación de la proteína A estriba en que esta proteína reacciona muy bien con IgsG de conejo, mientras que en el caso del ratón sólo lo hace con IgsG específicas (IgG 2A o 2B). Después de varios lavados en PBS las rejillas fueron transferidas a una solución de Proteína A (Sigma) diluida en la solución de NCS-glicina (1:1000) durante una hora. La proteína A llevaba asociada partículas de oro coloidal de 10 nm. Después de varios lavados en PBS los cortes fueron lavados en agua bidestilada que elimina todos los iones fosfato antes de la reacción con el acetato de uranilo, evitando así la formación de precipitados. Los cortes fueron finalmente contrastados en acetato de uranilo 2% (30 minutos), lavados y dejados secar al aire. Todo el proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente en el interior de una cámara húmeda transfiriendo las rejillas a gotas de 10 µl que contenían la solución correspondiente. En todas las incubaciones se incluyeron un mínimo de dos rejillas pertenecientes a cada uno de los estadios objeto de estudio.

### 3.3. ANÁLISIS CUANTITATIVO.

El estudio cuantitativo se llevó a cabo sobre micrografías con un aumento final entre 30.000 y 50.000 en las que fueron analizados un mínimo de 100 sarcómeros para cada grupo objeto de estudio. En cada sarcómero se evaluó la densidad de marcaje en la

banda A expresado como n° de partículas de oro/ $\mu\text{m}^2$ . En el conteaje de partículas se tuvieron en cuenta los clusters. Debido a que el procedimiento de marcaje se llevó a cabo en dos pasos, la IgG que reacciona contra la cadena pesada de miosina puede unir más de una IgG utilizada como puente a cada una de la cual se une una partícula de oro. Por este motivo se definió el cluster como una agrupación de partículas de oro cuya distancia entre sí fuera inferior a 20nm. Los clusters fueron contabilizados como una única partícula de oro coloidal para de esta manera dar un valor real del número de antígenos reconocidos por el anticuerpo. Los cálculos de áreas así como el conteaje de partículas se realizó utilizando el programa Videoplan (Kontron-Bildanalyse, Alemania). Diferencias significativas en la densidad de marcaje entre los distintos tiempos de almacenamiento en congelación fueron determinados por análisis de la varianza (ANOVA, test de Scheffe).

#### **4. MÉTODO AUTORADIOGRÁFICO.**

##### **4.1. ADMINISTRACIÓN DEL COMPUESTO RADIACTIVO.**

El músculo de bacalao fue inyectado con formaldehído marcado con  $\text{C}^{14}$  (0.0125 ml de formadehído 21 M con una actividad 457 K bq). Posteriormente se mantuvo almacenado durante 5 meses a  $-10^\circ\text{C}$  con la finalidad de permitir la difusión del compuesto radiactivo. El músculo fue sometido a un proceso de extracción para la obtención de una fracción insoluble como se detalla a continuación sobre la que se realizó el estudio autorradiográfico.

Aproximadamente 10 gramos de muestra tomados en el punto de inyección y el tejido circundante fueron homogeneizados en 5 volúmenes de tampón fosfato 50 mM PH 7.5 usando un homogeneizador Omnimix. El residuo fue centrifugado a  $10 \times 10^3$  g durante 10 minutos a  $10^\circ\text{C}$  y de nuevo reextraído en 5 volúmenes del mismo buffer. A continuación el residuo fue extraído en 3 volúmenes de ClK 0.8M seguido por 2 volúmenes de ClK 0.8 M. Finalmente el residuo fue tratado con 5 volúmenes de SDS 2% en Tris 50mM PH 8 a  $95^\circ\text{C}$  durante 15 minutos. Después de la extracción con SDS las muestras fueron centrifugadas quedando un residuo insoluble. Se tomaron alícuotas de tal residuo para determinar el contenido de  $\text{C}^{14}$  tras su digestión en álcali

detectándose una actividad de 0.905 K<sub>Bq</sub>/g. Este residuo insoluble fue preparado y cedido por el grupo de Torry Research Station (Aberdeen).

#### **4.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS.**

Se tomaron piezas cúbicas de aproximadamente 2 mm de arista del residuo insoluble que posteriormente fueron fijadas en glutaraldehído al 2.5% en tampón fosfato, postfijadas en tetróxido de osmio al 1%, deshidratadas en concentraciones crecientes de acetona y finalmente incluidas en Epon.

#### **4.3. AUTORADIOGRAFÍA A MICROSCOPIA ÓPTICA.**

Se depositaron secciones semifinas de 1  $\mu$ m a 2.5  $\mu$ m del extremo de portas desengrasados en una solución alcohol-CIH 1%. Las secciones semifinas fueron cubiertas con una emulsión Ilford K5 diluida en agua destilada introduciendo los portas verticalmente en un frasco de Coplin que contenía dicha emulsión. Posteriormente los portas se dejaron secar una noche a temperatura ambiente en oscuridad con un grado de inclinación de 80° antes de guardarse en cajas de Clay-Adams de plástico específicas para esta técnica. Dentro de las cajas se introdujo pentóxido de fósforo que por su gran capacidad higroscópica permite reducir drásticamente la humedad y evitar el posible desarrollo de colonias de bacterias. Los cortes emulsionados permanecieron en oscuridad en el interior de las cajas durante varias semanas a temperatura ambiente. A intervalos de tiempo de dos semanas se fue llevando a cabo el revelado de los cortes. Para ello las secciones se introdujeron de forma secuencial en cubetas que contenían revelador Kodak D-19 (17°C, 4 minutos), agua destilada, fijador hiposulfito sódico al 30% (30 minutos) y agua destilada. La aplicación de la emulsión y el proceso de revelado se llevaron a cabo en cuarto oscuro con luz roja. Después de 2 meses de exposición de los portas, se observó marcaje radiactivo en los cortes. Las secciones fueron teñidas con azul de Richardson, deshidratadas y montadas en Entellan. Las fotografías fueron obtenidas usando un fotomicroscopio Reichert- Jung (Diastar).

#### 4.4. AUTORADIOGRAFÍA A MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

Sobre portas limpios en alcohol-ClH y secos, se depositó una película de celoidina (solución de celoidina 2% en acetato de isoamilo) introduciendo los portas verticalmente en un vaso de Coplin que contenía dicha solución. A continuación se dejó secar y el proceso se repitió varias veces hasta conseguir una película de mayor grosor. Secciones ultrafinas (70 nm) se depositaron sobre dichos portas cubiertos con la película de celoidina. Las secciones fueron teñidas introduciendo los portas en una solución de acetato de uranilo seguido por citrato de plomo (Reynolds). Una vez secas, las secciones situadas todavía sobre la película de celoidina asociada al porta fueron sombreadas con carbón y posteriormente cubiertas por la emulsión L4 Ilford diluida en agua destilada, dejadas secar durante toda la noche y guardadas en cajas de Clay Adams con pentóxido de fósforo siguiendo el mismo protocolo que en la autorradiografía a microscopía óptica. Tras una exposición de varias semanas se llevó a cabo de forma sistemática el revelado de los cortes siguiendo la secuencia que se detalla a continuación: Revelador microdol (17°C, 4 minutos)→ agua destilada→ Fijador Hiposulfito sódico 30% (30 minutos)→.agua destilada (2 baños de 10 minutos).

Las películas de celoidina conteniendo los cortes se separaron de los portas quedando flotando en la superficie de un cristalizador con agua destilada. Los cortes fueron recogidos a partir de esta película mediante el uso de una lupa en rejillas de cobre. La película de celoidina fue disuelta aplicando gotas de acetato de isoamilo sobre las rejillas.

#### 5. OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA.

La totalidad de las micrografías para microscopía electrónica de transmisión en las diferentes técnicas utilizadas fueron tomadas en un microscopio Zeiss 902 (Carl Zeiss, Alemania) que lleva incorporado un filtro de energía de tipo Canstaing-Henry-Ottensmeyer. Para comprender la función del filtro de energía se debe explicar previamente los fundamentos de la aberración cromática.

La aberración cromática surge como resultado de la existencia de electrones con distintas longitudes de onda. Estos aparecen como resultado de fluctuaciones en la alta tensión, la variación de la energía de los electrones emitidos por el filamento, pero fundamentalmente como consecuencia de las interacciones inelásticas de los electrones del haz con la muestra que conlleva a la pérdida de energía de los electrones incidentes. Todas estas causas hacen que aparezcan electrones con distinta energía y por tanto con distinta longitud de onda que no son focalizados en el mismo punto por la lente objetivo. El cambio de foco producido por este motivo viene determinado por la expresión  $\Delta\varepsilon=Cc\Delta E/E$ , donde E es la energía de los electrones,  $\Delta E$  es la pérdida de energía que experimenta el electrón cuando interacciona con la muestra y Cc es la constante de aberración cromática de las lentes.

Los efectos de la aberración cromática pueden ser minimizados por medio del uso de filtros de energía de electrones dispersados. El microscopio electrónico utilizado en nuestro estudio lleva incorporado un filtro de tipo Castaing-Henry-Ottensmeyer. Este filtro consiste en un sistema prisma-espejo-prisma electromagnéticos que permite separar los electrones en función de su longitud de onda. La apertura colocada a la salida del segundo prisma selecciona los electrones que no han sufrido cambios en su energía eliminando el resto lo que conduce a una mejora notable de las imágenes y un aumento del contraste.

## **RESULTADOS.**

### **1. ESTUDIO DE EXTRACTOS SOLUBLES Y FRACCIONES INSOLUBLES DE BACALAO (*Gadus morhua*).**

Las proteínas miofibrilares fueron extraídas de músculo en forma de actomiosina con soluciones salinas 0.6M aunque en los perfiles electroforéticos de tales extractos ha sido demostrada además la presencia de tropomiosina, troponina y otras proteínas entre las que cabe destacar la proteína C y  $\alpha$ -actinina. La extracción fue llevada a cabo en muestras de músculo de bacalao en todas las temperaturas consideradas a las 0, 5, 14, 22, 36, 49 y 63 semanas de almacenamiento en congelación. Siguiendo el esquema detallado en la figura V los residuos insolubles en ClNa ( $P_1$ ) fueron tratados con SDS que rompe uniones de tipo secundario, y permite la obtención de una segunda fracción soluble ( $S_2$ ). Los residuos insolubles en este agente ( $P_2$ ) fueron tratados con SDS y ME con la finalidad de reducir los puentes disulfuro obteniendo una tercera fracción soluble ( $S_3$ ). En el caso en que la solubilización de  $P_2$  con ME no fue efectiva se obtuvo una fracción  $P_3$  a la cual junto con el resto de las fracciones solubles e insolubles se sometió a un estudio por microscopía electrónica, cuyos resultados se irán describiendo.

### 1.1. Músculo picado almacenado a -20°C.

El tratamiento del músculo congelado sin almacenar (control) con una solución 0.6 M ClNa consigue la extracción de un elevado porcentaje de actomiosina como muestran los datos bioquímicos recogidos en la figura VI y el hecho de que no queda ninguna fracción insoluble tras dicho tratamiento.

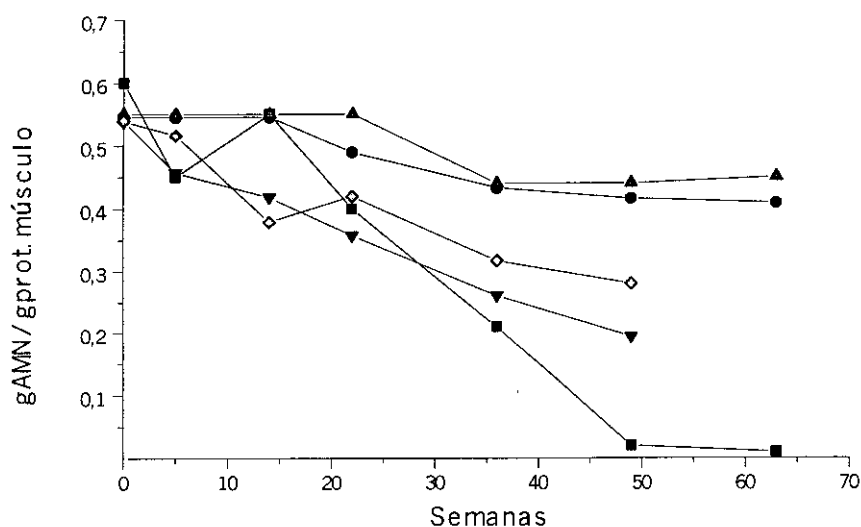


FIGURA VI. Evolución de la extractabilidad de actomiosina de las fracciones solubles  $S_1$ .

● Bacalao -20°C      ▲ Bacalao -30°C      ▼ Merluza -20°C  
 ◆ Merluza -30°C      ■ Músculo picado bacalao -20°C.

En la tinción negativa del extracto  $S_1$  obtenido de músculo picado control, la actomiosina no muestra la estructura en punta de flecha descrita por Huxley (1963) apareciendo como filamentos de F-actina no decorados. Estos filamentos se disponen agregados y frecuentemente interconectados paralelamente alternando con otros filamentos libres (figura 1). Microagregados de naturaleza proteica pueden visualizarse en el extracto en muchas ocasiones asociados a filamentos de actina. Estos agregados están constituidos por acúmulos que se asemejan a agregados de moléculas de miosina en estudios por microscopía electrónica llevados a cabo por Sharp y Offer (1992).

Hacia la semana 22 de almacenamiento en congelación el músculo experimenta una disminución significativa de la extractabilidad en ClNa con respecto al control (figura VI) y la aparición de una fracción insoluble suficiente para su estudio por microscopía electrónica. Los estudios llevados a cabo por microscopía electrónica de barrido sirven como primera aproximación para estudiar la evolución de dichos precipitados y confirmar los resultados bioquímicos. En el músculo almacenado 22 semanas apenas pueden ser identificados restos musculares dado que estos presentan un elevado grado de disgregación como se observa en la figura 2. A partir de este estadio se produce una disminución significativa de extractabilidad (figura VI) que se traduce en un aumento del número y grado de integridad de los restos musculares como se observa en la figura 3 perteneciente a la fracción insoluble  $P_1$  obtenida de músculo almacenado 63 semanas.

La fracción soluble en ClNa en músculo almacenado 22 semanas muestra pocos cambios con respecto al sobrenadante obtenido del músculo control.

La microscopía electrónica de transmisión de la fracción insoluble en cloruro sódico ( $P_1$ ) obtenida de dicho músculo muestra en sus restos musculares estructuras que vagamente recuerdan la organización característica de las miofibrillas. Los residuos sarcoméricos muestran restos proteicos formando parte de la banda A en los que trazas de línea Z apenas pueden ser identificados (figura 4). El residuo  $P_1$  resulta solubilizado en un elevado porcentaje tras su posterior tratamiento con SDS. Estos resultados dan idea de la escasa implicación de los enlaces de naturaleza covalente en el proceso de agregación del músculo picado en este estadio de almacenamiento.

En músculo almacenado 36 semanas el extracto soluble en sal  $S_1$  apenas muestra filamentos libres; estos presentan una mayor tendencia a aparecer entrecruzados formando ángulos de entre  $90-106^\circ$  así como agregados que se organizan formando estructuras incipientes en forma de anillo. En ambos tipos de organización y formando parte de ellas aparecen fragmentos proteicos en forma de microagregados semejantes a los observados en músculo control (figura 5a).



La fracción insoluble en sal  $P_1$  de músculo almacenado 36 semanas muestra una mayor organización en sus sarcómeros que en el músculo almacenado durante 22 semanas. Estas observaciones coinciden con una disminución significativa de la extractabilidad en sal con respecto al estadio anterior como se muestra en la figura VI. Un mayor número de restos proteicos quedan retenidos en la banda A. En algunos sarcómeros estos restos forman parte de estructuras que recuerdan filamentos gruesos. El material que atraviesa la zona H es escaso, lo que también confirma la escasa integridad de los filamentos gruesos. Anclados a una línea Z muy desorganizada aparecen restos de filamentos finos (figura 6a).

El tratamiento de la fracción insoluble  $P_1$  de músculo almacenado 36 semanas con SDS permite la extracción de parte de proteínas de la banda A y la desaparición de la línea Z así como de los filamentos finos anclados si bien parte del material queda retenido en la banda A de la fracción insoluble resultante  $P_2$  como se observa en la figura 6b.

Las proteínas extraídas de  $P_1$  por el SDS aparecen en el sobrenadante  $S_2$  formando agregados proteicos que se organizan originando estructuras en forma de anillo. Formando parte de estas estructuras se identifican microagregados que morfológicamente se corresponden con acúmulos proteicos atribuidos por su morfología a moléculas de miosina semejantes a los identificados en el sobrenadante  $S_1$  como se muestra en la figura 5b.

El tratamiento de  $P_2$  con SDS y ME permite extraer la mayoría de las proteínas sarcoméricas si bien queda una fracción insoluble  $P_3$  en cuyas miofibrillas se observan escasos restos proteicos formando parte de la banda A como se observa en la figura 6c. Las proteínas extraídas con el SDS y ME de  $P_2$  aparecen en el sobrenadante  $S_3$  formando parte de agregados como muestra la figura 5c.

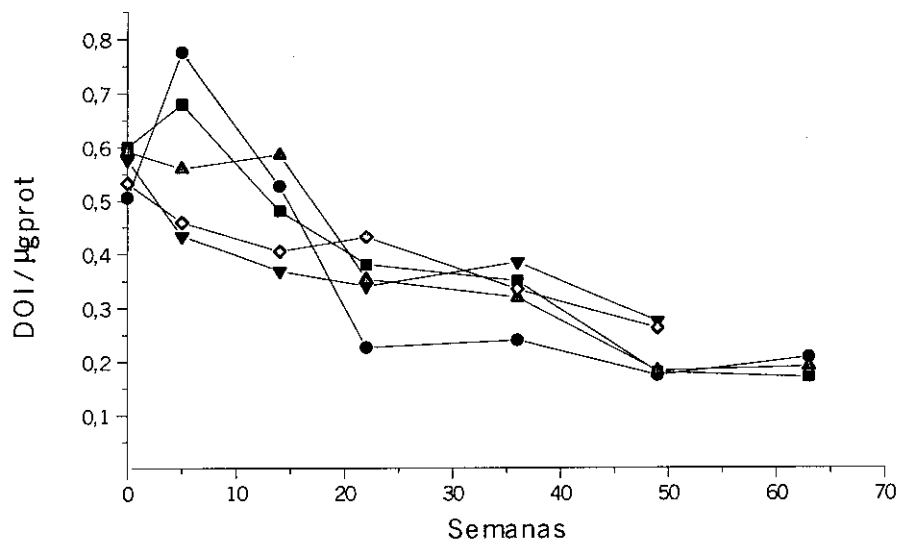
En músculo almacenado 63 semanas la fracción solubilizada por el ClNa ( $S_1$ ) muestra agregados de gran tamaño con estructuras en forma de anillo mejor definidas que en los estadios precedentes como se aprecia en la figura 7a. Estos agregados

aumentan en tamaño, datos que son corroborados por los estudios complementarios realizados por cromatografía de filtración en gel (del Mazo 1997). Son asimismo observados en dichos extractos, filamentos de actina individuales e interconectados entre sí bien paralelamente o formando ángulos de 90-106° así como acúmulos de morfología equivalente a agregados de moléculas de miosina.

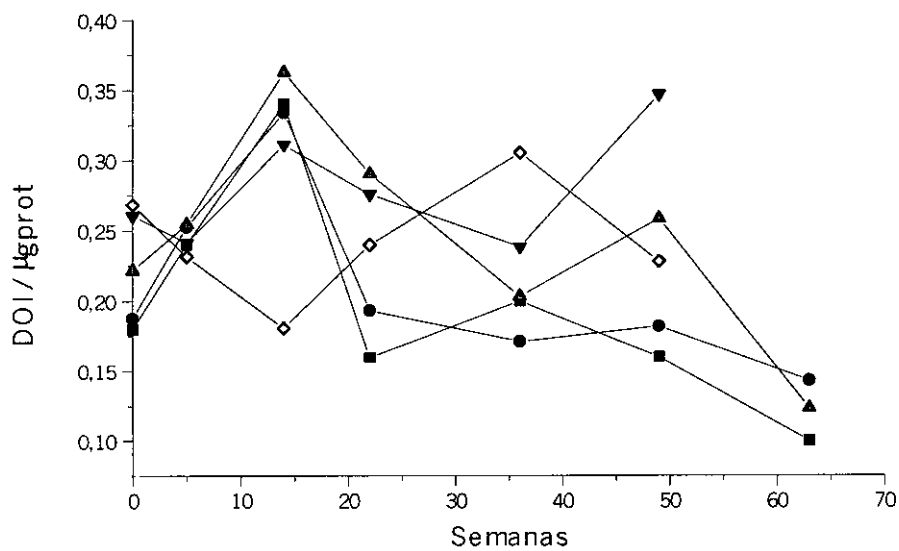
Las fibras musculares residuales que se encuentran en la fracción insoluble en sal  $P_1$  obtenida de músculo almacenado 63 semanas muestran estructuras mejor definidas que las presentes en estadios anteriores (figura 8a). En la banda A filamentos gruesos intactos aparecen atravesando la banda H. Los filamentos gruesos alternan con filamentos finos bien definidos que frecuentemente aparecen anclados a la línea Z que aparece más conservada que en los estadios precedentes. Algunos sarcómeros incluso exhiben una organización semejante a la propia de los sarcómeros que presentan las fibras musculares intactas. En la figura 8a se muestra un detalle de la banda A perteneciente a uno de estos sarcómeros en el cual se puede apreciar el grado de integridad de filamentos gruesos y finos.

Estas micrografías se correlacionan con los datos bioquímicos donde se observa que en la semana 63 prácticamente el 100% de la proteína no puede ser extraída del músculo tras su tratamiento con C1Na (figura VI).

Esta tendencia a que las estructuras musculares aparezcan intactas en  $P_1$  de manera más acentuada en estadios avanzados de congelación también se corresponde con los resultados bioquímicos que se obtuvieron por electroforesis. En las figuras VII y VIII se observa una disminución progresiva en función del tiempo de la cantidad de cadena pesada de miosina y de actina en los sobrenadantes  $S_1$  de los músculos extraídos con C1Na. En los últimos periodos de almacenamiento la disminución es además más evidente en el caso de la miosina que prácticamente no puede ser extraída de las fibras musculares.



**FIGURA VII.** Evolución de la cadena pesada de miosina por electroforesis (SDS-PAGE) de la fracción soluble en ClNa 0.6 M ( $S_1$ ).



**FIGURA VIII.** Evolución de la actina por electroforesis (SDS-PAGE) de la fracción soluble en ClNa 0.6M ( $S_1$ ).

● Bacalao -20°C      ▲ Bacalao -30°C      ▼ Merluza -20°C  
 ◆ Merluza -30°C      ■ Músculo picado bacalao -20°C

El tratamiento de  $P_1$  obtenido a las 63 semanas con SDS dejó un residuo  $P_2$  que fue finalmente tratado con SDS y ME. Las proteínas solubilizadas por estos agentes aparecen formando parte de agregados en los que predominan las estructuras en forma de anillo en las que pueden distinguirse estructuras filamentosas así como acúmulos proteicos de morfología semejante a agregados de miosina (figura 7b y 7c). La extracción llevada a cabo por estos agentes resulta ser menos efectiva que en el músculo almacenado 36 semanas dado que una gran cantidad de material de naturaleza proteica queda retenido formando parte de la banda A en los agregados  $P_2$  y  $P_3$  como muestran las figuras 8b y 8c respectivamente.

Los estudios preliminares llevados a cabo por microscopía electrónica de barrido confirman asimismo la evolución de los agregados  $P_3$ . Las micrografías obtenidas de músculo almacenado 63 semanas muestran la presencia de restos musculares que recuerdan estructuras musculares intactas como muestra la figura 9. El músculo almacenado 36 semanas presenta en el agregado  $P_3$  residuos musculares más laxos, resultado de una más efectiva extracción llevada a cabo por los agentes solubilizantes como muestra la figura 10.

Los agregados  $P_1$ ,  $P_2$  y  $P_3$  obtenidos de músculo almacenado 49 semanas presentan un estadio intermedio de extracción que los músculos almacenados 36 y 63 semanas, así como un estadio intermedio de agregación en los sobrenadantes de tal músculo.

Estos resultados sugieren un aumento progresivo del número de enlaces que no resultan afectados por el tratamiento con los agentes solubilizantes SDS y mercaptoetanol al que  $P_1$  fue sometido progresivamente y que permiten que en los últimos periodos de almacenamiento el precipitado  $P_3$  presente estructuras sarcoméricas más organizadas que las encontradas en estadios anteriores.

## **1.2. Músculo almacenado a $-20^{\circ}\text{C}$ .**

La evolución de los extractos proteicos en músculo almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  es equivalente a la observada en el músculo picado hasta la semana 22, estadio en que

aparece de forma significativa una fracción insoluble en CNa. La MET de dicha fracción  $P_1$  muestra una solubilización efectiva del músculo por el CNa ya que escasos restos proteicos pueden ser identificados alrededor de la banda H como muestra la figura 11. El tratamiento de este residuo con SDS permitió su completa solubilización.

A partir de la semana 22 los extractos solubles en sal ( $S_1$ ) muestran filamentos de actina con tendencia a aparecer entrecruzados formando ángulos entre  $90-106^\circ$  y agregados en los que son identificables estructuras en forma de anillo escasamente definidas, como muestra la figura 12a correspondiente al sobrenadante extraído de músculo almacenado 36 semanas. Fragmentos proteicos agregados entre sí así como asociados a los filamentos resultan extraídos que por su morfología son comparables a los restos identificados en músculo picado como agregados de la molécula de miosina.

La fracción insoluble en sal ( $P_1$ ) de músculo almacenado 36 semanas pone de manifiesto estructuras sarcoméricas algo más definidas que en el estadio anterior, en las que se identifican una mayor densidad de material en la banda A y la presencia de filamentos finos los cuales aparecen anclados a restos de línea Z (figura 13a).

Tras el tratamiento del agregado  $P_1$  de músculo almacenado 36 semanas con SDS la fracción soluble  $S_2$  resultante muestra agregados proteicos conformados por estructuras organizadas formando anillos como se observa en la figura 12b. La mayor parte de la proteína resulta extraída de  $P_1$  como muestran los escasos restos proteicos visualizados en el agregado  $P_2$  resultante (figura 13b). La solubilización parcial del agregado  $P_1$  por el SDS pone de manifiesto una mayor implicación de enlaces covalentes disulfuro en el proceso de agregación en este periodo de tiempo.

El tratamiento final de  $P_2$  con SDS y ME permitió la solubilización total del agregado. Las proteínas extraídas tras este tratamiento presentan el mismo tipo de estructuras que las identificadas en  $S_2$ .

La fracción  $S_1$  extraída por el CNa en los músculos almacenados 49 y 63 semanas muestra la actomiosina formando parte de agregados donde predominan las estructuras en forma de anillo con fragmentos proteicos asociados (figura 14a). La

fracción insoluble en CINa ( $P_1$ ) de estos músculos muestra estructuras sarcoméricas escasamente definidas frente a las encontradas en el músculo picado en estos periodos de tiempo especialmente en lo referente a la banda A, puesto que aun teniendo en cuenta los sarcómeros en los que la extracción fue menos efectiva, los filamentos gruesos apenas pueden ser identificados como se observa en la figura 15a perteneciente a un precipitado  $P_1$  obtenido en la semana 63 frente a la figura 8a correspondiente a músculo picado en este periodo de tiempo. Estas imágenes son corroboradas por los datos bioquímicos que ponen de manifiesto unos elevados valores de extractabilidad respecto a los obtenidos en músculo picado (figura VI).

En las fracciones insolubles en sal correspondientes a músculos almacenados 49 y 63 semanas (figura 15a) las miofibrillas muestran bandas A de una densidad y organización morfológica ligeramente superior a la encontrada en el agregado  $P_1$  del músculo almacenado 36 semanas (figura 13 a). Esta escasa diferencia en las estructuras morfológicas encontradas en los agregados  $P_1$  en las semanas 36, 49 y 63 tienen su correspondencia con los datos bioquímicos mostrados en la figura VI en la que se observan escasas diferencias en los valores de extractabilidad en los tres estadios mencionados. Asimismo estos datos aparecen confirmados por los estudios electroforéticos donde tampoco son detectables cambios significativos en la proporción de cadena pesada de miosina y de actina extraídas en CINa (figuras VII y VIII).

Tras el tratamiento de  $P_1$  con SDS queda un residuo insoluble  $P_2$  cuyo tratamiento final con SDS y ME todavía deja un residuo  $P_3$ . Los restos miofibrilares presentes en las fracciones insolubles  $P_2$  y  $P_3$  muestran bandas A de elevada densidad especialmente las encontradas en  $P_3$  de modo similar a la evolución observada en músculo picado, lo que sugiere una mayor incidencia de enlaces de naturaleza covalente disulfuro y no disulfuro. (figuras 15b y 15c). Los extractos  $S_2$  y  $S_3$  solubilizados con estos agentes muestran agregados proteicos organizados en anillos (figura 14b).

### 1.3. Músculo almacenado a $-30^\circ\text{C}$ .

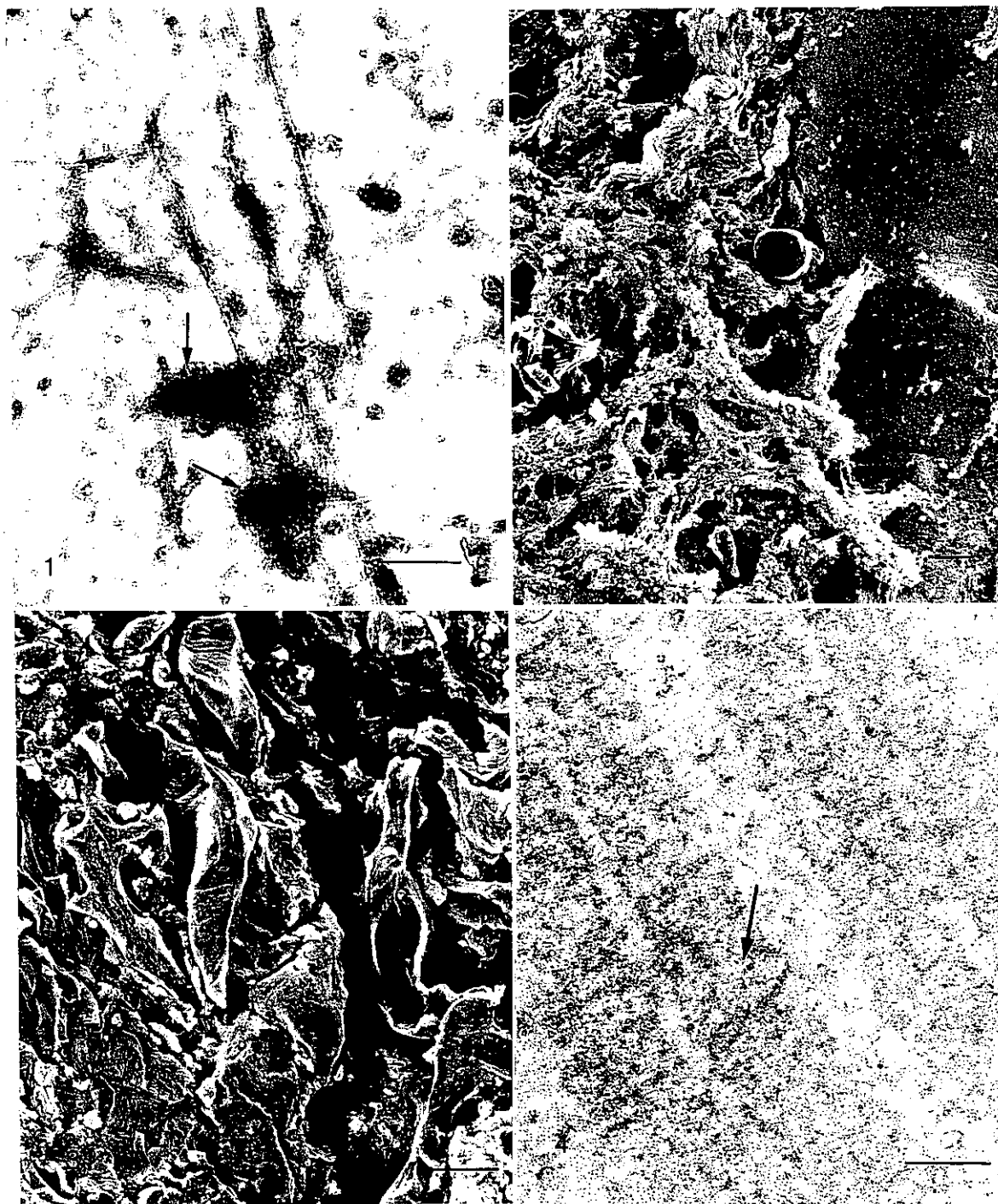
Los valores de extractabilidad en músculo almacenado a  $-30^\circ\text{C}$  en las primeras

semanas son equivalentes a los obtenidos en músculo de bacalao almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  (figura VI), obteniéndose asimismo una fracción insoluble en sal significativa a partir de la semana 22.

Las miofibrillas residuales de la fracción insoluble  $P_1$  obtenidas en las semanas 22 muestran escasos restos de proteínas alrededor de la banda H coincidiendo con los elevados valores de extractabilidad mostrados en la figura VI (figura 16).

En la semana 36 la mayoría de proteínas aparecen formando parte de la fracción soluble  $S_1$  donde son evidentes signos de agregación, tanto en los filamentos de actina que forman parte de agregados en forma de anillo, como en acúmulos proteicos que aparecen libres o asociados a ellos. No obstante, pueden ser identificados filamentos de actina libres entre los agregados (figura 17a). La fracción insoluble en sal  $P_1$  muestra una densidad de material semejante al encontrado a las 22. Esta fracción insoluble tras su tratamiento con SDS resulta solubilizada en su totalidad. Las proteínas extraídas con este agente aparecen agregadas en  $S_2$  tal y como se muestra en la figura 17b.

En las semanas 49 y 63 el CINA extrae un elevado porcentaje de actomiosina (figura VI). La tinción negativa del extracto soluble muestra un mayor grado de agregación entre las proteínas extraídas que en el estadio anterior. Estos aparecen formando parte de agregados como muestra la figura 19a. La MET de la fracción insoluble ( $P_1$ ) muestra bandas A con escasa densidad de material retenido en ellas en este periodo de tiempo como se observa en la figura 20a. Parte de proteínas del agregado  $P_1$  resultan extraídas por el SDS como muestra la figura 20b correspondiente al agregado  $P_2$  que muestra escasa densidad de material formando parte de la banda A. El tratamiento de dicho agregado con SDS y ME lo solubiliza por completo. Las proteínas solubilizadas por dichos agentes de forma secuencial (SDS y SDS+ME) presentan el aspecto morfológico mostrado en la figura 19b. En todos los estadios objeto de estudio el agregado  $P_2$  resulta efectivamente solubilizado tras su tratamiento con SDS y ME sin que ningún agregado  $P_3$  quedara como residuo. Estos resultados dan idea de la escasa participación de enlaces covalentes en la agregación de esta especie a la temperatura y tiempos de almacenamiento considerados.



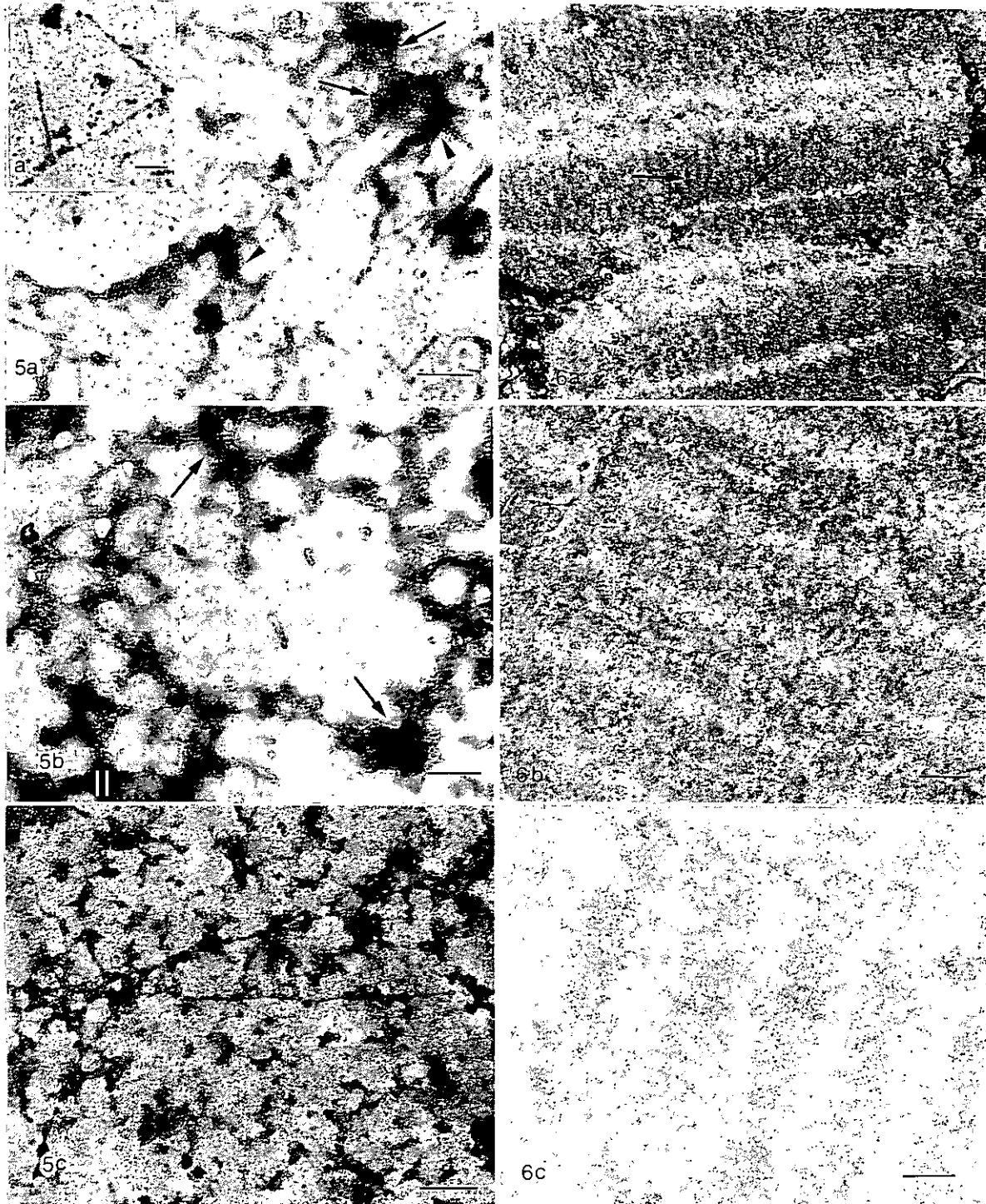
**FIGURA 1.** Tinción negativa del extracto soluble en C1Na obtenido de músculo picado de bacalao control. Los filamentos de actina aparecen interconectados entre sí. Se observan acúmulos proteicos de morfología semejante a los descritos como oligómeros de miosina (→). Barra 0.6µm.

**FIGURA 2.** Micrografía de la fracción insoluble en C1Na obtenida de músculo picado de bacalao almacenado 22 semanas. Los restos musculares muestran elevado grado de disgregación. Barra 10µm.

**FIGURA 3.** Micrografía de barrido de la fracción insoluble en C1Na de músculo picado de bacalao a las 63 semanas. Obsérvese el elevado número y grado de integridad de los restos musculares. Barra 50µm.

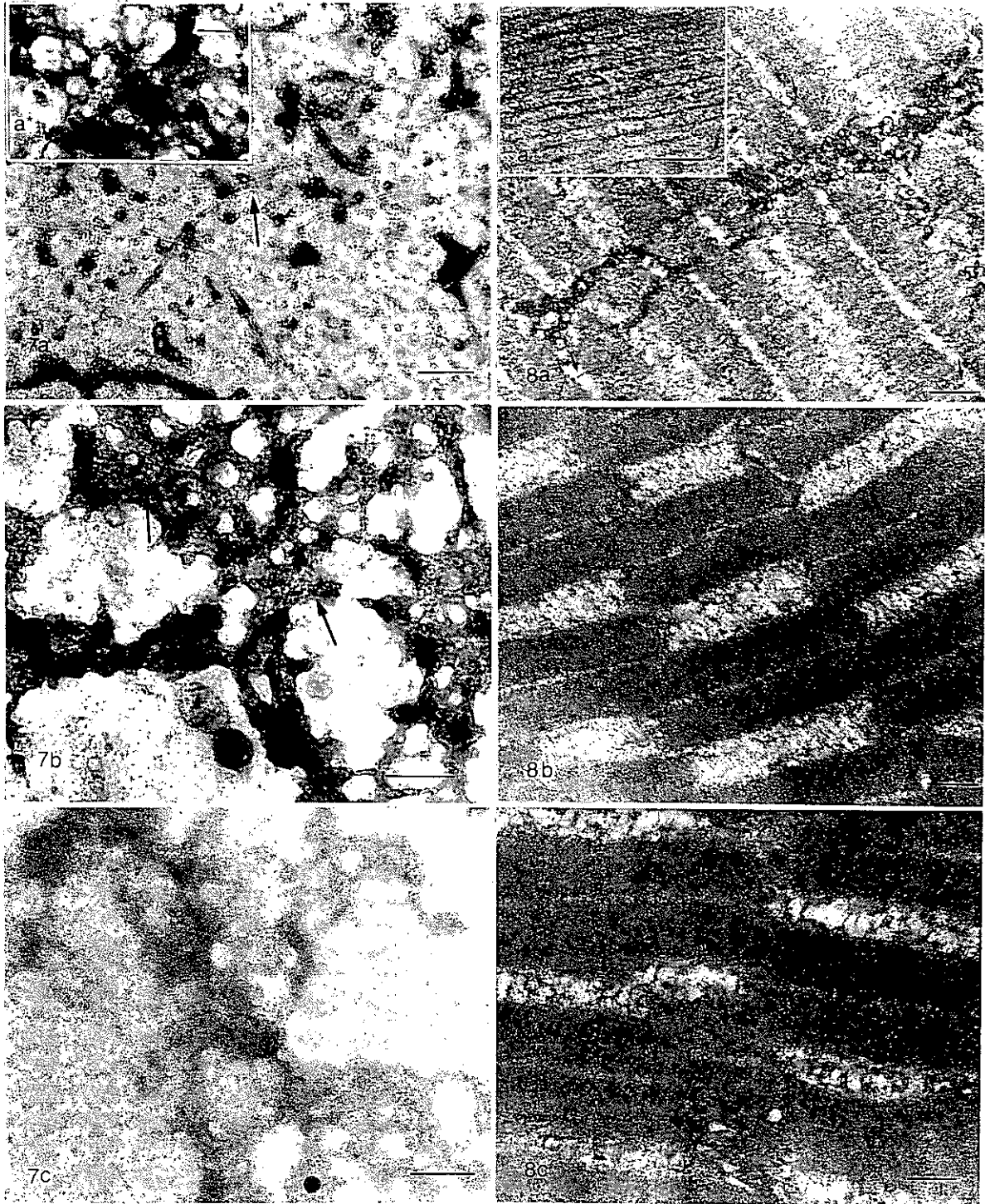
**FIGURA 4.** Micrografía de la fracción insoluble en C1Na de músculo picado almacenado a -20°C 22 semanas. Las proteínas no extraídas se organizan en restos de banda A (→). Barra 0.3µm.





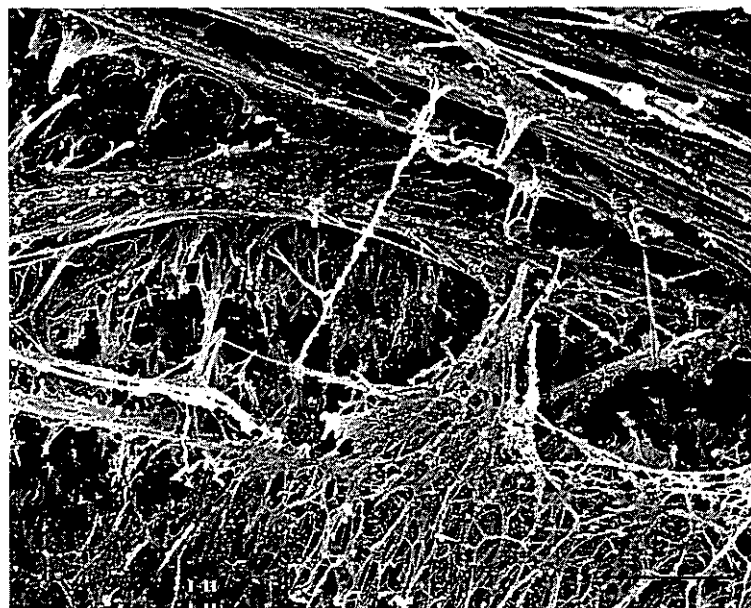
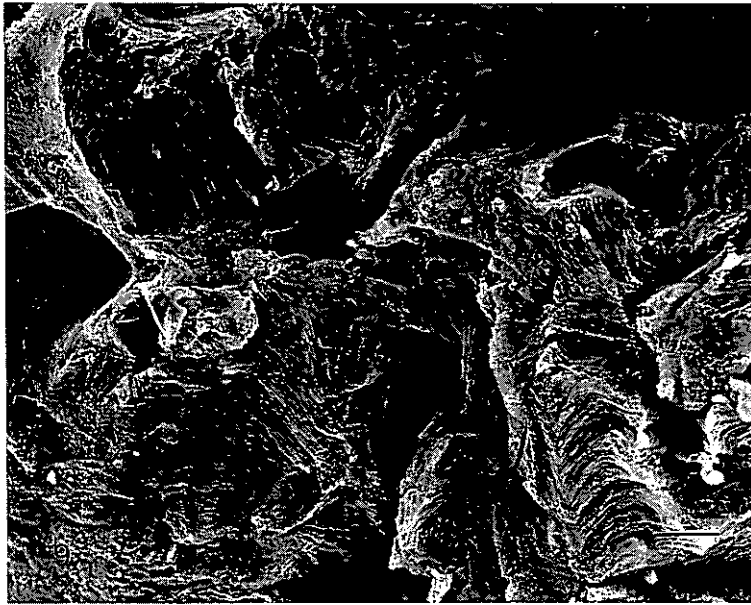
**FIGURA 5.** Extractos solubles de músculo picado de bacalao (-20°C) almacenado 36 semanas. **a)** Fracción soluble en CINa ( $S_1$ ). Filamentos de actina y fragmentos proteicos equivalentes a agregados de miosina ( $\rightarrow$ ) se organizan en estructuras incipientes en anillo ( $\blacktriangledown$ ). Barra 0.6  $\mu\text{m}$ . **a\*)** Filamentos de actina aparecen frecuentemente conectados con ángulos de 90-106°. Barra 0.4  $\mu\text{m}$ . **b)** Fracción soluble en SDS ( $S_2$ ). Barra 0.4  $\mu\text{m}$ . **c)** Fracción soluble en SDS+ME ( $S_3$ ) Barra 0.15  $\mu\text{m}$ . En los sobrenadantes  $S_2$  y  $S_3$  destaca la presencia de estructuras en anillo y acúmulos proteicos globulares ( $\rightarrow$ ).

**FIGURA 6.** Micrografías de las fracciones insolubles de músculo picado de bacalao almacenado 36 semanas. **a)** Fracción insoluble en CINa ( $P_1$ ). En el material proteico residual de la banda A se identifican filamentos gruesos ( $\rightarrow$ ). Barra 0.4  $\mu\text{m}$ . **b)** Fracción insoluble en SDS ( $P_2$ ). Barra 0.4  $\mu\text{m}$ . **c)** Fracción insoluble en SDS +ME ( $P_3$ ). Obsérvese la escasez de restos proteicos en la banda A. Barra 0.4  $\mu\text{m}$ .



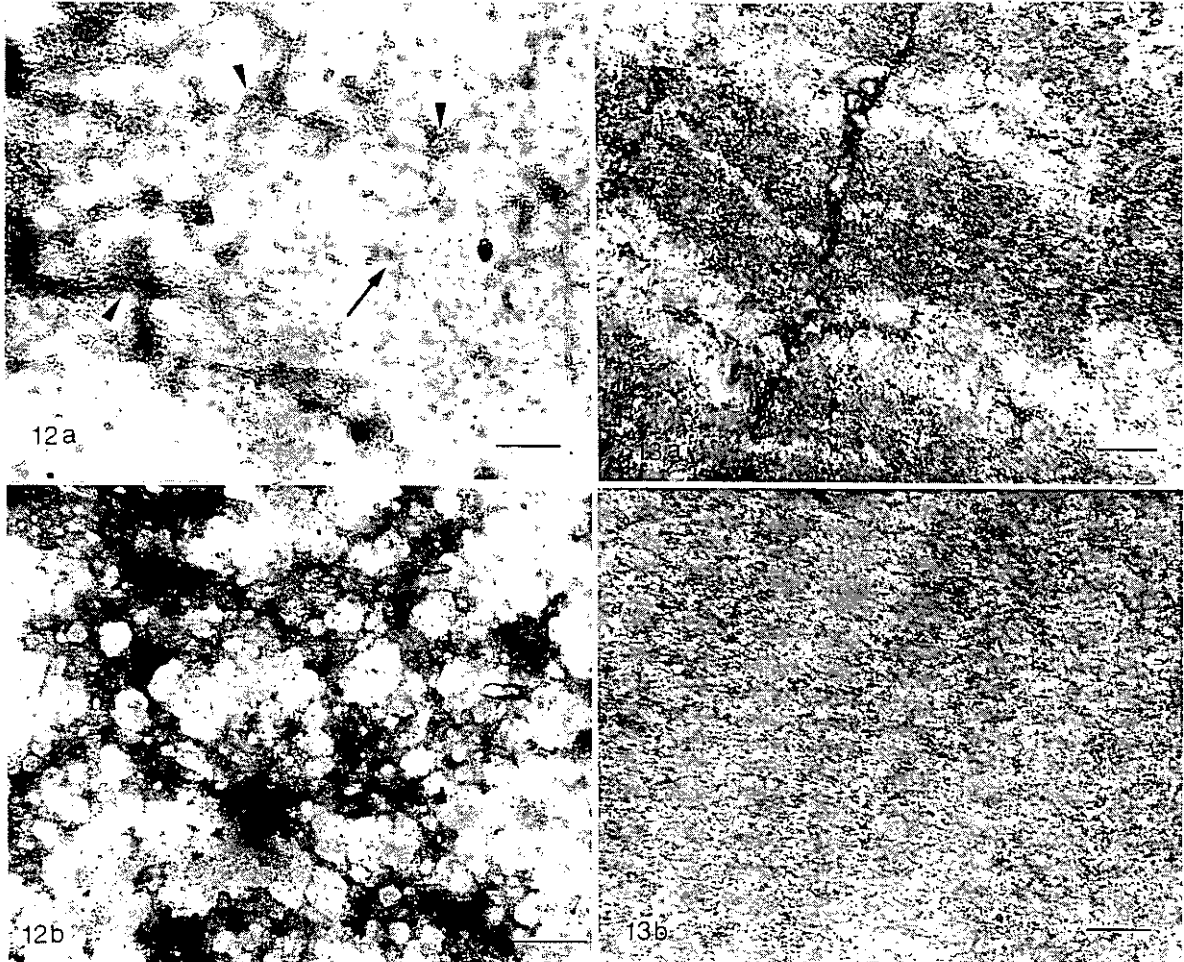
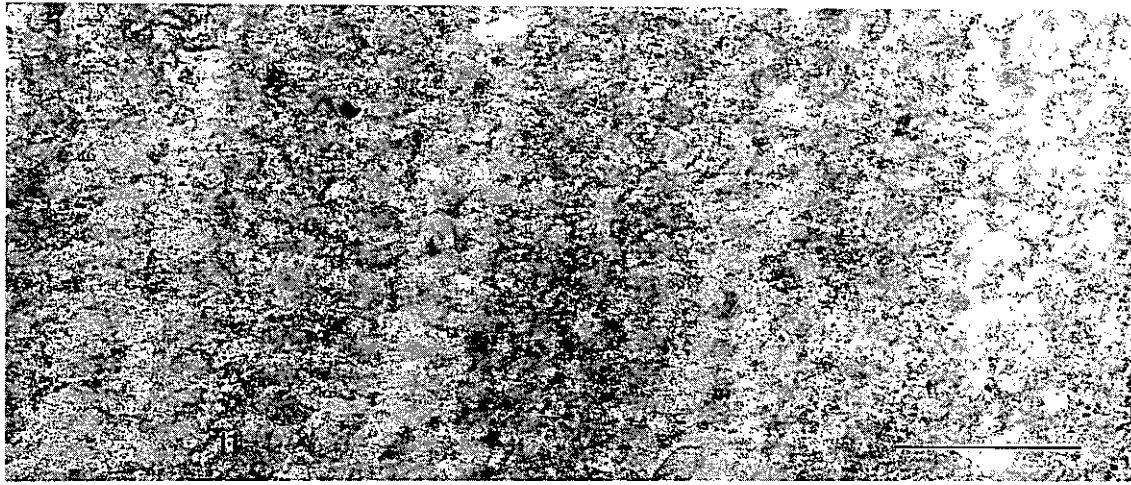
**FIGURA 7.** Micrografías de los extractos solubles de músculo picado de bacalao (-20°C) almacenado 63 semanas. **a)** Fracción soluble en CINa ( $S_1$ ). Predominio de filamentos de actina interconectados (→) y acúmulos proteicos. Barra 0.25 $\mu$ m. **a\*)** La actomiosina aparece asimismo formando agregados de gran tamaño. Barra 0.15 $\mu$ m. **b y c)** Fracciones solubles en SDS ( $S_2$ ) y SDS+ME ( $S_3$ ) respectivamente. Abundancia de estructuras en anillo y partículas proteicas de naturaleza globular (→). Barras 0.15 $\mu$ m.

**FIGURA 8.** Fracciones insolubles de músculo picado de bacalao (-20°C) almacenado 63 semanas. **a)** Fracción insoluble en CINa ( $P_1$ ). Filamentos gruesos íntegros atraviesan la zona H (→) Barra 0.4 $\mu$ m. **a\*)** En algunos sarcómeros los filamentos gruesos muestran elevado grado de integridad. Barra 0.15 $\mu$ m. **b y c)** Fracciones insolubles en SDS ( $P_2$ ) y SDS+ME ( $P_3$ ) respectivamente. Las bandas A muestran mayor cantidad de material proteico que en los residuos de músculo obtenidos a las 36 semanas. Barras 0.4 $\mu$ m.



**FIGURA 9.** Microscopía electrónica de barrido de la fracción insoluble P<sub>3</sub> obtenida de músculo picado de bacalao (-20°C) almacenado 63 semanas. Obsérvese el elevado número y grado de integridad de los residuos musculares. Barra 10µm.

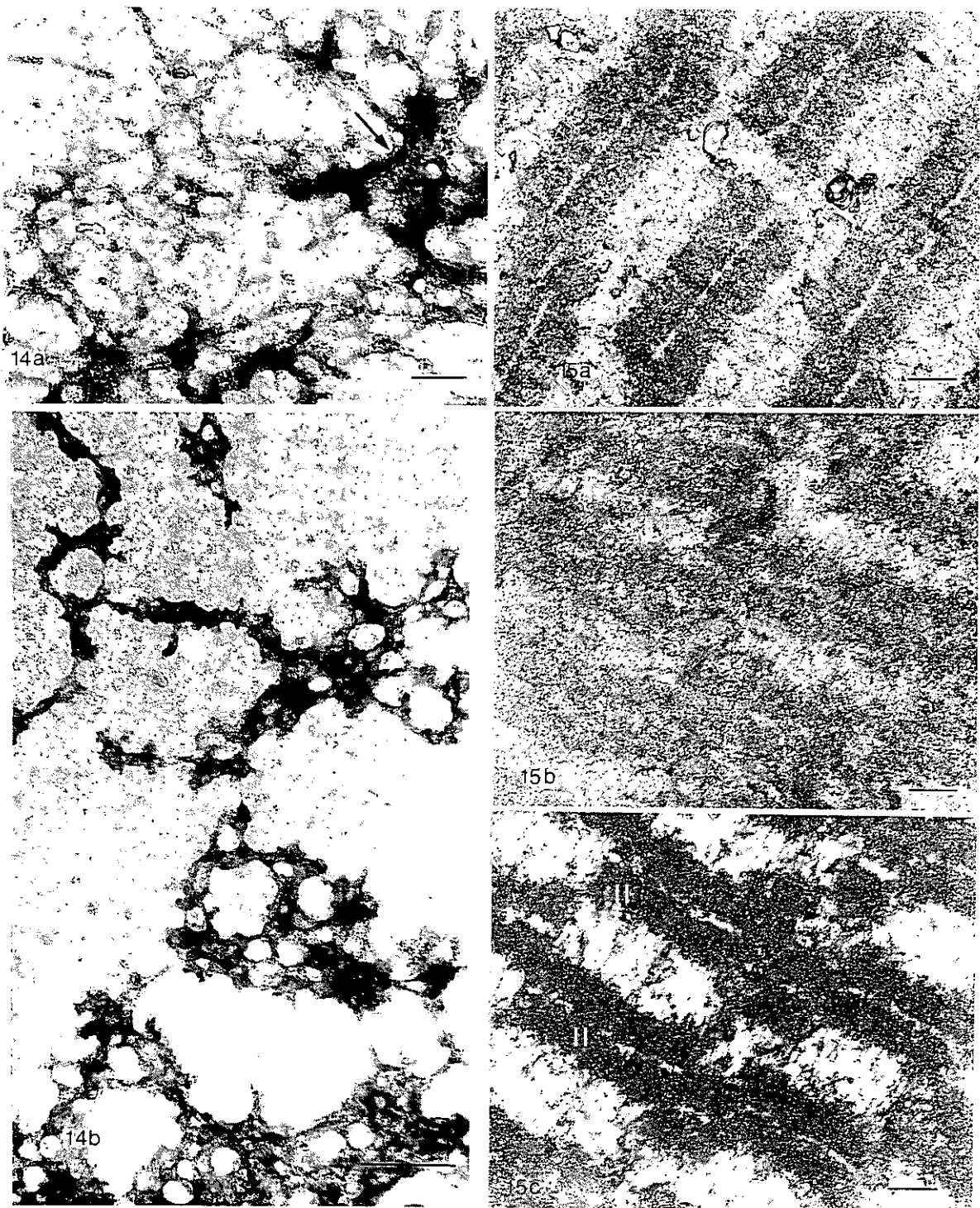
**FIGURA 10.** Microscopía electrónica de barrido de la fracción insoluble P<sub>3</sub> obtenida de músculo picado de bacalao (-20°C) almacenado 36 semanas. Los fragmentos musculares muestran un elevado grado de disgregación por efecto de los agentes solubilizantes SDS y ME. Barra 10µm.



**FIGURA 11.** Micrografía de la fracción insoluble en sal ( $P_1$ ) de músculo de bacalao almacenado a  $-20^\circ\text{C}$  22 semanas. Obsérvese la escasa presencia de restos proteicos en la banda A. Barra  $0.6\ \mu\text{m}$ .

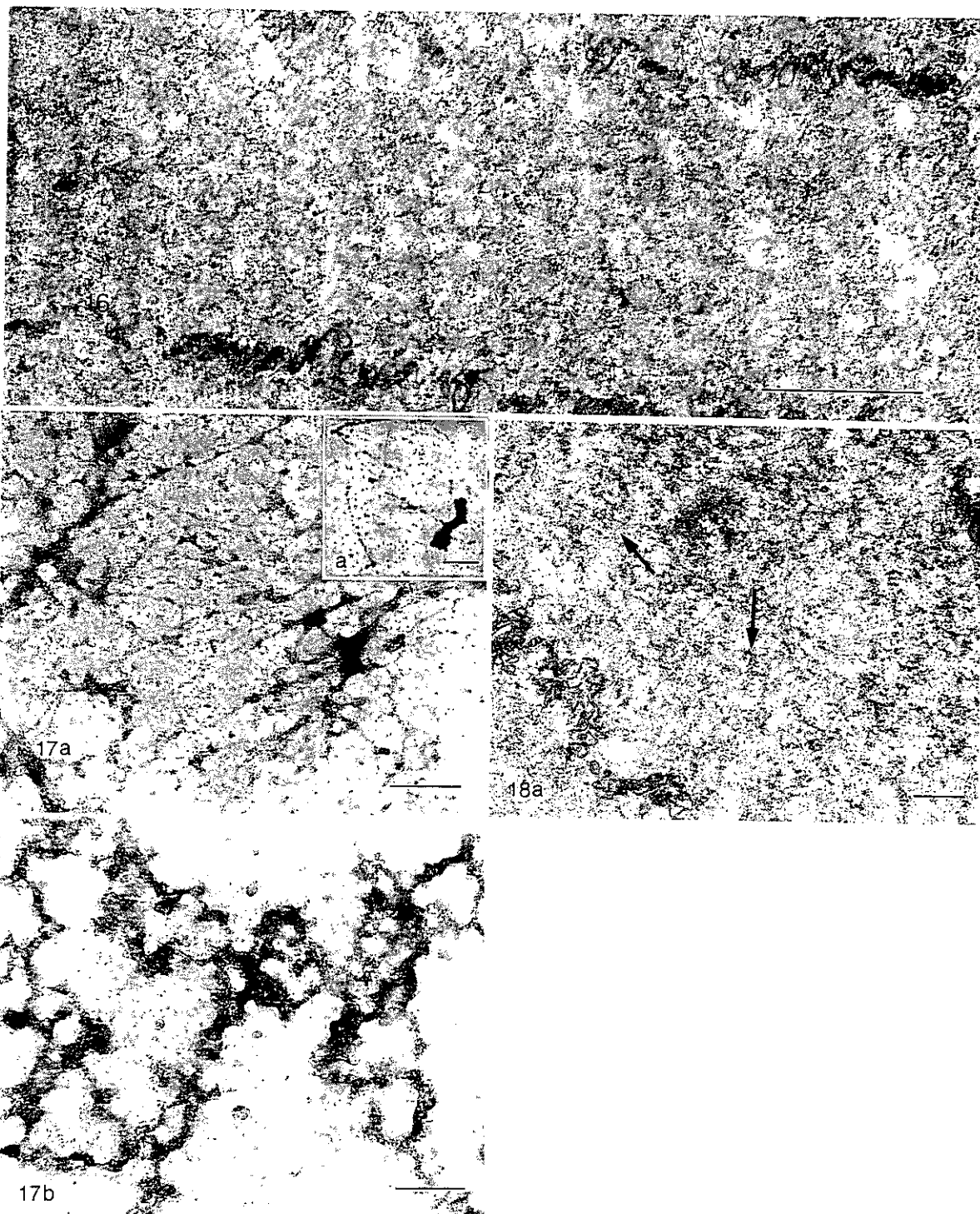
**FIGURA 12.** Fracciones solubles de músculo de bacalao almacenado a  $-20^\circ\text{C}$  36 semanas. a) Extracto soluble en  $\text{ClNa}$  ( $S_1$ ). Los filamentos de actina aparecen frecuentemente interconectados con ángulos entre  $90$  y  $100^\circ$  ( $\rightarrow$ ) y formando estructuras en anillo. Los acúmulos proteicos son atribuidos a agregados de miosina ( $\blacktriangledown$ ). Barra  $0.25\ \mu\text{m}$ . b) Fracción soluble en  $\text{SDS}$  ( $S_2$ ) y  $\text{SDS+ME}$  ( $S_3$ ). Barra  $0.25\ \mu\text{m}$ .

**FIGURA 13.** Fracciones insolubles de bacalao ( $-20^\circ\text{C}$ ) almacenado 36 semanas. a) Fracción insoluble en  $\text{ClNa}$  ( $P_1$ ). Los sarcómeros muestran mayor organización que en el residuo de la figura 11. Barra  $0.25\ \mu\text{m}$ . b) Fracción insoluble en  $\text{SDS}$  ( $P_2$ ). La banda A muestra escasez de restos proteicos. Barra  $0.15\ \mu\text{m}$ .



**FIGURA 14.** Micrografías de los extractos solubles de músculo de bacalao almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  49 y 63 semanas. **a)** Fracción soluble en C1Na ( $S_1$ ). La actomiosina aparece fundamentalmente formando agregados con estructuras en forma de anillo y fragmentos proteicos asociados ( $\rightarrow$ ). Barra  $0.15\mu\text{m}$ . **b)** Fracciones solubles en SDS ( $S_2$ ) y SDS+ME ( $S_3$ ). La morfología de las proteínas es semejante a la descrita en  $S_1$ . Barra  $0.25\mu\text{m}$ .

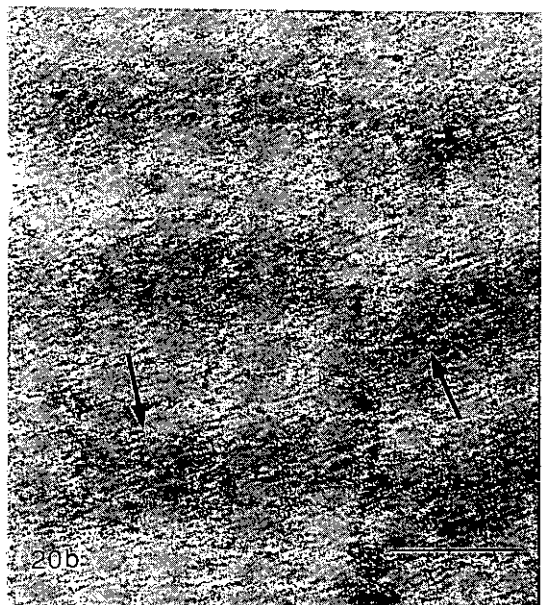
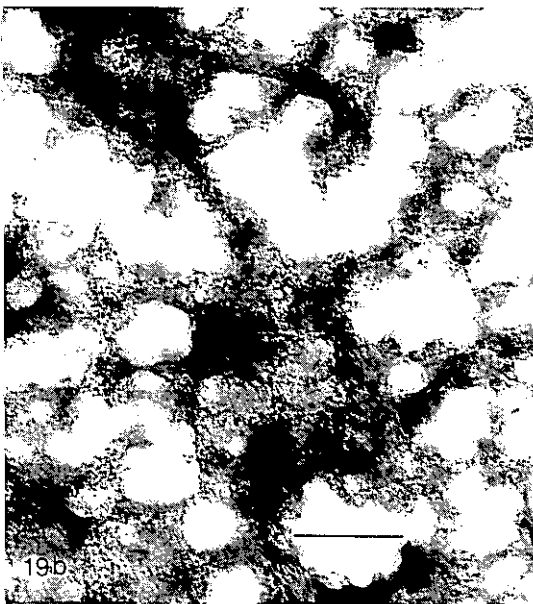
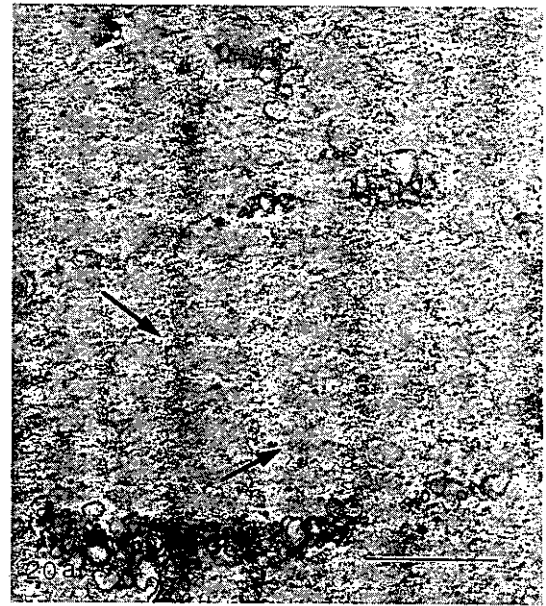
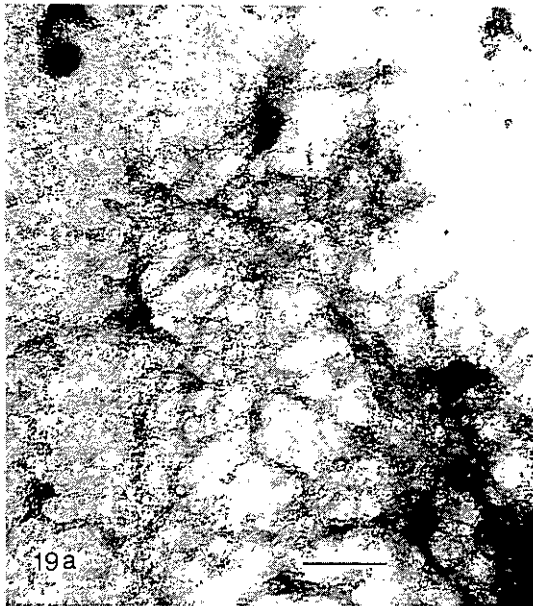
**FIGURA 15.** Fracciones insolubles de músculo de bacalao almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  49 y 63 semanas. **a)** Fracción insoluble en C1Na. Filamentos gruesos apenas pueden ser identificados en la banda A. Barra  $0.4\mu\text{m}$ . **b y c)** Fracciones insolubles en SDS y SDS+ME respectivamente. Las bandas A muestran una elevada densidad debido a la presencia de gran cantidad de material proteico. Barras  $0.4\mu\text{m}$ .



**FIGURA 16.** Microscopía electrónica de transmisión de la fracción insoluble en C1Na de músculo de bacalao almacenado a  $-30^{\circ}\text{C}$  22 semanas. Barra  $0.6\mu\text{m}$ .

**FIGURA 17.** Tinciones negativas de los extractos solubles de músculo de bacalao almacenado a  $-30^{\circ}\text{C}$  36 semanas. a) Fracción soluble en C1Na ( $S_1$ ). Se observan agregados de gran tamaño y acúmulos proteicos globulares. Barra  $0.4\mu\text{m}$ . a\*) Filamentos de actina libres también se observan en el sobrenadante. Barra  $0.4\mu\text{m}$ . b) Extracto soluble en SDS ( $S_2$ ). Barra  $0.25\mu\text{m}$ .

**FIGURA 18a.** Fracción insoluble en C1Na de músculo de bacalao almacenado a  $-30^{\circ}\text{C}$  36 semanas. Se encuentra escasez de material proteico formando parte de la banda A ( $\rightarrow$ ). Barra  $0.2\mu\text{m}$ .



**FIGURA 19.** Tinciones negativas de las fracciones solubles de músculo de bacalao almacenado a  $-30^{\circ}\text{C}$  49 y 63 semanas. **a)** Extracto soluble en  $\text{ClNa}$  ( $\text{S}_1$ ). Barra  $0.15\mu\text{m}$ . **b)** Fracciones solubles en  $\text{SDS}$  ( $\text{S}_2$ ) y  $\text{SDS}+\text{ME}$  ( $\text{S}_3$ ). Barra  $0.4\mu\text{m}$ . Las proteínas presentes en la totalidad de los extractos muestran elevado grado de agregación.

**FIGURA 20.** Microscopía electrónica de transmisión de las fracciones insolubles obtenidas de músculo de bacalao almacenado a  $-30^{\circ}\text{C}$  49 y 63 semanas. **a)** Fracción insoluble en sal ( $\text{P}_1$ ). En los residuos sarcoméricos escasez de material proteico aparece formando parte de la banda A ( $\rightarrow$ ). Barra  $0.6\mu\text{m}$ . **b)** Fracción insoluble en  $\text{SDS}$  ( $\text{P}_2$ ). Un elevado porcentaje de proteínas resultan extraídas de  $\text{P}_1$  por el  $\text{SDS}$ , quedando escasos restos en la banda A ( $\rightarrow$ ). Barra  $0.6\mu\text{m}$ .

## 2. ESTUDIO DE EXTRACTOS SOLUBLES Y FRACCIONES INSOLUBLES DE MERLUZA (*Merluccius merluccius*).

El mecanismo de extracción es equivalente al llevado a cabo en músculo de bacalao. Los muestreos se llevaron a cabo en los mismos intervalos de tiempo pero exclusivamente hasta la semana 49 de almacenamiento.

### 2.1. Músculo almacenado a -20°C.

El músculo de merluza congelado y sin almacenar (control) no resulta solubilizado por el CINa en su totalidad. Los estudios por microscopía electrónica de barrido confirman la presencia de restos musculares en el precipitado resultante del tratamiento de dicho músculo con CINa (figura 21). Se pueden constatar signos evidentes de alteración en las tinciones negativas efectuadas sobre dicho extracto. Los filamentos de actina no aparecen decorados mostrando la estructura característica de la actomiosina apareciendo como F-actina. Estos filamentos raramente aparecen como filamentos individuales como muestra la figura 22, sino interconectados e interaccionando con material proteico de naturaleza globular de modo equivalente al observado en el sobrenadante de músculo de bacalao almacenado a -20°C en la semana 36 de almacenamiento. El estudio por MET de esta fracción insoluble muestra en sus restos miofibrilares bandas A escasamente definidas dado que gran parte de la actomiosina resulta extraída por la solución salina como muestra la figura 23. Desde tempranamente en los extractos solubles en sal se identifican filamentos que tienden a formar parte de agregados de gran tamaño en los que se observan acúmulos proteicos equivalentes a agregados de moléculas de miosina como se muestra en la figura 24 correspondiente a la fracción soluble en sal extraída de músculo almacenado 5 semanas.

En el extracto soluble en sal obtenido de músculo almacenado 14 semanas ( $S_1$ ), elementos proteicos identificados como miosina muestran un elevado grado de agregación apareciendo en forma de acúmulos o contribuyendo con filamentos de actina a la formación de estructuras en anillo mejor definidas que en el control (figura 25a).

Las fracciones insolubles  $P_1$  obtenidas tras el tratamiento con cloruro sódico de



músculo almacenado 14 semanas muestran en sus restos musculares una mayor densidad de material formando parte de la banda A en los que es posible identificar trazas de filamentos gruesos sin morfología definida con respecto al músculo control como muestra la figura 26a, hecho que a su vez confirma la disminución de los valores de extractabilidad (figura VI). Tras el tratamiento de la fracción  $P_1$  con SDS y  $P_2$  con SDS y ME quedan unas fracciones insolubles  $P_2$  y  $P_3$  (figuras 26b y 26c) que muestran trazas de estructuras sarcoméricas con una densidad y organización en la banda A equivalentes a las encontradas en las fracciones  $P_2$  y  $P_3$  de músculo de bacalao a  $-20^{\circ}\text{C}$  almacenado por encima de las 36 semanas. Las proteínas extraídas por estos agentes aparecen en los sobrenadantes  $S_2$  y  $S_3$  formando estructuras en forma de anillo en las que es frecuente identificar acúmulos proteicos en los que la miosina puede estar ampliamente implicada, como se observa en las figuras 25b y 25c. Estos resultados ponen de manifiesto una temprana participación de enlaces covalentes inclusive de naturaleza no disulfuro en la agregación del músculo de merluza a esta temperatura.

Los estudios bioquímicos muestran una disminución de los valores de extractabilidad en el músculo almacenado 22, 36 y 49 semanas con respecto al almacenado 14 semanas (figura VI). Desde el punto de vista morfológico esta disminución se refleja en que las fracciones insolubles en sal  $P_1$  muestran estructuras sarcoméricas más definidas que en la semana 14 debido a que los restos de banda A aparecen en parte organizados en filamentos gruesos más claramente identificables como muestra la figura 28a. Este nivel de organización es equivalente al encontrado en el precipitado  $P_1$  de músculo picado de bacalao almacenado 36 semanas como muestra la figura 6a. Los restos de línea Z y filamentos finos no aumentan significativamente con respecto al estadio anterior. El hecho de que no se observen diferencias muy significativas en la densidad y morfología de las estructuras sarcoméricas entre las semanas 22 36 y 49 viene apoyado por los estudios electroforéticos en los que no se observa una variación muy significativa de la cantidad de cadena pesada de miosina y actina entre estos estadios de almacenamiento ( figuras VII y VIII).

Las proteínas miofibrilares extraídas por el  $\text{ClNa}$  ( $S_1$ ) muestran un elevado grado

de agregación con predominio de acúmulos proteicos de morfología semejante a los encontrados en el sobrenadante  $S_1$  en la semana 14 (figura 27a). Estas estructuras son encontradas más abundantemente en todos los estadios de esta especie que en bacalao. El tratamiento de los agregados  $P_1$  obtenidos de músculo almacenado 22, 36 y 49 semanas con SDS en primer lugar dejó residuos  $P_2$  como los mostrados en la figura 28b en cuya banda A se identifican restos de filamentos gruesos claramente identificables. El tratamiento final de los residuos  $P_2$  con SDS y ME dio lugar a fracciones  $P_3$  donde se aprecian bandas A con escasos restos proteicos equivalentes a los encontrados a las 14 semanas (figura 28c). Las proteínas extraídas por el SDS y SDS-ME aparecen en  $S_2$  y en  $S_3$  con una densidad y morfología como la observada en la figura 27b.

## 2.2. Músculo almacenado a $-30^\circ\text{C}$ .

La observación de la figura VI pone de manifiesto una disminución de la cantidad de actomiosina extraída en CINA desde los primeros periodos de almacenamiento. Estos valores de extractabilidad son más bajos a los obtenidos en músculo de bacalao a esta temperatura. El sobrenadante  $S_1$  obtenido de músculo control y almacenado 5 semanas muestra filamentos de actina asociados formando ángulos de  $90-106^\circ$  o agregados en los que son identificables acúmulos proteicos de naturaleza globular (figura 29 a y b). No se identificó un residuo insoluble en sal suficiente para su estudio por microscopía en este estadio de almacenamiento.

A las 14 semanas los restos miofibrilares  $P_1$  obtenidos tras el tratamiento del músculo con CINA muestran bandas A con un elevado grado de organización donde es incluso posible observar la presencia de restos de filamentos gruesos (figura 31a). La fracción soluble en sal ( $S_1$ ) muestra una mayor tendencia de las proteínas extraídas a agregarse formando anillos con respecto al estadio anterior. Asimismo fragmentos proteicos globulares de morfología equivalente a agregados de miosina forman parte de dichas estructuras (figura 30a). Tras el tratamiento de  $P_1$  con SDS quedó un residuo  $P_2$  donde se observan claramente escasos restos proteicos no extraídos por dicho agente formando parte de una banda A residual como muestra la figura 31b. La fracción  $P_2$  se solubilizó en su totalidad tras su tratamiento con SDS y ME. Proteínas miofibrilares

agregadas fueron extraídas por ambos agentes organizadas en anillos constituyendo acúmulos proteicos (figuras 30b y 30c).

En el músculo almacenado 22 semanas la diferencia más significativa con respecto al estadio anterior es la presencia de una mayor densidad de material retenido en la banda A de los residuos insolubles en SDS ( $P_2$ ) así como la aparición de un residuo  $P_3$  en el que aparecen restos de banda A de densidad equivalentes a los encontrados en el residuo  $P_2$  de músculo almacenado 14 semanas.

En músculo almacenado 36 y 49 semanas, la fracción soluble en sal muestra gran parte de la actomiosina formando parte de agregados semejantes a los encontrados en merluza almacenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  en este estadio de tiempo como se muestra en la figura 32a.

En los últimos estadios de almacenamiento (36 y 49 semanas), el residuo insoluble en sal  $P_1$  no muestra grandes diferencias ultraestructurales con respecto al obtenido en músculo almacenado 22 semanas. Restos de filamentos gruesos pueden ser identificados en la banda A de las miofibrillas residuales no así filamentos finos que aparecen escasamente (figura 33a). Tras el tratamiento del agregado  $P_1$  con SDS se observa una mayor densidad de material formando parte de la banda A en la mayoría de los sarcómeros de  $P_2$  en donde además es posible distinguir en algunos sarcómeros filamentos gruesos organizados con respecto al músculo almacenado 14 semanas (figura 33b). La reducción de los puentes disulfuro tras el tratamiento del agregado  $P_2$  con mercaptoetanol permite la extracción de proteínas de dicho agregado si bien queda un residuo  $P_3$  que presenta una banda A de densidad equivalente a la identificada en el agregado  $P_2$  obtenido en la semana 14 (figura 33c).

Las estructuras encontradas en los sobrenadantes  $S_2$  y  $S_3$  se limitan a agregados como los mostrados en la figura 32b.

Los resultados obtenidos en merluza sugieren una aparición temprana de enlaces covalentes que dificultan la acción de los agentes solubilizantes obteniéndose fracciones  $P_3$  con estructuras sarcoméricas de notable densidad desde las semanas 14 y 22 a  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $-30^{\circ}\text{C}$  respectivamente.

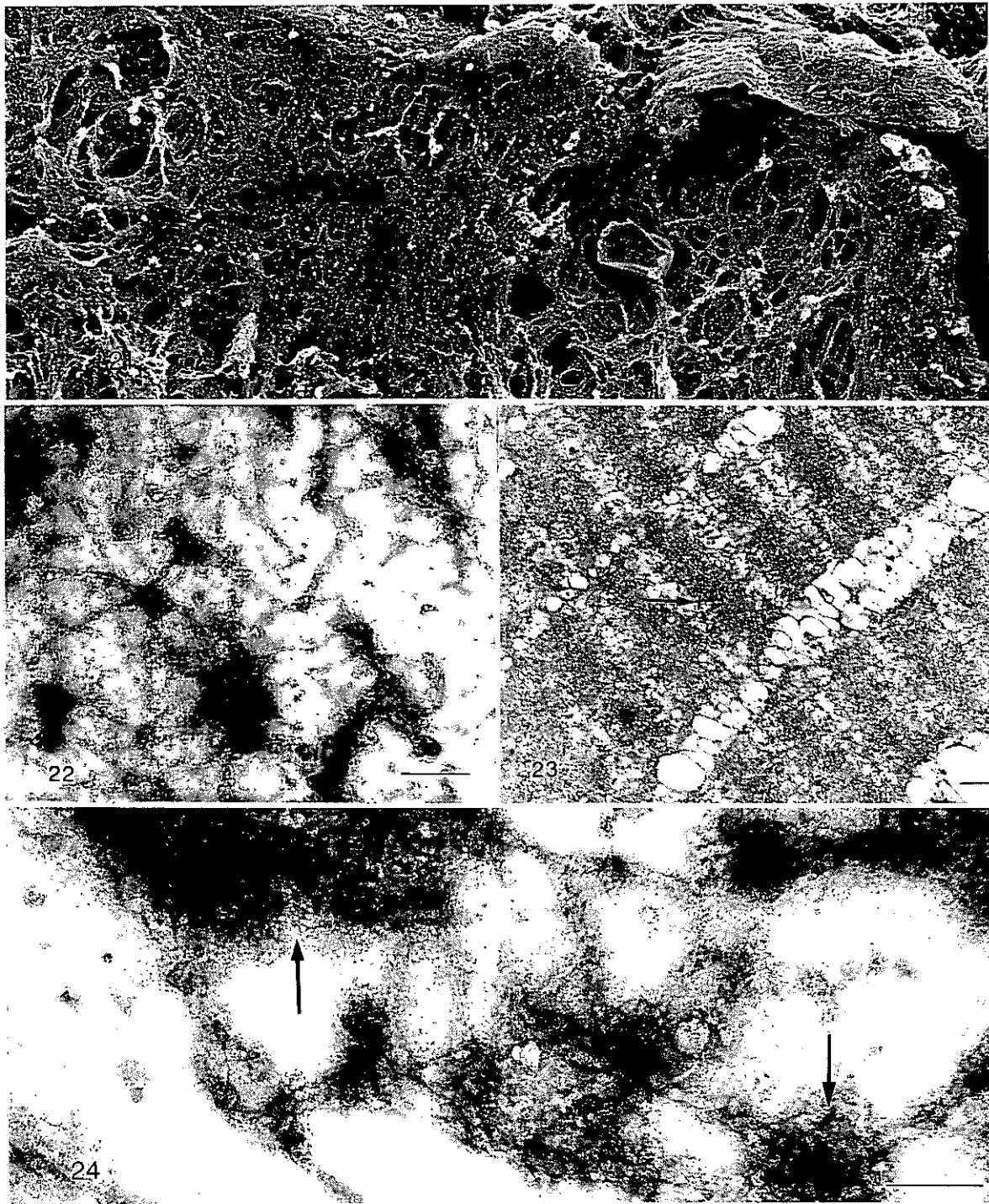
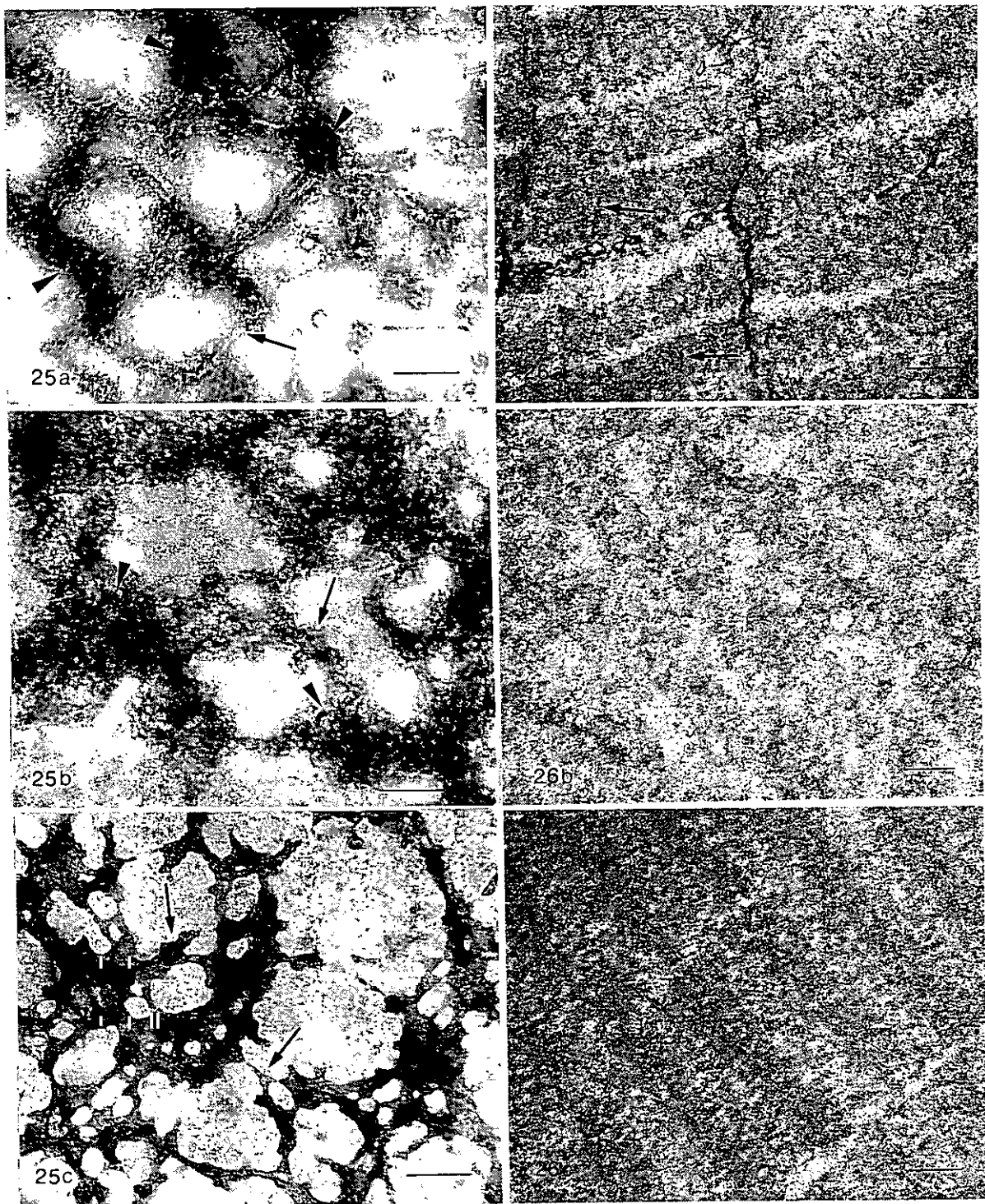


FIGURA 21. MEB de la fracción insoluble en C1Na de músculo de merluza control. Barra 10 $\mu$ m.

FIGURA 22. Tinción negativa de la fracción soluble en C1Na de músculo de merluza control. Los filamentos de actina no presentan la estructura en punta de flecha y aparecen formando parte de agregados desde los primeros estadios de almacenamiento. Barra 0.4 $\mu$ m.

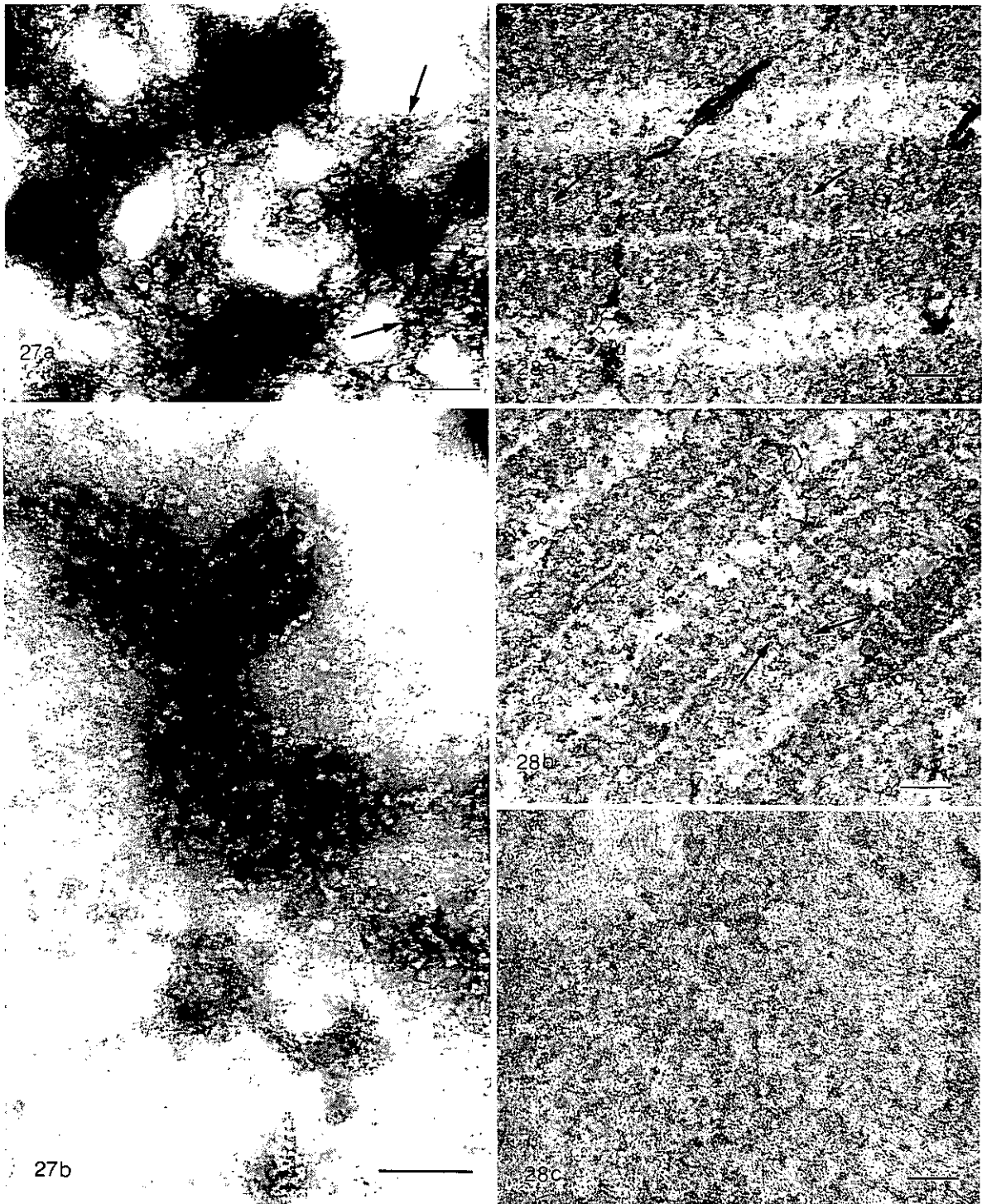
FIGURA 23. Microscopía electrónica de transmisión de la fracción insoluble en sal ( $P_1$ ) de músculo de merluza control. Obsérvese la escasez de material formando parte de la banda A ( $\rightarrow$ ). Barra 0.2 $\mu$ m.

FIGURA 24. Fracción soluble en C1Na de músculo de merluza almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  5 semanas. Morfología de los agregados de gran tamaño que se observan desde estadios tempranos de almacenamiento. Nótese la incidencia de acúmulos proteicos identificados como agregados de miosina ( $\rightarrow$ ). Barra 0.25 $\mu$ m.



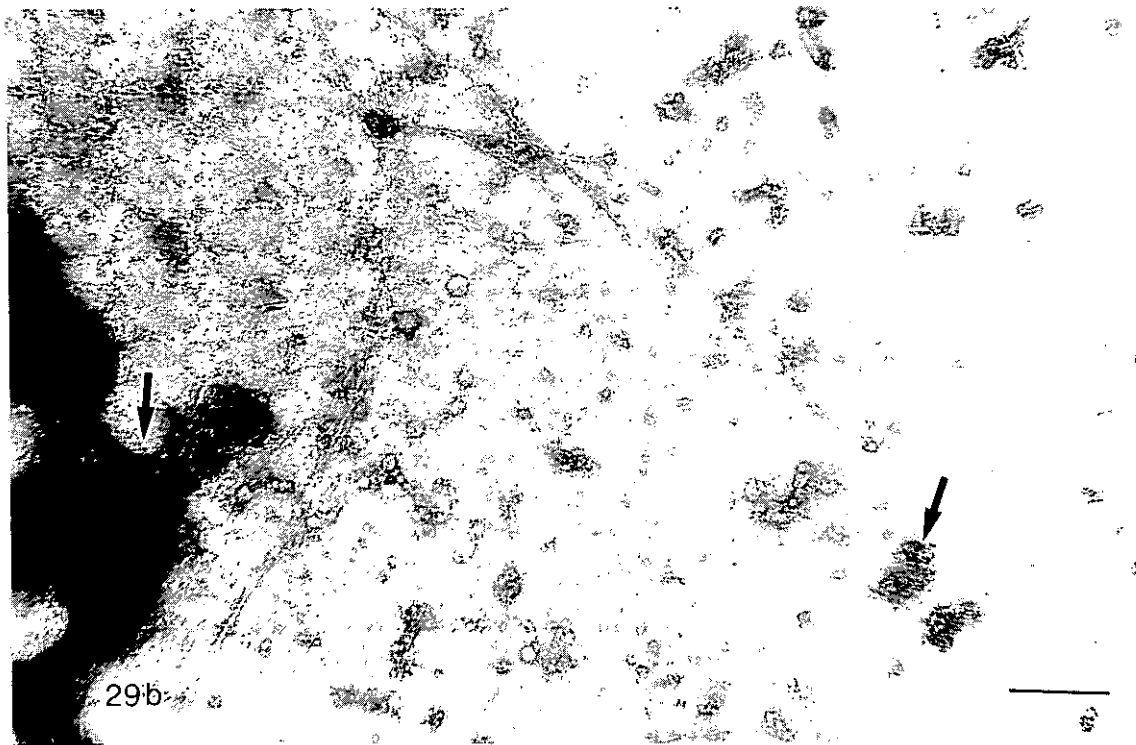
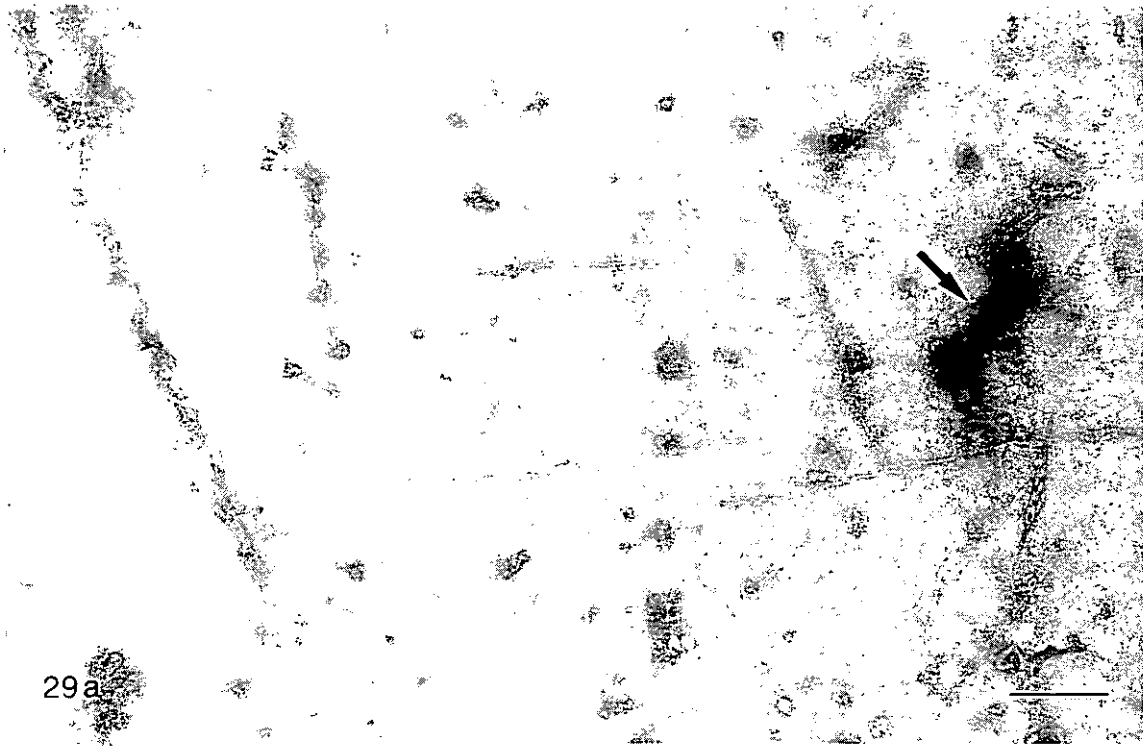
**FIGURA 25.** Tinciones negativas de los extractos solubles obtenidos de músculo de merluza almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  14 semanas. a) Fracción soluble en CI-Na ( $S_1$ ). Barra  $0,25\mu\text{m}$ . b y c) Fracciones solubles en SDS ( $S_2$ ) y SDS+ME ( $S_3$ ) respectivamente. Barras  $0,15\mu\text{m}$ . Las proteínas presentes en todos los extractos aparecen formando agregados de gran tamaño en los que predominan estructuras en forma de anillo ( $\rightarrow$ ) y acúmulos proteicos equivalentes en gran parte a oligómeros de moléculas de miosina ( $\blacktriangledown$ ).

**FIGURA 26.** Microscopía electrónica de transmisión de las fracciones insolubles obtenidas de músculo de merluza almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  14 semanas. a) Fracción insoluble en CI-Na ( $P_1$ ). En el material retenido en la banda A se observan restos de filamentos gruesos ( $\rightarrow$ ). Barra  $0,4\mu\text{m}$ . b y c) Fracciones insolubles en SDS ( $P_2$ ) y SDS+ME ( $P_3$ ) respectivamente. Se observan restos proteicos en la banda A no extraídos por dichos agentes. Comparativamente en músculo de bacalao almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  36 semanas no se detecta fracción insoluble  $P_3$  (figura 13). Barras  $0,4\mu\text{m}$ .

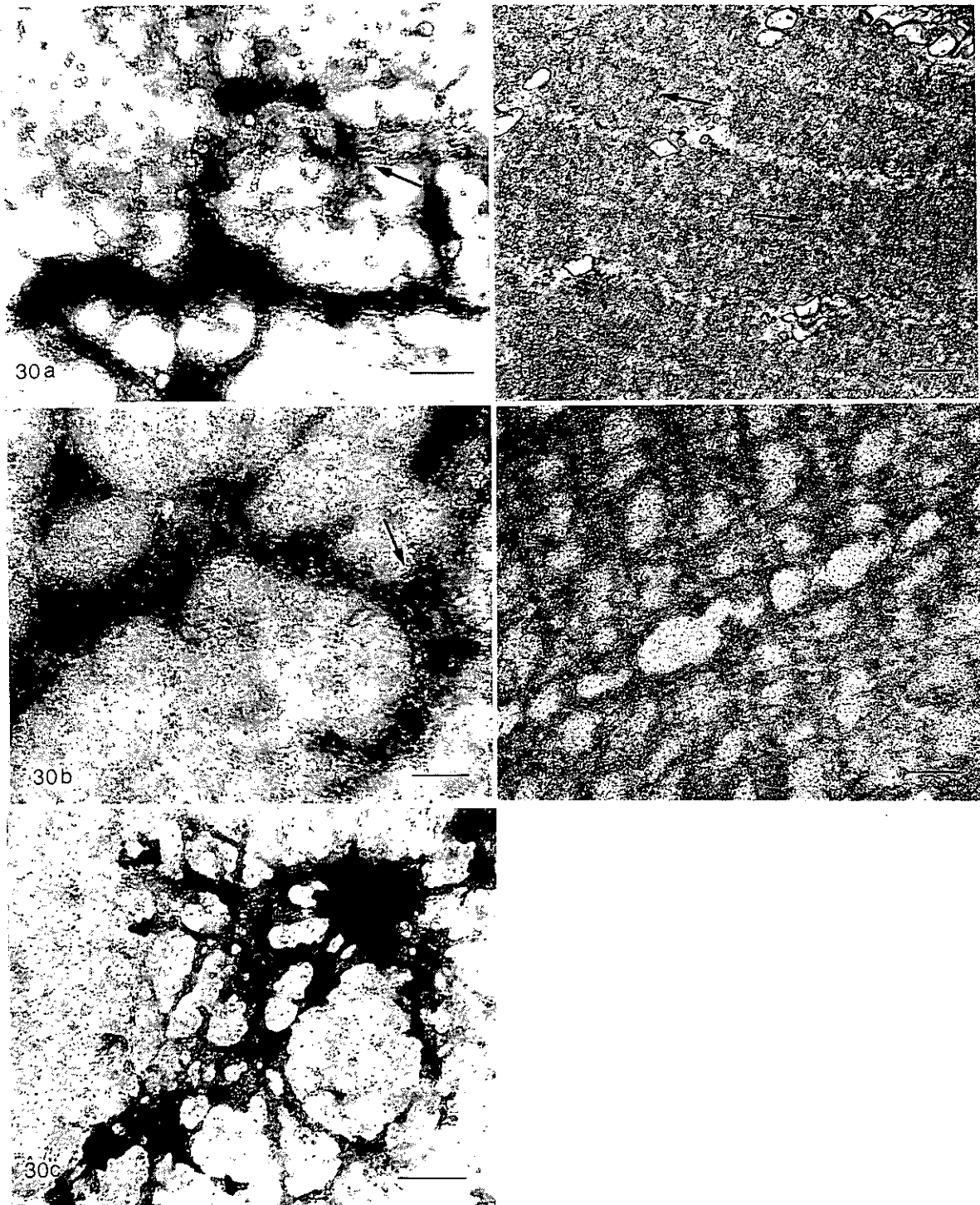


**FIGURA 27.** Tinciones negativas de los extractos solubles de músculo de merluza almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  22, 36 y 49 semanas. **a)** Extractos solubles en  $\text{ClNa}$  ( $\text{S}_1$ ). La actomiosina muestra elevado grado de agregación con predominio de oligómeros constituidos por partículas proteicas de naturaleza globular ( $\rightarrow$ ). Barra  $0.4\mu\text{m}$ . **b)** Fracciones solubles en  $\text{SDS}$  ( $\text{S}_2$ ) y  $\text{SDS+ME}$  ( $\text{S}_3$ ). Las proteínas extraídas por estos agentes presentan una morfología semejante a las descrita para  $\text{S}_1$ . Barra  $0.15\mu\text{m}$ .

**FIGURA 28.** Microscopía electrónica de transmisión de las fracciones insolubles obtenidas de músculo de merluza almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  22, 36 y 49 semanas. **a)** Fracción insoluble en  $\text{ClNa}$  ( $\text{P}_1$ ). El elevado grado de organización de la banda A se manifiesta en la presencia de filamentos gruesos ( $\rightarrow$ ). Barra  $0.4\mu\text{m}$ . **b)** Fracción insoluble en  $\text{SDS}$  ( $\text{P}_2$ ). En los restos proteicos de la banda A se observan asimismo restos de filamentos gruesos ( $\rightarrow$ ). Barra  $0.4\mu\text{m}$ . **c)** Fracción insoluble en  $\text{SDS+ME}$ . Barra  $0.4\mu\text{m}$ .



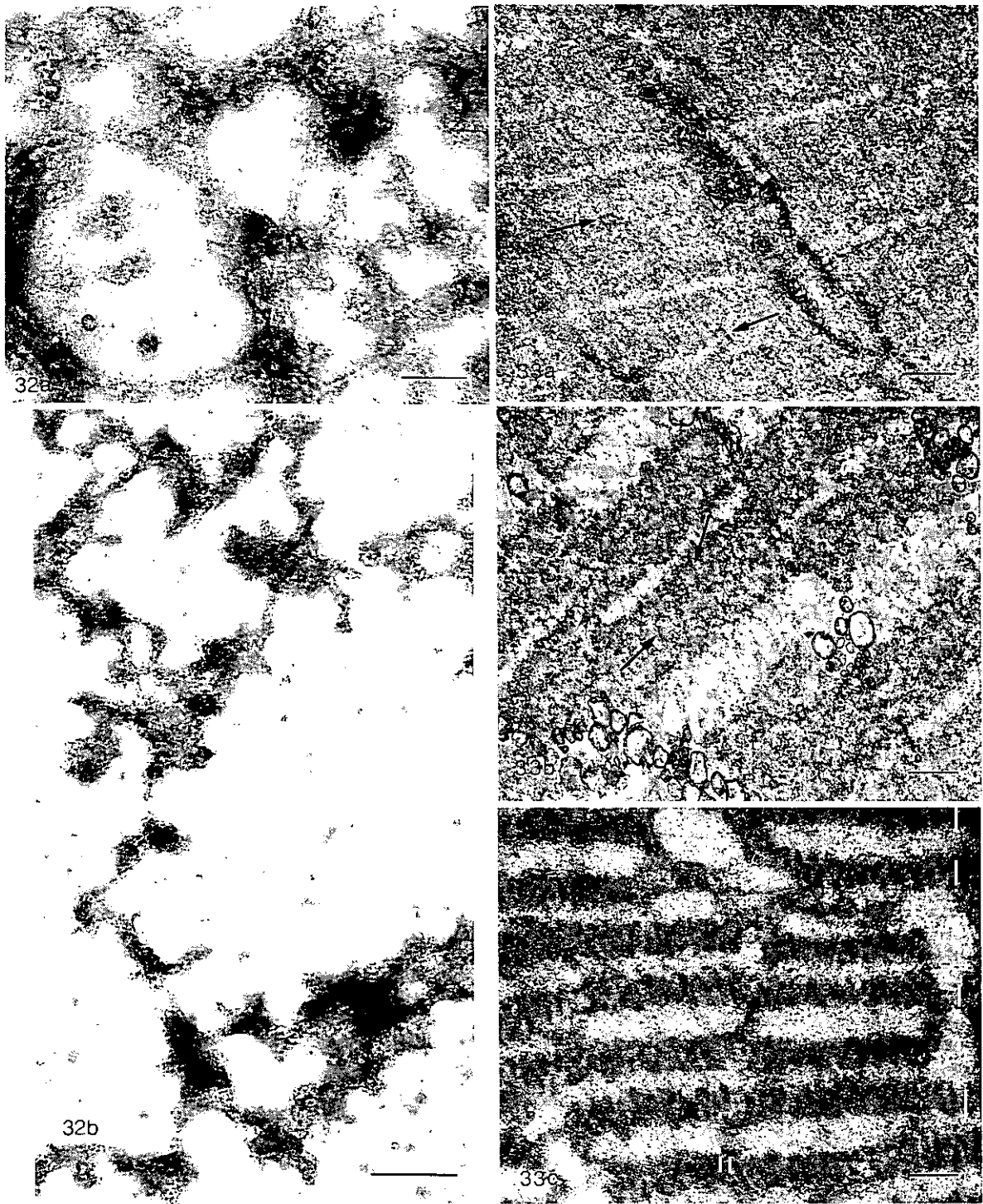
**FIGURA 29 a y b.** Tinciones negativas de las fracciones solubles en ClNa ( $S_1$ ) obtenidas de músculo de merluza control (congelado sin almacenar) y almacenado a  $-30^{\circ}\text{C}$  5 semanas. En los extractos de actomiosina se observan filamentos de actina interconectados paralelamente y formando ángulos entre  $90-106^{\circ}$  así como agregados proteicos de naturaleza globular ( $\rightarrow$ ). Barras  $0.25\mu\text{m}$ .



**FIGURA 30.** Tinciones negativas de las fracciones solubles de músculo de merluza almacenado a  $-30^{\circ}\text{C}$  14 semanas. **a)** Fracción soluble en C1Na ( $S_1$ ). Barra  $0.25\mu\text{m}$ . **b)** Extracto solubilizado con SDS ( $S_2$ ). Barra  $0.15\mu\text{m}$ . **c)** Fracción soluble extraída con SDS+ME ( $S_3$ ). Barra  $0.15\mu\text{m}$ . La totalidad de las proteínas presentes en cada uno de los sobrenadantes presentan el mismo aspecto morfológico, con predominio de agregados proteicos identificados como oligómeros de moléculas de miosina ( $\rightarrow$ ).

**FIGURA 31.** Fracciones insolubles de músculo de merluza almacenado a  $-30^{\circ}\text{C}$  durante 14 semanas. **a)** Fracción insoluble en C1Na ( $P_1$ ). Restos de filamentos gruesos pueden ser identificados en la banda A ( $\rightarrow$ ). Barra  $0.4\mu\text{m}$ . **b)** Fracción insoluble en SDS ( $P_2$ ). Se observan escasos restos proteicos en la banda A de este residuo que es totalmente solubilizado por el tratamiento posterior con SDS y ME. Barra  $0.4\mu\text{m}$ .





**FIGURA 32.** Tinciones negativas de las fracciones solubles de músculo de merluza almacenado a  $-30^{\circ}\text{C}$  36 y 49 semanas. **a)** Fracción soluble en C1Na ( $S_1$ ). Barra  $0.15\mu\text{m}$ . **b)** Fracción soluble en SDS ( $P_2$ ) y SDS+ME ( $P_3$ ). Barra  $0.4\mu\text{m}$ . Las proteínas extraídas con los distintos agentes presentan un aspecto morfológico muy semejante al descrito en los extractos solubles de estadios anteriores.

**FIGURA 33.** Fracciones insolubles de músculo de merluza almacenado a  $-30^{\circ}\text{C}$  36 y 49 semanas. **a)** Fracción insoluble en C1Na ( $P_1$ ). Barra  $0.4\mu\text{m}$ . **b)** Fracción insoluble en SDS ( $P_2$ ). Barra  $0.4\mu\text{m}$ . En ambas fracciones insolubles ( $P_1$ ) y ( $P_2$ ) los restos sarcoméricos muestran restos de filamentos gruesos identificables en la banda A ( $\rightarrow$ ). **c)** Fracción insoluble en SDS+ME. Barra  $0.4\mu\text{m}$ .

### 3. ESTUDIO MORFOLÓGICO.

El estudio morfológico en músculo de bacalao se llevó a cabo en los mismos tiempos de almacenamiento en ambas temperaturas (-20°C y -30°C) que en los estudios de extractos solubles y fracciones insolubles, aunque se consideraron tiempos más largos para el último estadio de almacenamiento con la finalidad de detectar de forma más pronunciada los cambios ultraestructurales.

En músculo de merluza únicamente se tuvo en cuenta una temperatura de almacenamiento (-20°C) y los intervalos de tiempo considerados son equivalentes a los que se utilizaron para los estudios de extractabilidad aunque se simplificaron a cuatro estadios de almacenamiento.

#### 3.1. Estudio morfológico en fibras musculares de bacalao (*Gadus morhua*) a -20°C.

Las secciones transversales revelan en periodos avanzados de almacenamiento una pérdida de definición de los puntos que constituyen la red hexagonal, hecho en gran parte atribuible al aumento del número de fusiones entre filamentos. En músculo control (congelado sin almacenar) y almacenado 5 semanas las secciones transversales muestran un patrón hexagonal en el que filamentos gruesos y finos se encuentran reorganizados de forma convencional como muestra la figura 34. Mientras las fusiones interfilamento son identificables bien entre filamentos finos y entre estos y filamentos gruesos, las fusiones entre filamentos gruesos son escasas.

El músculo almacenado 36 semanas muestra desorganización del patrón hexagonal. Los filamentos finos no conservan su disposición alrededor de los filamentos gruesos, apareciendo ocasionalmente fusionados entre sí y a los filamentos gruesos. Filamentos gruesos aparecen también fusionados o aproximados entre sí más frecuentemente que en el estadio anterior (figura 35).

Los músculos almacenados 49 y 70 semanas presentan respecto a los anteriores un elevado número de fusiones entre filamentos gruesos, especialmente abundantes en miofibrillas de músculo almacenado 70 semanas como muestran las figuras 36 y 37.

La orientación de las fusiones depende de la miofibrilla considerada. En gran número de ellas las fusiones aparecen de forma masiva en la misma dirección formando hileras de filamentos gruesos fusionados como muestran las figuras 36 y 37. En algunas miofibrillas es posible identificar fusiones entre filamentos gruesos con distintas direcciones ( figura 38).

Las secciones transversales también permiten observar cambios en la morfología de los filamentos gruesos durante la congelación. Estos filamentos parecen perder cohesión entre las cadenas poliméricas que los constituyen por lo que aparecen más laxos y ello se traduce en una pérdida de definición del filamento, lo que puede conllevar a un incremento de su diámetro como se observa al comparar la figura 34 con las figuras 36 y 37. Este aspecto aparece asimismo reflejado en la figura 39 a y b que muestra en detalle la diferencia en morfología observada en secciones longitudinales pertenecientes a músculos almacenados 5 y 70 semanas.

### **3.2. Estudio morfológico en fibras musculares de bacalao (*Gadus morhua*) a -30°C.**

El estudio de las secciones transversales pone de manifiesto un aumento significativo del número de fusiones del tipo filamento grueso-filamento grueso en estadios avanzados de almacenamiento, como muestran las figuras 40, 41, 42 y 43 pertenecientes a músculos almacenados 5, 36, 49 y 70 semanas respectivamente.

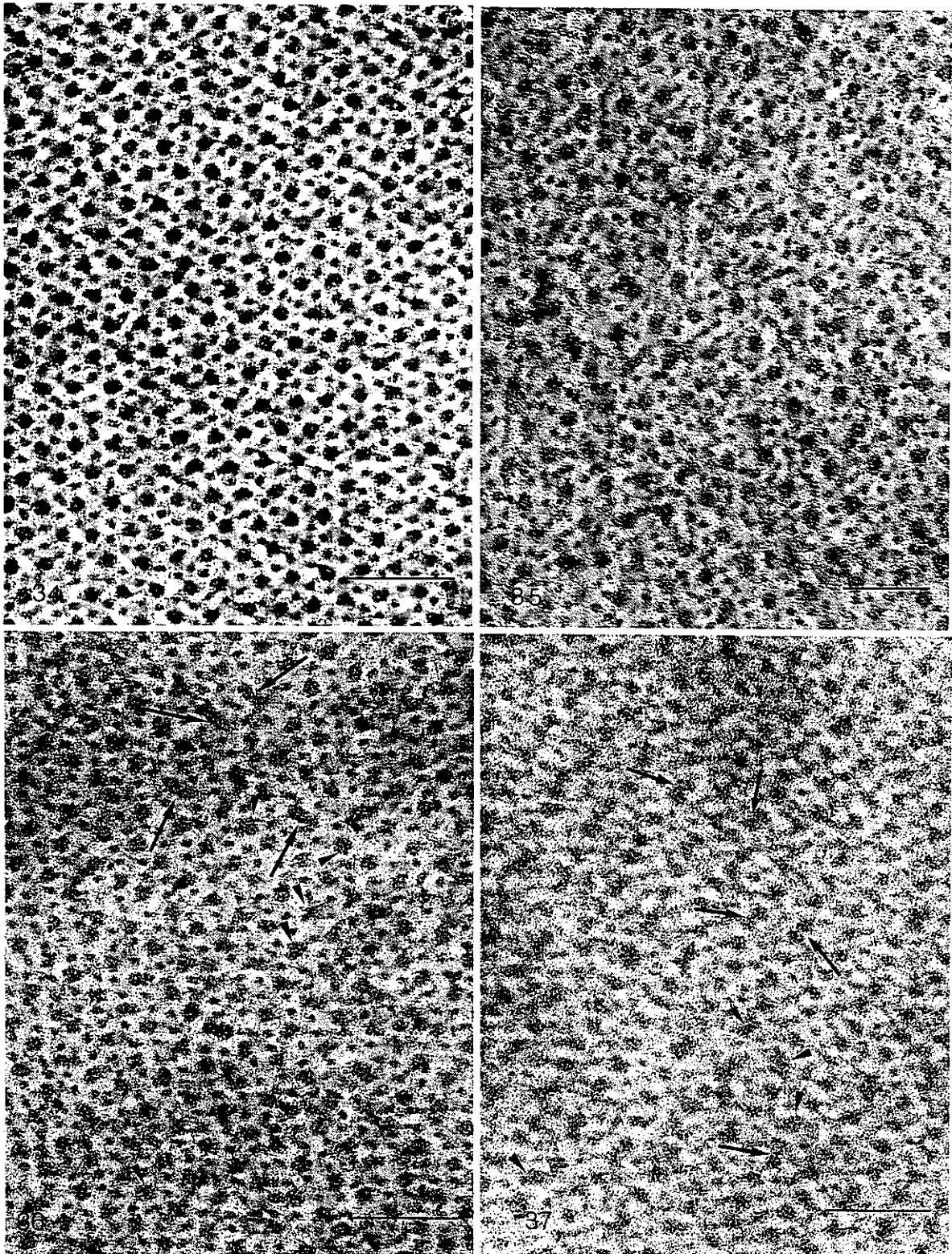
Respecto a la orientación de las fusiones entre filamentos gruesos al igual que ocurre en músculo almacenado a -20°C en gran parte de las miofibrillas sólo se producen con una dirección preferente (figura 43), mientras que en otras pueden coexistir fusiones en distintas direcciones.

Desde el punto de vista morfológico las secciones transversales no revelan variaciones tan significativas en el tamaño de los filamentos gruesos con respecto al músculo almacenado a -20°C si bien en estadios avanzados de almacenamiento pueden presentar menor grado de compactación y más elevada irregularidad en su morfología.

### 3.3. Estudio morfológico en fibras musculares de merluza (*Merluccius merluccius*) a -20°C.

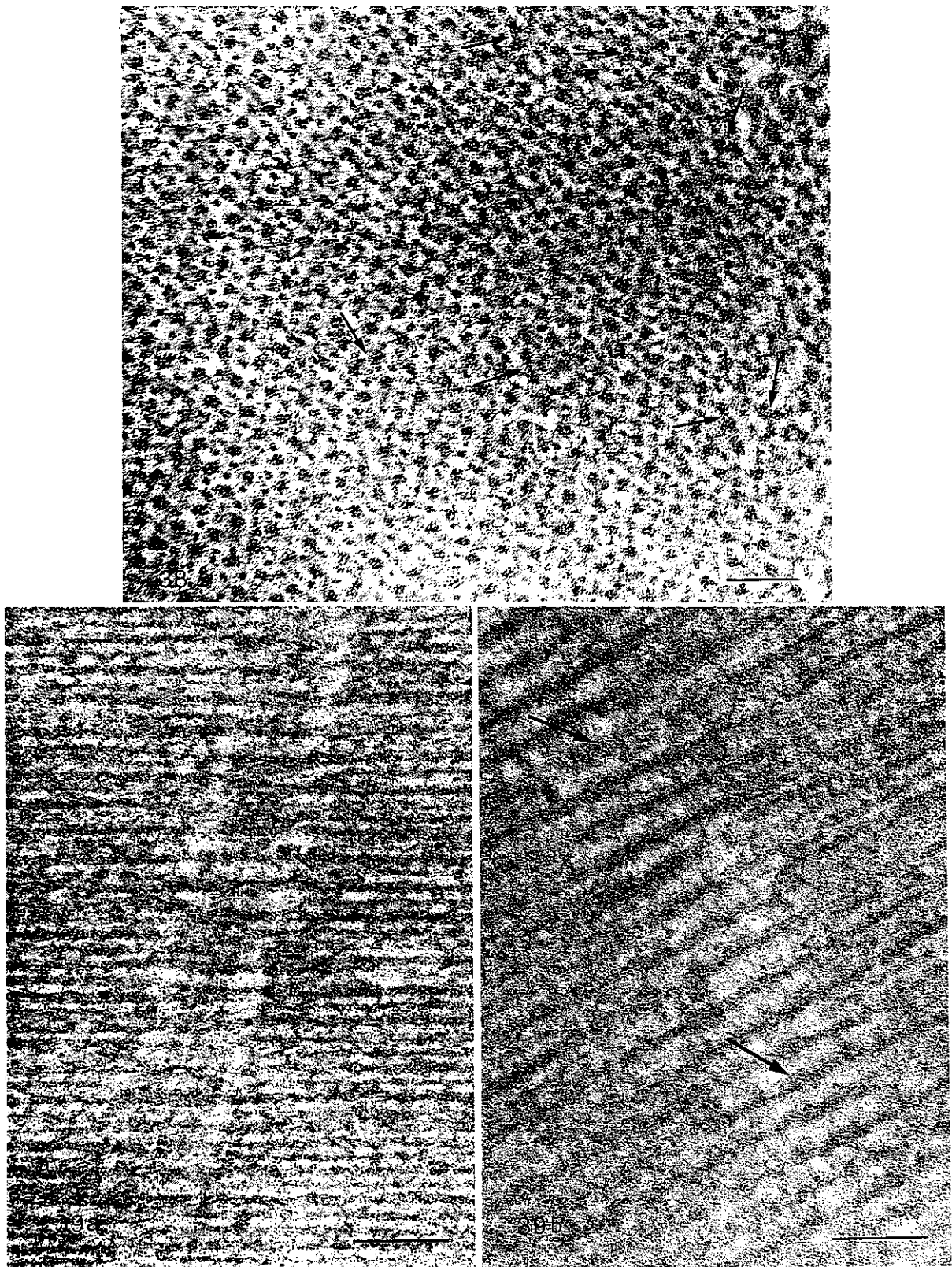
Las secciones transversales en la banda A en músculo control (congelado sin almacenar) y almacenado 5 semanas muestran filamentos gruesos y finos organizados como muestra la figura 44. Aunque son observadas fusiones entre filamentos finos, en amplias zonas los filamentos finos aparecen organizados de forma convencional dispuestos hexagonalmente alrededor de los filamentos gruesos.

Los estudios llevados a cabo en músculos almacenados 36 y 63 semanas revelan una elevada regularidad en la disposición de los filamentos gruesos en la red hexagonal. Fusiones entre filamentos gruesos apenas son identificables en ambos estadíos. Sin embargo predominan fusiones entre filamentos finos que en muchas ocasiones aparecen formando hileras alrededor de los filamentos gruesos y en otras se encuentran asociados a ellos o interconectando varios filamentos gruesos entre sí. Abundantes son también fusiones entre filamentos finos y gruesos (figuras 45 y 46 a,b). No se aprecian diferencias significativas en la morfología de los filamentos gruesos con respecto al control, como ocurre en bacalao almacenado a -30°C, si bien en algunas micrografías los filamentos en estadíos avanzados de almacenamiento aparecen más laxos.



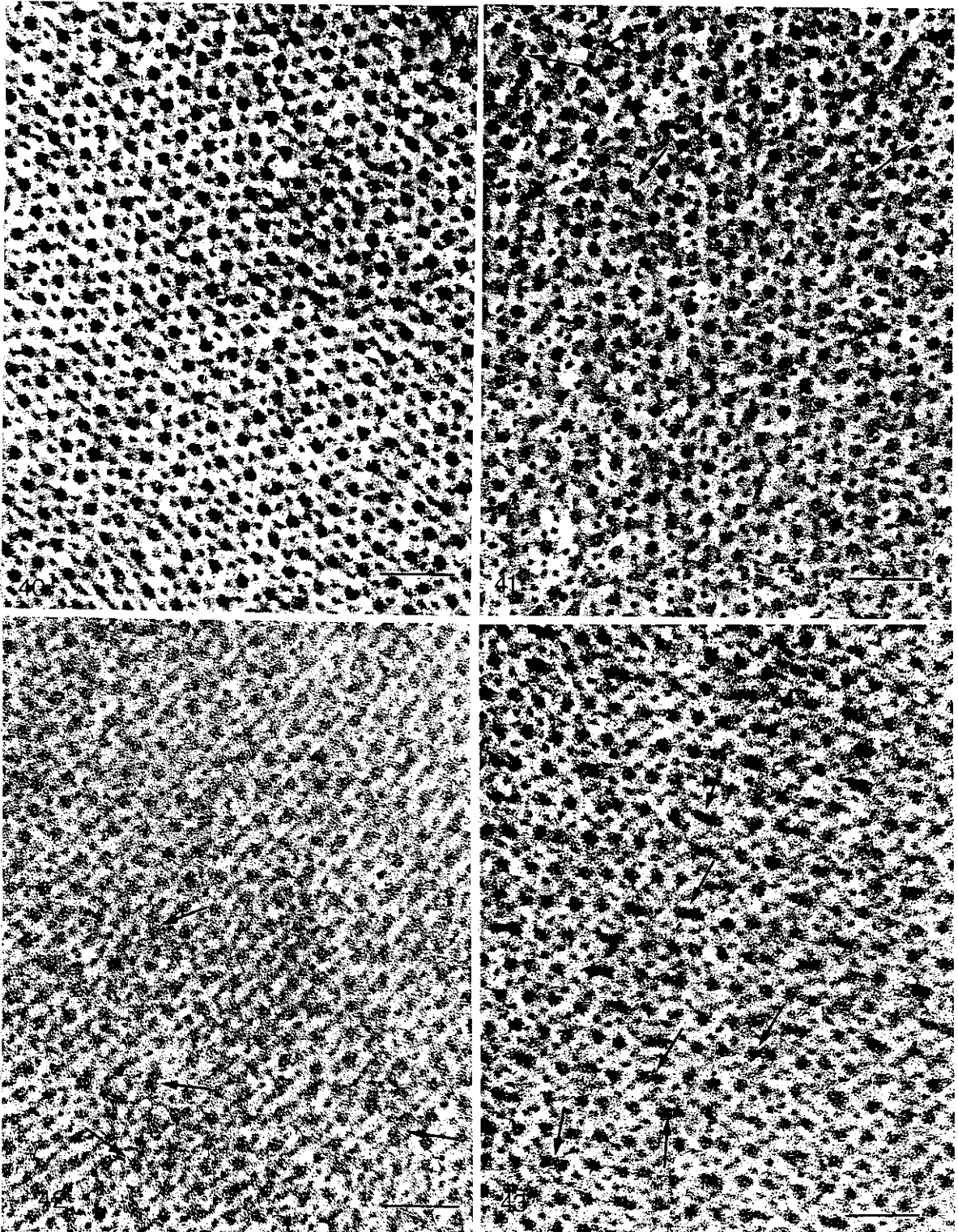
**FIGURA 34.** Sección transversal en la banda A de músculo de bacalao control y almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  5 semanas. La red muestra un elevado grado de regularidad. Barra  $0.09\mu\text{m}$ .

**FIGURAS 35, 36 Y 37.** Micrografías correspondientes a secciones transversales de músculo de bacalao almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  36, 49 y 70 semanas respectivamente. El número de fusiones y acercamiento entre filamentos gruesos incrementan de modo progresivo en función del tiempo. En un elevado número de miofibrillas las fusiones ocurren con una dirección preferente ( $\rightarrow$ ). Los filamentos gruesos muestran una pérdida de cohesión por lo que aparecen más laxos ( $\blacktriangledown$ ). Barras  $0.09\mu\text{m}$ .



**FIGURA 38.** Sección transversal de músculo de bacalao almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  70 semanas. Las fusiones entre filamentos gruesos ocurren en algunas miofibrillas en distintas direcciones ( $\rightarrow$ ). Barra 75nm.

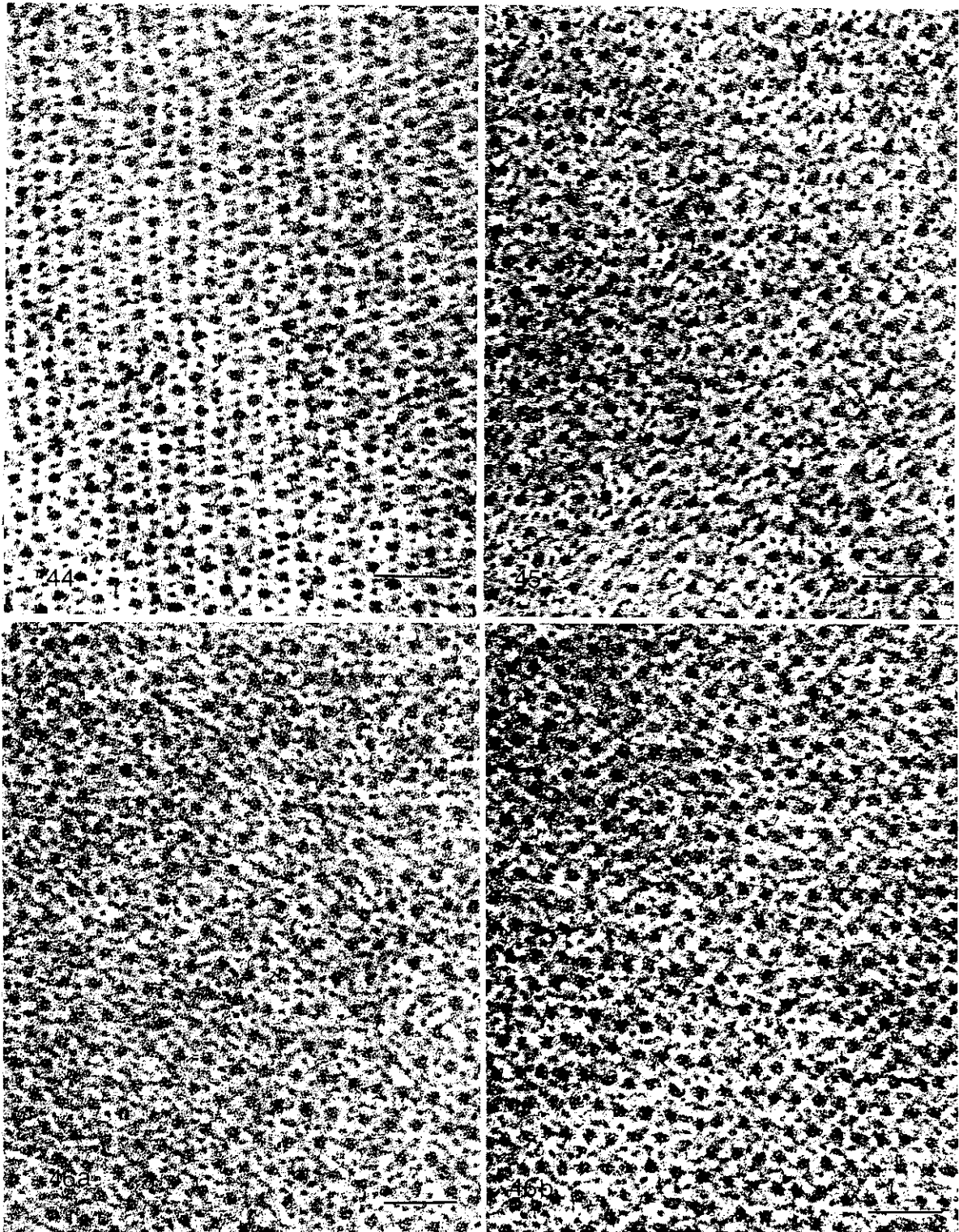
**FIGURA 39 a y b.** Secciones longitudinales de músculo de bacalao almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  5 y 70 semanas respectivamente. Los filamentos gruesos aparecen menos compactos en estadios avanzados de almacenamiento lo que se traduce en un pérdida de definición del filamento grueso y en ocasiones un aumento de su diámetro ( $\rightarrow$ ). Barra  $0.09\mu\text{m}$ .



**FIGURA 40.** Sección transversal en la banda A de músculo de bacalao control y almacenado a  $-30^{\circ}\text{C}$  5 semanas. Filamentos gruesos y finos aparecen organizados en la red convencionalmente. Barra 75nm.

**FIGURAS 41, 42.** Micrografías obtenidas de músculo de bacalao almacenado a  $-30^{\circ}\text{C}$  36 y 49 semanas respectivamente. El tiempo de almacenamiento se manifiesta en un mayor acercamiento entre filamentos gruesos que se refleja en un aumento de excentricidad y aumento de fusiones entre dichos filamentos ( $\rightarrow$ ). Barras 75nm.

**FIGURA 43.** Sección de músculo de bacalao almacenado a  $-30^{\circ}\text{C}$  70 semanas. El aspecto morfológico más significativo se refiere a un aumento del número de fusiones entre filamentos gruesos ( $\rightarrow$ ). Barra 75nm.



**FIGURA 44.** Micrografías de músculo de merluza control y almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  5 semanas. Barra 75nm.

**FIGURA 45.** Sección transversal obtenida de músculo de merluza almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  36 semanas. Obsérvese la elevada regularidad en la disposición de los filamentos gruesos. Fusiones entre filamentos finos son en cambio abundantes y entre éstos y filamentos gruesos. Barra 75nm.

**FIGURA 46 a y b.** Secciones de músculo de merluza almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  63 semanas. Fusiones entre filamentos gruesos son escasas aun existiendo en las miofibrillas signos evidentes de compresión. Apenas se observan diferencias en la morfología de los filamentos gruesos con respecto al control. Barras 75nm.



#### 4. ESTUDIO MORFOMÉTRICO.

El estudio morfométrico permite el seguimiento de la deformación experimentada por la red hexagonal durante el almacenamiento del músculo en congelación. Hay dos factores fundamentales que influyen a la hora de valorar los parámetros de la red. Por un lado en una sección en la que el plano de corte no sea normal al eje de la fibra el patrón hexagonal resulta distorsionado. En tal sección la distancia interfilamento medida a lo largo de los tres ejes principales del hexágono puede ser diferente y más grande o igual del valor real (revisado por Howgate 1979). Por otro lado es conocido que el volumen del sarcómero permanece constante durante la contracción y relajación del mismo por estudios llevados a cabo por Rayos X (Huxley, 1953, Elliot et al 1963, Brand et al 1967) y que la distancia interfilamento varía inversamente con la raíz cuadrada de la longitud del sarcómero. Teniendo en cuenta este principio y puesto que en músculo postrigor la longitud del sarcómero varía de unos a otros, la distancia interfilamento variará en función del sarcómero seleccionado. Por este motivo la deformación de la red hexagonal causada por el almacenamiento en congelación no puede ser estimada midiendo parámetros de la red como por ejemplo el diámetro máximo del hexágono o incluso la distancia interfilamento, puesto que el valor de tal parámetro variará de acuerdo con el grado de contracción postrigor. La evolución de la deformación en función del tiempo de almacenamiento en congelación sería inconsistente.

Para evitar este inconveniente la deformación de la red fue determinada utilizando como parámetro la excentricidad. El valor de la excentricidad indica el grado de deformación, es decir, cuanto mayor sea la deformación mayor será el cambio de excentricidad. El valor de este parámetro es calculado mediante la expresión  $(D_{MAX}^2 - D_{MIN}^2 / D_{MAX}^2)^{1/2}$ , que corresponde a la excentricidad teórica de una elipse cuyo eje mayor es el diámetro máximo del hexágono y el eje más corto se corresponde con el diámetro mínimo de dicho hexágono. A continuación se justificará el procedimiento usado para medir el diámetro máximo y mínimo del hexágono en relación con los ejes de la elipse y por consiguiente el cálculo del valor de la excentricidad.

Un hexágono geoméricamente perfecto puede inscribirse dentro de un círculo siendo el valor de la excentricidad cero. figura A.

De manera análoga un hexágono deformado por aproximación de dos lados que se mantienen paralelos se puede inscribir sobre una elipse como muestra la figura B.

En el empaquetamiento del músculo, los hexágonos formados por los filamentos son cuasiperfectos. Cuando se produce la deformación por la congelación prolongada, esta no es regular. En este caso, en el hexágono deformado de forma irregular se podrían dibujar múltiples elipses que ninguna inscribiría perfectamente al hexágono como muestran las figuras C y D.

Para evitar este problema se definió una elipse de forma que su diámetro mínimo coincidiera con el diámetro mínimo medido en el hexágono y el diámetro máximo de la elipse se correspondiera con el diámetro máximo de dicho hexágono. Utilizando esta expresión sólo es posible dibujar una elipse en cada hexágono deformado aunque la deformación no sea geoméricamente perfecta. Así en el caso de un hexágono perfecto se dibujaría una elipse como la mostrada en la figura E cuyo valor de excentricidad sería 0.5.

Por muy deformado que esté un hexágono (incluso irregularmente) sólo se puede dibujar una única elipse como la mostrada en la figura F.

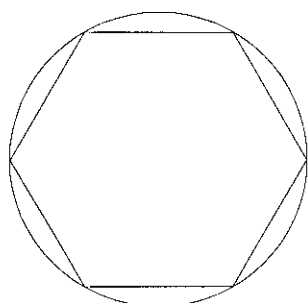


Fig. A

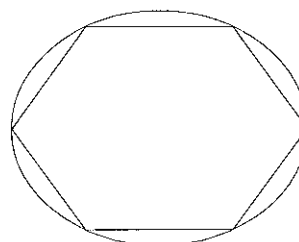


Fig. B

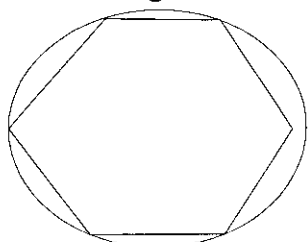


Fig. C

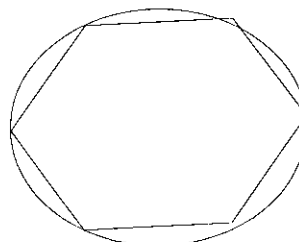


Fig. D

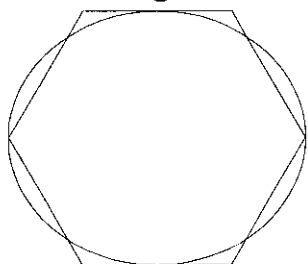


Fig. E

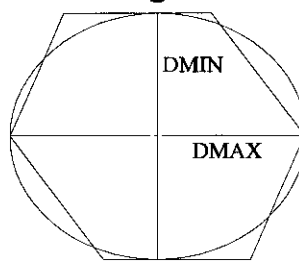


Fig. F

#### 4.1. Estudio morfométrico en fibras musculares de bacalao (*Gadus morhua*) a -20°C y -30°C.

Los valores medios de excentricidad calculados en secciones transversales bien orientadas o en su defecto ligeramente oblicuas en músculos almacenados a -20°C y -30°C en función del tiempo de almacenamiento (0,5,36,49 y 70 semanas) aparecen reflejados en las gráficas IX y X. De ellas se deduce que en músculo de bacalao almacenado a -20°C la excentricidad incrementa en función del tiempo hasta llegar a un punto (49 semanas) más allá del cual se registran incrementos insignificantes en los valores de dicho parámetro. En músculo almacenado a -30°C en cambio, los valores de excentricidad incrementan en función del tiempo ajustándose a una ecuación polinómica de primer orden. Estos datos ponen de manifiesto un incremento del diámetro máximo de los hexágonos en la red en relación al diámetro mínimo durante el almacenamiento

del músculo de esta especie en congelación, datos que pueden ser corroborados en las tablas I y II donde se recogen los valores medios de los diámetros máximo , mínimo y de excentricidad. Sin embargo las diferencias en la distribución de los valores de excentricidad en el mismo intervalo de tiempo para las dos temperaturas ponen de manifiesto una más lenta evolución del sistema en el músculo almacenado a  $-30^{\circ}\text{C}$ .

El estudio estadístico (ANOVA) realizado en músculo de bacalao almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  refleja diferencias significativas entre los valores de excentricidad al comparar grupos de dos en dos en función del tiempo de almacenamiento ( $p<0.05$ ) excepto entre los músculos almacenados 49 y 70 semanas, así como entre el músculo control y el estadio inicial de almacenamiento (5 semanas). Para el músculo almacenado a  $-30^{\circ}\text{C}$  se encontraron diferencias significativas ( $p<0.05$ ) entre pares de grupos con excepción de los grupos pertenecientes a músculos almacenados 36 y 49 semanas y del mismo modo que en músculo almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  tampoco se encontraron diferencias significativas entre el músculo control y el almacenado 5 semanas.

#### **4.2. Estudio morfométrico en fibras musculares de merluza (*Merluccius merluccius*) a $-20^{\circ}\text{C}$ .**

En la figura XI se muestra los valores medios de excentricidad obtenidos en músculo de merluza almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 0, 5, 36 y 63 semanas. Tras las medidas realizadas se observa que los valores de excentricidad no sufren variación en los últimos estadios de almacenamiento, hecho que también refleja el estudio estadístico que no muestra diferencias significativas en los valores de dicho parámetro entre el músculo almacenado 36 y 63 semanas. Diferencias significativas fueron encontradas al comparar el resto de los grupos entre sí. Los valores medios de los diámetros máximo y mínimo así como los de excentricidad aparecen recogidos en la tabla III.

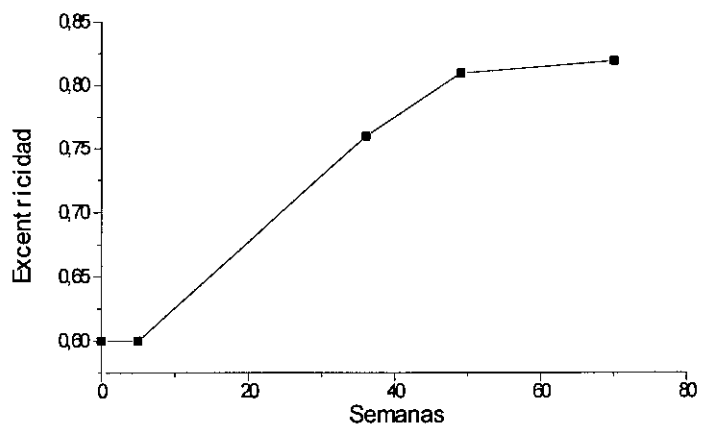


FIGURA IX. Valores de excentricidad de músculo de bacalao a -20°C.

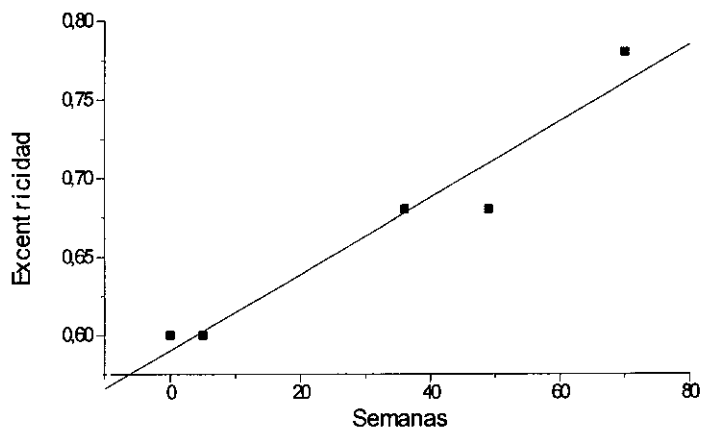


FIGURA X. Valores de excentricidad de músculo de bacalao a -30°C. Coeficiente de regresión lineal  $R=0.97$ .

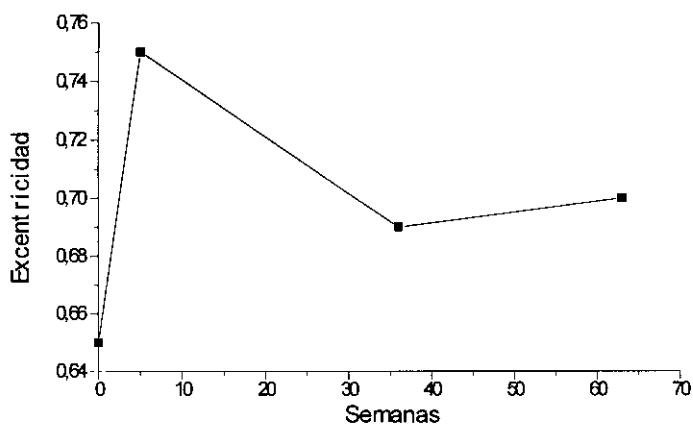


FIGURA XI. Valores de excentricidad de músculo de merluza a -20°C.

**TABLA I.** Estudio morfométrico en músculo de bacalao a -20°C.

Semanas	Diámetro máximo	Diámetro mínimo	Excentricidad
0	66.4±4.9 nm	53.0±4.5 nm	0.60±0.07*
5	67.5±3.5 nm	53.3±2.8 nm	0.60±0.07
36	89.3±6.2 nm	57.5±4.2 nm	0.76±0.06
49	88.5±5.9 nm	50.3±5.7 nm	0.81±0.07
70	86.7±5.0 nm	48.9± 4.8nm	0.82±0.05

**TABLA II.** Estudio morfométrico en músculo de bacalao a -30°C.

Semanas	Diámetro máximo	Diámetro mínimo	Excentricidad
0	66.4±4.9 nm	53.0±4.5 nm	0.60±0.07
5	80.9± 4.0 nm	64.3±3.6 nm	0.60±0.05
36	84.6±5.0 nm	60.9±4.2 nm	0.68±0.06
49	75.5±5.8 nm	54.1±4.6 nm	0.68±0.08
70	77.2±7.0 nm	47.5±7.3 nm	0.78±0.08

**TABLA III.** Estudio morfométrico en músculo de merluza a -20°C.

Semanas	Diámetro máximo	Diámetro mínimo	Excentricidad
0	77.0±5.4 nm	58.9±4.5 nm	0.65±0.09
5	72.9±5.4 nm	47.6±3.2 nm	0.75±0.06
36	75.4±6.8 nm	53.0±4.4 nm	0.69±0.08
63	78.5±6.6 nm	54.8±5.5 nm	0.70±0.09

\*Valores de desviación estándar

Los valores de excentricidad mostrados en estas tablas representan el valor medio de las excentricidades individuales de cada hexágono medido y no son el resultado de obtener la excentricidad desde los valores medios de los diámetros máximos y mínimos.

## 5. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.

El estudio inmunohistoquímico se llevó a cabo en músculo de bacalao (*Gadus morhua*) a -20°C en función del tiempo de almacenamiento utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra la cadena pesada de la molécula de miosina de fibras musculares tipo II.

En las figuras XII y XIII se muestran los resultados correspondientes a dos experimentos independientes en los que las condiciones de trabajo fueron idénticas.

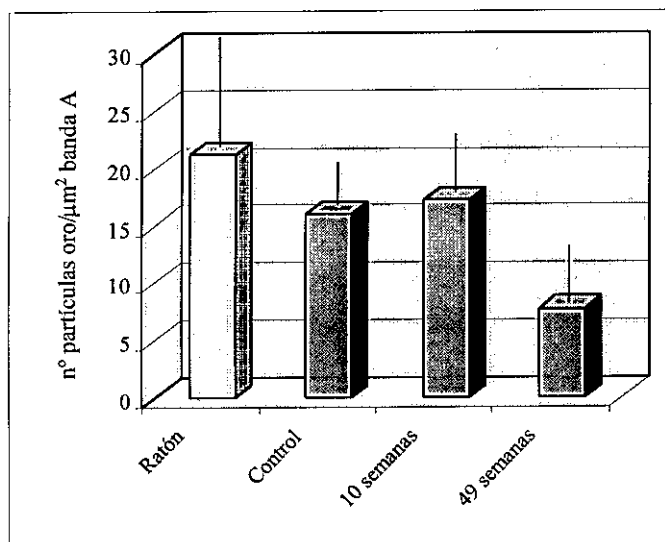
En primer lugar cabe destacar diferencias cuantitativas en la densidad de marcaje obtenido en ambos estudios. Así el marcaje obtenido en la figura XII es superior en un 20-40% al observado en la figura XIII al comparar los resultados de cada especie y estadio de almacenamiento individualmente.

El análisis de los datos permite observar dentro de cada grupo experimental una correlación en el marcaje obtenido entre las distintas especies y estadios. La estimación cuantitativa del marcaje indica que la densidad de partículas de oro (nº de partículas de oro/ $\mu\text{m}^2$ ) detectado en la banda A en fibras musculares de ratón utilizado como control positivo es superior al encontrado en músculo de bacalao control (congelado sin almacenar).

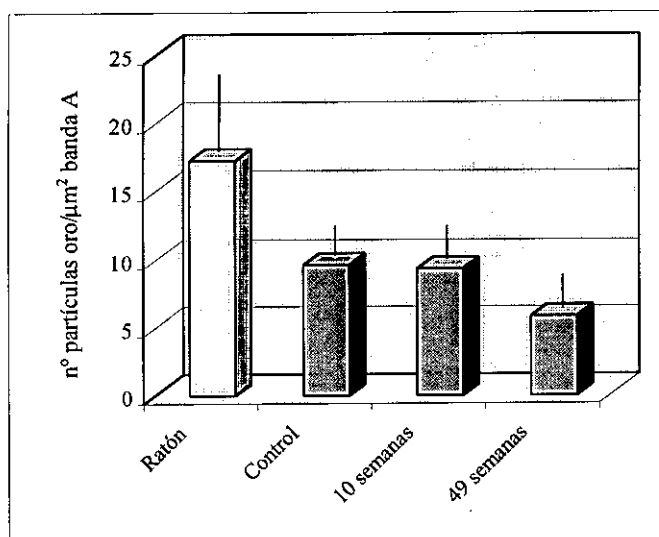
En músculo de bacalao durante los primeros estadios de almacenamiento (10 semanas) no se observan diferencias significativas en el porcentaje de marcaje obtenido con respecto al músculo de bacalao control. Las figuras XII y XIII muestran que la densidad de marcaje disminuye significativamente en periodos largos de almacenamiento en congelación ( $p < 0.001$ ) de modo que el porcentaje del epitopo detectado por el anticuerpo en la banda A de músculo almacenado 49 semanas es aproximadamente el 50% del obtenido en el músculo de bacalao control y en el almacenado 10 semanas. Las figuras 47 y 48 muestran el marcaje obtenido en músculo de bacalao utilizado como control.

Las diferencias en el número de partículas de oro reflejadas en el estudio

cuantitativo pueden observarse en las figuras 49 y 50 que muestran de forma representativa la densidad de marcaje obtenido en músculo de bacalao almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 49 semanas.

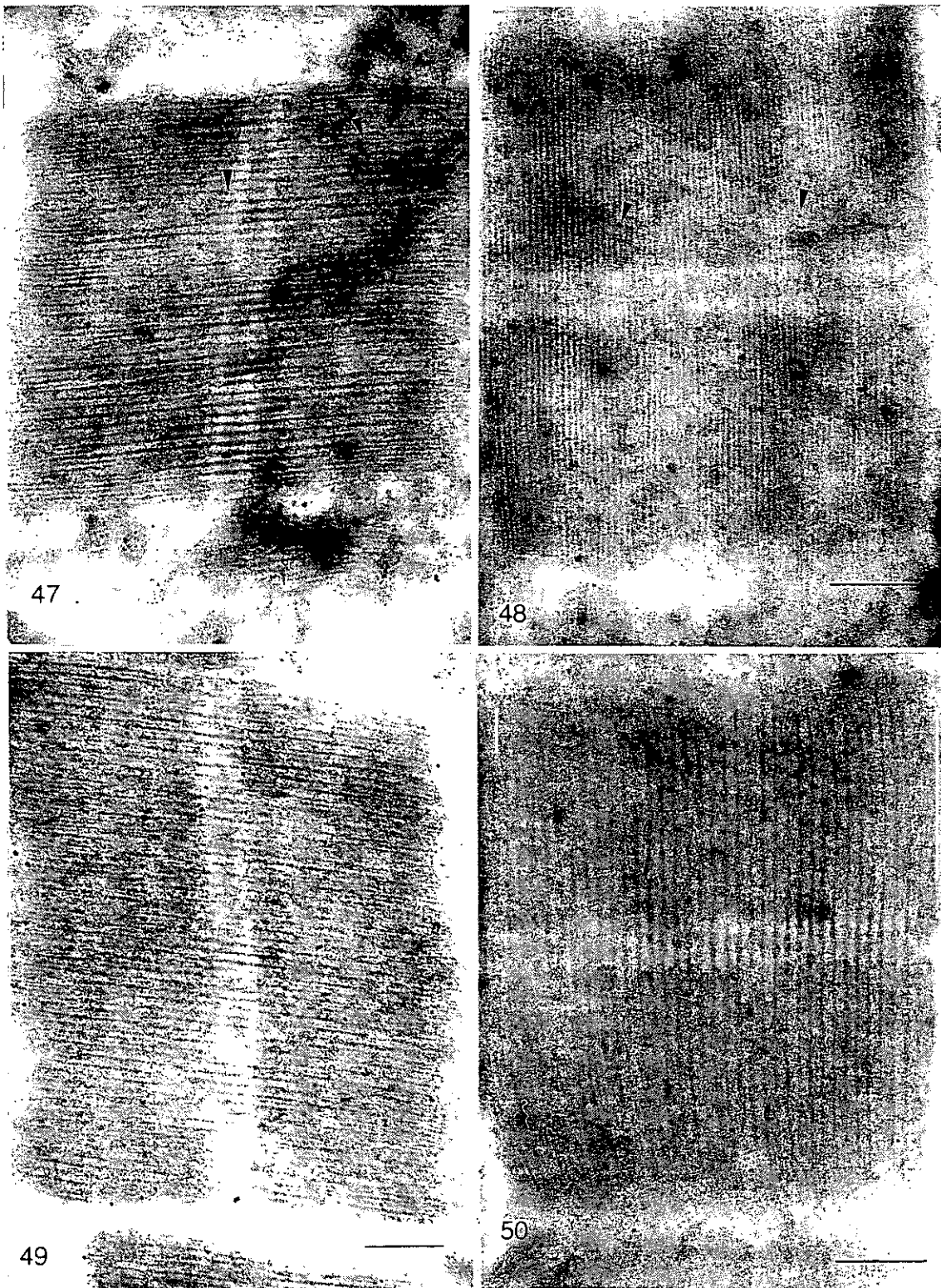


**FIGURA XII.** Estudio inmunohistoquímico llevado a cabo en músculo de ratón y de bacalao control y almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  10 y 49 semanas. Las barras representan los valores de desviación estándar.



**FIGURA XIII.** Estudio inmunohistoquímico equivalente al llevado a cabo en la figura XII.





FIGURAS 47 Y 48. Marcaje con oro coloidal (▼) obtenido en músculo de bacalao control. Barras 0.25μm.

FIGURAS 49 Y 50. Micrografías representativas de la densidad de partículas de oro observada en fibras musculares de bacalao tras el almacenamiento del músculo a -20°C durante 49 semanas. El número de antígenos reconocidos por el anticuerpo dirigido contra la cadena pesada de la molécula de miosina disminuye significativamente en estadios avanzados de almacenamiento. Barras 0.25μm.

## 6. ESTUDIO AUTORADIOGRÁFICO SOBRE EL EFECTO DEL FORMALDEHÍDO EN MUSCULO IN SITU.

El estudio autorradiográfico tiene por objeto localizar el formaldehído marcado con  $C^{14}$  que se inyectó en músculo de bacalao. Tras la inyección del isótopo radiactivo y su posterior almacenamiento durante 5 meses a  $-10^{\circ}C$  el músculo fue tratado con CIK y SDS, agentes que permitieron la extracción de parte de las proteínas miofibrilares quedando un residuo insoluble sobre el que se llevó a cabo la autorradiografía.

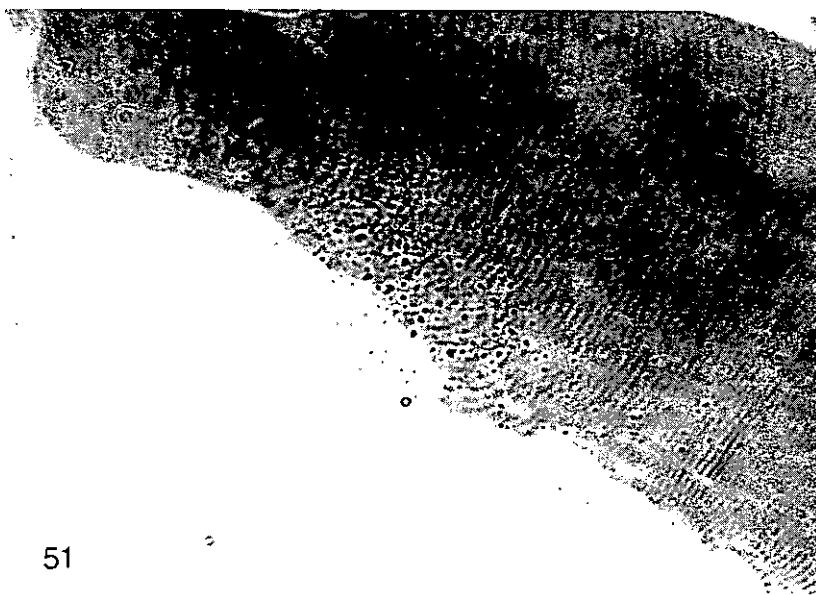
La ventaja de llevar a cabo el estudio autorradiográfico sobre dicha fracción insoluble frente a filetes inyectados con el isótopo estriba en que de esta manera se consigue reducir la cantidad de material objeto de estudio. De esta manera aumenta la probabilidad de detectar el compuesto radiactivo, dado que el tamaño de las muestras a procesar no supera los 2mm. Además de manera complementaria se realizó un conteo de actividad para asegurar la presencia del material radiactivo en dicha fracción insoluble detectándose una actividad de 0.905 K bq/g. La autorradiografía a microscopía óptica se realizó de manera preliminar con la finalidad de detectar el isótopo en las secciones semifinas, condición indispensable para poder abordar posteriormente el estudio por microscopía electrónica. Morfológicamente los cortes semifinos de la fracción insoluble muestran fragmentos de fibras musculares en los que se detecta el bandeo correspondiente a los restos sarcoméricos resistentes a la extracción con los agentes solubilizantes CIK y SDS. El  $^{14}COH_2$  es detectado asociado a áreas dentro de algunos de estos fragmentos musculares formando acúmulos de granos de plata. figuras 51 y 52.

En otras zonas el marcaje radiactivo que aparece es muy similar al observado fuera del tejido que es considerado ruido de fondo, tratándose por tanto de un marcaje inespecífico.

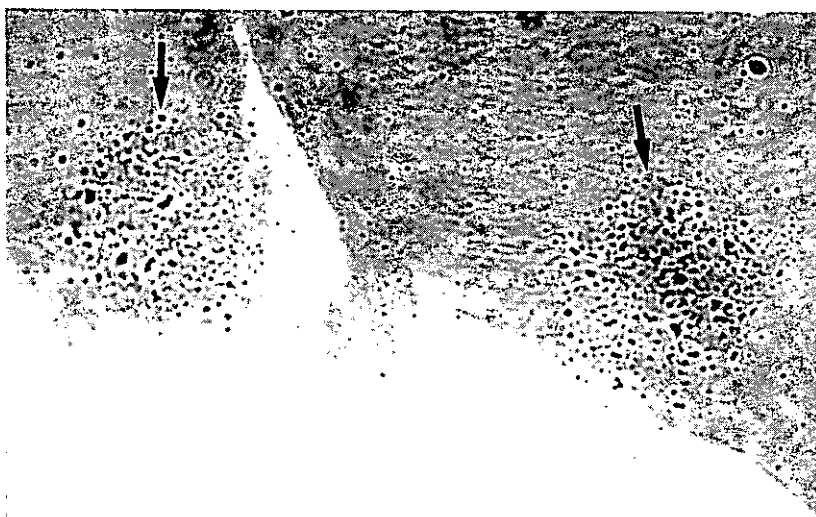
La autorradiografía sobre las secciones ultrafinas permite observar con mayor detalle el lugar donde el formaldehído es detectado por la emulsión fotográfica dentro de los residuos musculares. Este aparecía asociado a restos proteicos desorganizados en

los que resulta imposible identificar alguna estructura sarcomérica como se aprecia en las micrografías mostradas en las figuras 53 y 54. A mayores aumentos se observa que dichos restos proteicos aparecen formando agregados en los que es posible identificar estructuras semejantes a las encontradas en agregados observados en los estudios de sobrenadantes como se observa en las figuras 55 y 56 que corresponden a fragmentos pertenecientes a células musculares diferentes. Asimismo dentro de estas áreas marcadas con el isótopo radiactivo es posible identificar zonas bandeadas que recuerdan restos de banda A altamente desorganizadas como muestran las regiones señaladas en las figuras 57 y 58. El formaldehído detectado en estas áreas se encuentra asociado a proteínas que han resultado resistentes a la extracción llevada a cabo por el CIK y el SDS, agente que actúa rompiendo uniones secundarias y representa sólo un 0.1 % del formaldehído inyectado inicialmente al músculo, por lo que se debe pensar que el resto del porcentaje del formaldehído en parte no haya interactuado con el músculo y por otro lado haya sido extraído por el SDS encontrándose asociado a las proteínas que han sido afectadas por este agente.

En otras áreas donde los restos musculares no presentan marcaje alguno, éstos se encuentran organizados formando estructuras sarcoméricas bien definidas donde se identifican la banda A y la línea Z, todas ellas aparentemente como resultado de una menos efectiva extracción llevada a cabo por los agentes solubilizantes (figuras 59 y 60).

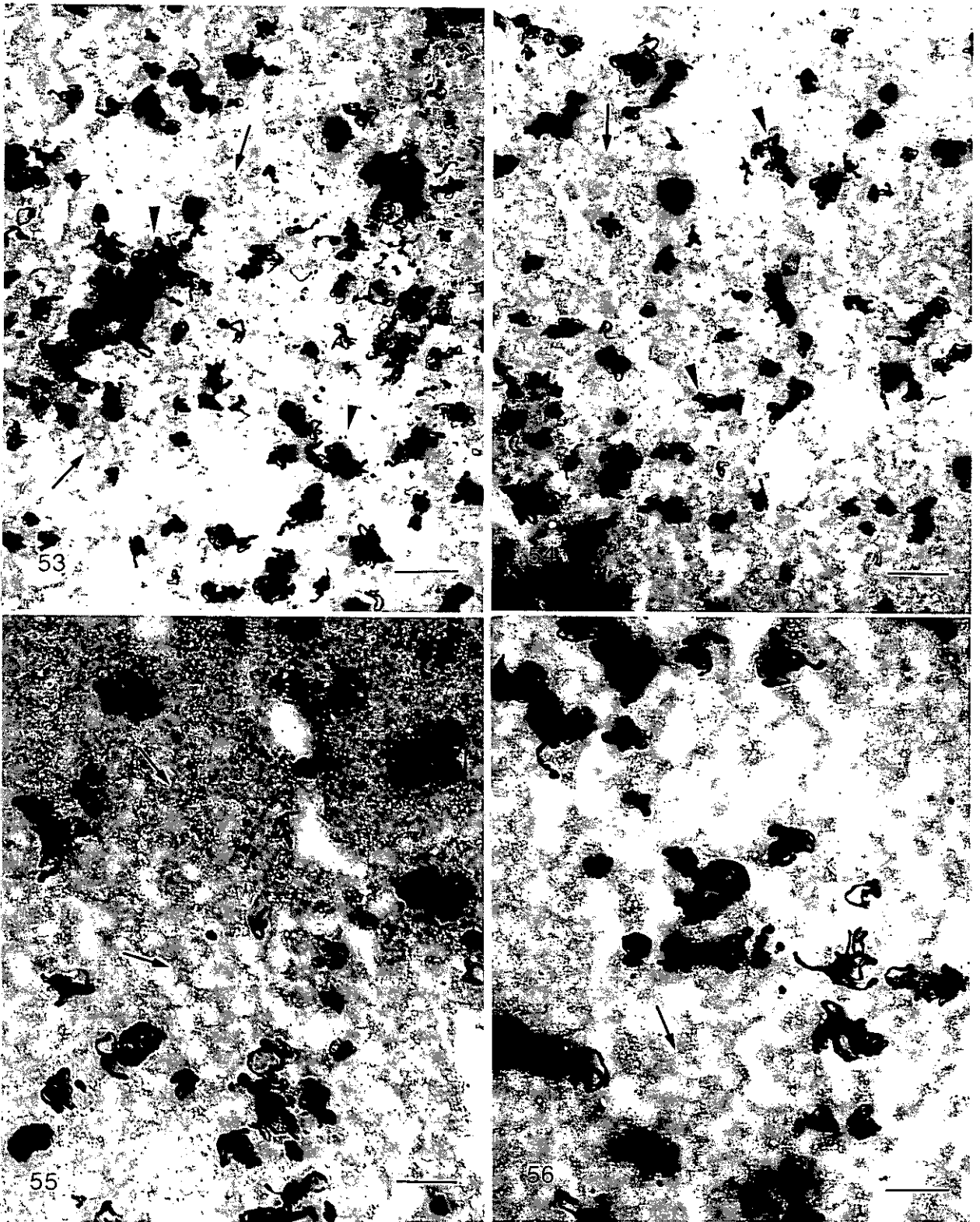


51



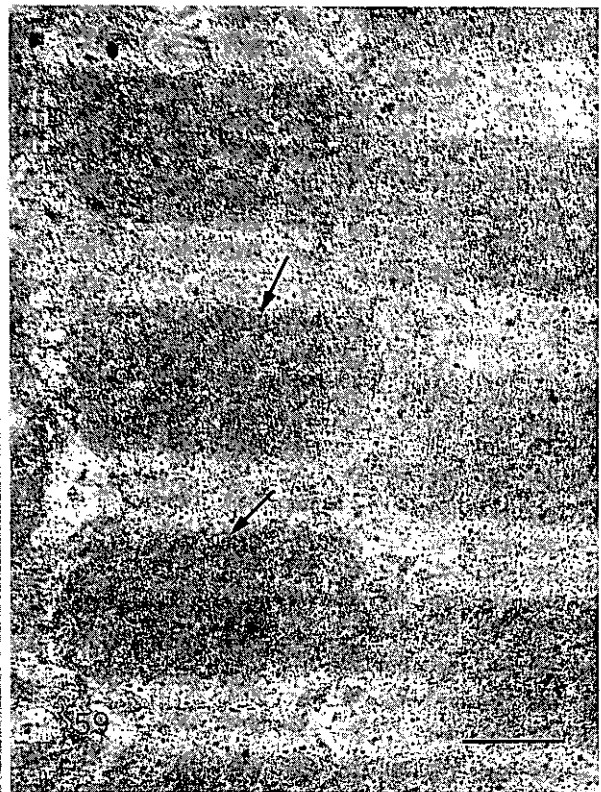
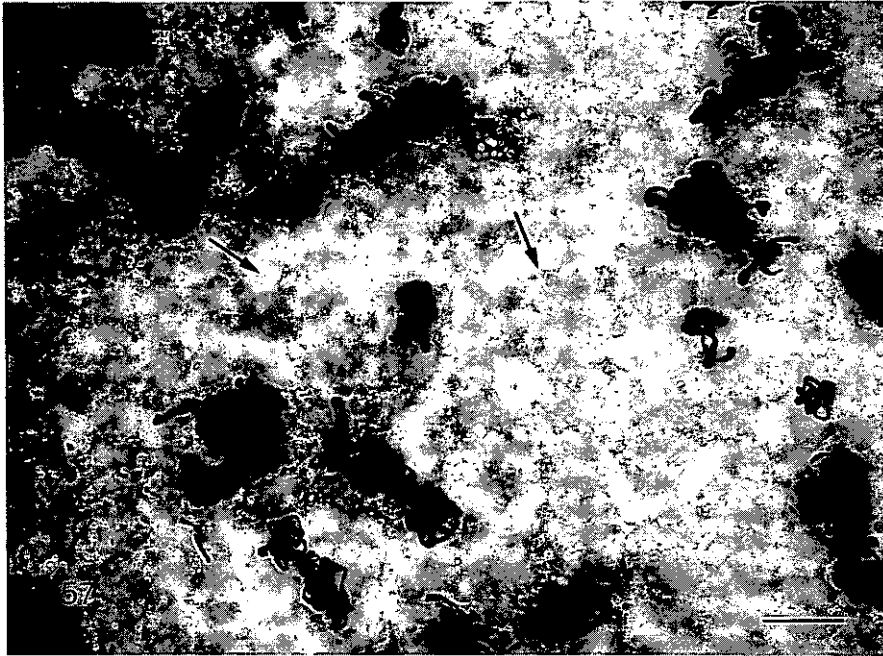
52

**FIGURAS 51 y 52.** Autorradiografía realizada sobre secciones semifinas de la fracción insoluble obtenida tras el tratamiento con CIK y SDS de músculo de bacalao inyectado con formaldehído marcado con  $^{14}\text{C}$  y almacenado posteriormente a  $-10^{\circ}\text{C}$  5 meses. El marcaje se detecta en determinadas áreas del residuo en forma de acúmulos de granos de plata ( $\rightarrow$ ). x 5.000.



**FIGURAS 53 y 54.** Micrografías obtenidas de la autorradiografía realizada sobre secciones ultrafinas de la fracción insoluble en CIK y SDS. El formaldehído (▼) aparece asociado a restos proteicos desorganizados en los que no se observan estructuras sarcoméricas definidas (→). Barras 1.1µm.

**FIGURAS 55 Y 56.** Microscopía electrónica de transmisión a mayores aumentos de áreas de la fracción insoluble en las que se detecta el isótopo. Los restos proteicos con los que aparece interaccionando el formaldehído se encuentran formando agregados de morfología semejante a los encontrados en los estudios de extractos solubles (→). Barras 0.6µm.



**FIGURA 57.** Áreas de la fracción insoluble en las que se detecta el compuesto radiactivo tras la autorradiografía por microscopía electrónica. En algunos restos de sarcómeros a los que se encuentra asociado el isótopo se observan estructuras que recuerdan restos de banda A muy desorganizados (→). Barra 0.6µm.

**FIGURAS 58 y 59.** Micrografías correspondientes a zonas de la fracción insoluble en las que el formaldehído no aparece interaccionando con las proteínas. En estas áreas los restos musculares presentan estructuras sarcoméricas altamente organizadas (→). Barras 0.6µm.



## **DISCUSIÓN.**

---

Las alteraciones en las proteínas de músculo durante la congelación y el almacenamiento del mismo han sido atribuido por los investigadores a un fenómeno de desnaturalización a pesar de la complejidad que entraña el término por la globosidad de conceptos que se asocian a él ya que los modelos propuestos al respecto incluyen cambios de conformación de las proteínas, disociación de F-actomiosina a G-actomiosina seguida por un más bajo grado de disociación de esta última dentro de sus componentes y en relación o independientemente con lo anteriormente descrito fenómenos de agregación proteica. Nuestros estudios por microscopía electrónica basados en el análisis de extractos solubles y residuos insolubles en sal y agentes reductores de distintos tipos de enlaces químicos así como los estudios morfológicos llevados a cabo sobre músculo in situ permiten abordar distintos aspectos en relación con la problemática anteriormente planteada.

La agregación aparece confirmada por la evolución morfológica de las proteínas presentes en los extractos solubles en sal de modo general independientemente de la temperatura y especies consideradas.



Por un lado en dicha agregación aparecen implicados los filamentos de actina que en ambas especies no presentan la estructura en punta de flecha desde los primeros estadios. El más bajo contenido en miosina a lo largo de los filamentos de actomiosina en función del tiempo de almacenamiento en congelación es un fenómeno descrito por Jarenbäck y Liljemark (1975b). Aun teniendo en cuenta la temperatura de almacenamiento más desfavorable ( $-10^{\circ}\text{C}$ ), estos autores encontraron que a las 33 semanas podían identificarse moléculas de miosina ancladas a filamentos de actina extraídos de músculo de bacalao, lo que refleja que en nuestro estudio tienen lugar importantes cambios en las propiedades de la miosina en los que no se encuentra implicado directamente el proceso de almacenamiento en congelación. Los filamentos de actina evolucionan en función del tiempo interaccionando en las fracciones solubles en sal con ángulos entre  $90-106^{\circ}$  y formando parte de estructuras incipientes en forma de anillo que evolucionan hacia la formación de agregados de mayor tamaño que contienen dichas estructuras en mayor número y con una mayor definición morfológica. Por otro lado se detecta la presencia de acúmulos proteicos constituidos por fragmentos de morfología equivalente a agregados de la molécula de miosina visualizados por Sharp y Offer (1992). Ambos elementos aparecen interrelacionados y conjuntamente contribuyen a formar parte de los agregados de gran tamaño en los que predominan las estructuras en forma de anillo que se han descrito en los últimos estadios de congelación, cuya organización resulta difícil de determinar por la complejidad del sistema, pérdida de morfología de las proteínas implicadas y densa apariencia de tales agregados que sugiere una agregación compleja de actina y miosina. La evolución de los extractos desde músculo fresco donde predominan filamentos de actomiosina individuales hasta la formación de agregados de alta densidad en músculo congelado fueron asimismo descritos por Jarenbäck y Liljemark (1975b). Una evolución similar fue propuesta por Matsumoto (1980) a partir del análisis por microscopía electrónica de preparaciones de actomiosina aislada de músculo.

La visualización por microscopía electrónica de las proteínas extraídas con SDS y ME en este estudio básicamente coinciden morfológicamente independientemente de la especie y temperatura de conservación consideradas apareciendo en forma agregada

mostrando estructuras en forma de anillo sin morfología definida en el sentido de que especie molecular alguna puede ser identificada en las que se observan acúmulos proteicos que en un elevado porcentaje pueden estar constituidos por agregados de moléculas de miosina. La aparición más temprana con anterioridad a las 14 semanas de dichas estructuras en los sobrenadantes  $S_1$ ,  $S_2$  y  $S_3$  en músculo de merluza permite atribuir a esta especie una mayor velocidad en el fenómeno de agregación.

El fenómeno de agregación aparece asimismo confirmado en nuestros estudios tal y como describió Jarenbäck y Liljemark (1975b) por un mayor grado de integridad de las estructuras sarcoméricas presentes en la fracción insoluble en sal en función del tiempo. La evolución de dicho fenómeno es dependiente en primer lugar de la especie, de modo que en merluza el fenómeno de agregación aparece más tempranamente con respecto a bacalao por la aparición desde el control de fracciones insolubles en sal, mientras que la aparición de dichas fracciones insolubles no ocurre de modo significativo hasta la semana 22 en músculo de bacalao. La agregación parece ralentizarse en el músculo de merluza a partir de la semana 14 en ambas temperaturas por la aparición de estructuras sarcoméricas equivalentes en densidad y morfología en los agregados  $P_1$ , hecho a su vez corroborado por las cuantificaciones bioquímicas. Además esta escasa diferencia en la morfología de las fracciones insolubles en sal se correlaciona con escasos cambios en los enlaces implicados en la agregación como posteriormente se justificará.

Por el contrario en músculo de bacalao existe una evolución efectiva del fenómeno de agregación que en músculo picado se traduce en estructuras sarcoméricas altamente organizadas en las fracciones insolubles  $P_1$  en los últimos estadios de almacenamiento, mientras que en músculo almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  aunque no existen diferencias significativas en la morfología de la banda A de los residuos insolubles en sal ni en los valores de extractabilidad a partir de la semana 36, sí existen variaciones en la naturaleza química de la agregación como ponen de manifiesto las variaciones morfológicas de los residuos  $P_2$  y  $P_3$  resultantes del tratamiento de la fracción insoluble en sal progresivamente con SDS y SDS+ME.

Intraespecíficamente debe tenerse en cuenta el grado de integridad del músculo y temperatura como muestra el hecho de que el músculo almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  muestra una menor organización de los sarcómeros encontrados en las fracciones  $P_1$  con respecto al músculo picado y el hecho de que en músculo almacenado a  $-30^{\circ}\text{C}$  aun en la semana 63 el precipitado  $P_1$  mostraba bandas A de escasa densidad y organización morfológica con respecto al músculo almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Por el contrario en músculo de merluza la temperatura no ejerce un efecto tan marcado puesto que no se observan diferencias significativas en relación a la morfología de las fracciones insolubles  $P_1$  a  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $-30^{\circ}\text{C}$ .

Se ha realizado gran esfuerzo en establecer la naturaleza de las reacciones químicas en las que aparecen implicadas las proteínas miofibrilares. La mayoría de las aproximaciones se basan en estudios bioquímicos de extractabilidad tras el tratamiento progresivo con agentes que hidrolizan determinados tipos de enlaces químicos. Uno de los problemas asociados a dichos estudios radica en la imposibilidad de analizar desde el punto de vista bioquímico las fracciones insolubles. Por ello la microscopía electrónica de transmisión constituye una herramienta útil que permite obtener información directa sobre la evolución química de la agregación a través del estudio comparativo de las fracciones insolubles obtenidas tras el tratamiento progresivo de la fracción insoluble  $P_1$  con los agentes solubilizantes SDS y ME.

Los resultados obtenidos permiten establecer la importancia de la participación de enlaces de naturaleza secundaria así como de naturaleza covalente disulfuro y otros de naturaleza no disulfuro en la agregación de ambas especies a excepción del músculo de bacalao almacenado a  $-30^{\circ}\text{C}$  que muestra escasa participación de enlaces de naturaleza covalente en el intervalo de tiempo analizado (63 semanas). Un análisis más detallado muestra la importancia de considerar distintos parámetros (grado de integridad del músculo, temperatura y especie) que influyen de manera vital en la naturaleza química de la agregación y la evolución de dicho proceso.

En músculo picado de bacalao así como en el almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  los enlaces de naturaleza secundaria juegan un papel fundamental en la agregación en el primer

periodo de almacenamiento, mientras que una contribución más importante de enlaces de naturaleza covalente aparece en estadios más avanzados de congelación. Correlativamente en el tiempo los enlaces de naturaleza disulfuro aparecen previamente hecho que se manifiesta en que a las 36 semanas el mercaptoetanol es capaz de solubilizar los agregados  $P_2$  en su totalidad en caso del músculo almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . En este periodo de tiempo el músculo picado muestra escasos restos proteicos en la banda A en el residuo  $P_3$ . Posteriormente la presencia de bandas A de mayor densidad y organización en las fracciones insolubles  $P_3$  progresivamente a partir de la semana 36 como resultado de una inefectiva extracción llevada a cabo por el mercaptoetanol hace pensar en una mayor contribución de otros enlaces de naturaleza covalente no disulfuro en el proceso de agregación en el último periodo de almacenamiento.

La temperatura parece ser de vital importancia en músculo de bacalao sobre la naturaleza de los enlaces implicados en la agregación, puesto que el músculo de bacalao almacenado a  $-30^{\circ}\text{C}$  muestra participación fundamental de enlaces de naturaleza secundaria, manifestándose la presencia incipiente de enlaces covalentes disulfuro a las 49 y 63 semanas. Desde el punto de vista cualitativo la escasa densidad de material presente en los sarcómeros de las fracciones  $P_1$  y  $P_2$  a las 49 semanas con respecto al músculo almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  demuestra la participación de un menor número de enlaces de naturaleza secundaria y disulfuro en la agregación.

En músculo de merluza los enlaces de naturaleza secundaria, covalentes disulfuro y no disulfuro aparecen claramente implicados en la agregación. La evolución paralela de las fracciones insolubles a las dos temperaturas hace pensar en una menor influencia de este parámetro en la naturaleza de los enlaces formados durante la congelación en esta especie aunque la aparición de enlaces covalentes no disulfuro es algo posterior en músculo almacenado a  $-30^{\circ}\text{C}$  (semana 22).

En este estudio aparecen diferencias interespecíficas importantes reflejadas en el diferente comportamiento de la merluza frente a los distintos agentes. Enlaces de naturaleza secundaria se detectan en merluza desde el control. La aparición de enlaces covalentes se produce tempranamente con respecto al bacalao. En músculo de merluza

almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  en la semana 14 se detecta la presencia de enlaces de naturaleza covalente disulfuro y no disulfuro que permiten observar fracciones insolubles  $P_2$  y  $P_3$  equivalentes en morfología y densidad a las encontradas en músculo de bacalao a esta temperatura por encima de las 49 semanas. Sin embargo apenas se detecta modificación de los enlaces implicados en la agregación como pone de manifiesto la semejanza encontrada en las micrografías de las fracciones  $P_2$  y  $P_3$  a partir de la semana 14 de almacenamiento.

Una de las dudas que se planteó durante el trabajo experimental fue que las condiciones de extracción de las fracciones insolubles  $P_1$  con SDS no fueran suficientemente agresivas y que dichas fracciones insolubles residuales  $P_2$  resultantes no fuesen debidas a la presencia de enlaces covalentes sino a la incapacidad del SDS de romper la totalidad de los enlaces de naturaleza secundaria. Para comprobar dicha hipótesis se plantearon unos experimentos complementarios, no incluidos en nuestros resultados, en los que las fracciones  $P_1$  se trataban con agentes capaces de hidrolizar enlaces de naturaleza secundaria más agresivos (urea 8M y SDS 5%) obteniéndose igualmente restos proteicos en la banda A resistentes a la extracción que demostraban la presencia de enlaces covalentes.

La presencia de enlaces de naturaleza secundaria en la agregación ha sido ampliamente aceptada incluidas las especies objeto de estudio (Connell 1965, Tsuchiya 1980, Lim y Haard 1984). Mayor controversia reviste el aceptar la participación de enlaces de naturaleza covalente dada la variabilidad de los resultados obtenidos por los distintos autores. La evidencia de que puentes disulfuro contribuyen a la agregación se obtuvo al encontrar que la adición de agentes que reducen los puentes disulfuro reducía la insolubilización de las proteínas durante la congelación (Lim y Haard 1984) y por medida directa de la cisteína libre en las proteínas agregadas (Mao y Sterling 1970, Lim y Haard 1984).

Nuestros resultados parecen contradecir aquellos obtenidos por Connell (1965) quien concluye que la mayoría de los enlaces intermoleculares que se forman entre proteínas miofibrilares en músculo de bacalao son de naturaleza secundaria. No obstante

sus estudios se extienden exclusivamente hasta la semana 29, mientras que en los nuestros en músculo de bacalao a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta la semana 36 no es evidente la presencia de enlaces covalentes. En estudios posteriores extensivos hasta la semana 52 llevados a cabo por este autor se pone de manifiesto un incremento en la concentración de proteína no extraída con SDS. Además la solubilización en SDS no prueba la ausencia de enlaces covalentes, puesto que agregados proteicos en los que existan enlaces covalentes pueden ser solubles en este agente. Así Matthews et al. (1980) encontraron agregados de alto peso molecular en músculo picado de bacalao que no entraban en los geles de poliacrilamida involucrando a la miosina en la agregación a través de la formación inicial de puentes disulfuro, seguido en un estadio posterior por la formación de otros enlaces covalentes hasta que la miosina resultaba totalmente agregada por estos últimos enlaces. Owusu y Hultin (1987) encontraron asimismo que un 2% de la proteína total estaba compuesta por agregados de alto peso molecular que estaban compuestos por enlaces covalentes de naturaleza no disulfuro.

En otras especies Lim y Haard (1984) después de la solubilización en SDS y ME encontraron agregados de alto peso molecular de entre aproximadamente  $5 \cdot 10^5$ - $10^6$  daltons que representaban un porcentaje significativo del residuo insoluble en sal, resultados que indicaban la formación de enlaces covalentes de naturaleza disulfuro con una consiguiente disminución de los grupos SH así como la participación de otros enlaces covalentes como las bases de Schiff en la agregación.

Tsuchiya et al., 1980 en un sistema modelo con actomiosina aislada concluye la formación de enlaces de naturaleza iónica, puentes de hidrógeno, hidrofóbicos y disulfuro.

En nuestro estudio se han detectado además la presencia de agregados de naturaleza covalente no disulfuro tras el análisis bioquímico de los sobrenadantes. Al estudiar los perfiles electroforéticos de las fracciones  $S_1$ ,  $S_2$  y  $S_3$  en ambas especies del Mazo (1997) observó un incremento en la intensidad del pico 1 en función del tiempo debido a un aumento de los agregados solubles de alto peso molecular en esta fracción formada por proteínas agregadas por enlaces de naturaleza covalente no disulfuro.

Un segundo aspecto que puede ser abordado a partir de nuestro estudio de las fracciones insolubles se refiere a las proteínas implicadas en el proceso de agregación así como el nivel y mecanismo por el que tiene lugar dicho fenómeno a partir del análisis morfológico de las proteínas resistentes a la extracción con los distintos agentes.

En nuestro estudio la agregación se manifiesta fundamentalmente en variaciones morfológicas en la banda A en relación a variaciones en la densidad de material proteico retenido en dicha banda o en la morfología de los filamentos gruesos, hechos que se atribuyen a la formación de enlaces en las que se encuentran implicadas moléculas de miosina. La implicación de la miosina en la agregación había sido descrita en estudios ultraestructurales previos por Jarenbäck y Liljemark (1975b). Estos autores observaron en sus estudios de residuos insolubles en sal una mayor retención de la banda A que atribuyeron a una progresiva agregación de moléculas de miosina dentro de los filamentos gruesos. Asimismo numerosos estudios bioquímicos confirman la agregación entre las moléculas de miosina Buttkeus (1970, 1971, 1974), Matthews et al. (1980), Ang y Hultin (1989), del Mazo (1997).

A pesar de ser un hecho que la miosina se agrega, el diferente aspecto morfológico encontrado en la banda A de las fracciones insolubles en sal de los distintos especímenes hace pensar que el mecanismo o nivel al que tiene lugar la agregación entre las moléculas de miosina sea distinto en función de una serie de parámetros.

Las bandas A de los residuos insolubles en sal pertenecientes a músculo de bacalao almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 36 semanas muestra restos proteicos escasamente organizados formando filamentos gruesos. Incluso en el estadio más avanzado de almacenamiento tampoco se observa un predominio de tales filamentos. No ocurre así en músculo de merluza a  $-20^{\circ}\text{C}$  que incluso a las 14 semanas muestra en las bandas A de los residuos miofibrilares en sal un aspecto más organizado debido a la presencia de filamentos gruesos claramente identificables. Este hecho aparece también reflejado al comparar las fracciones  $P_2$  de músculo de merluza a  $-20^{\circ}\text{C}$  que muestran asimismo filamentos gruesos menos afectados en la banda A tras el tratamiento del precipitado  $P_1$  con SDS con respecto a la fracción  $P_2$  de músculo de bacalao a esta temperatura. Este

fenómeno puede asimismo observarse al comparar las fracciones insolubles de ambas especies almacenadas a  $-30^{\circ}\text{C}$ .

Estos resultados permiten hipotetizar que en merluza exista un predominio de agregación intermolecular entre moléculas de miosina a nivel intrafilamento desde estadios tempranos de almacenamiento, en los que además puede existir una notable participación de enlaces covalentes que se traduzca en un mayor empaquetamiento de las moléculas de miosina en el filamento grueso que impidan su disolución tras la acción de los agentes solubilizantes. En músculo de bacalao aunque existe una mayor contribución de agregación de miosina por la formación de enlaces entre filamentos gruesos como demuestran los estudios morfológicos no se puede descartar la participación de enlaces entre moléculas de miosina intrafilamento. Las diferencias morfológicas observadas en los residuos insolubles pueden ser explicadas por la existencia de un mecanismo de desnaturalización diferente en ambas especies que refleje asimismo el diferente ritmo de agregación observado entre ellas. Si se supone que en bacalao no existe un predominio en los primeros estadios de almacenamiento de agregación sino un predominio del fenómeno de desnaturalización entendiéndolo como tal alteraciones de la conformación, esto puede conducir a una desorganización o alteración del filamento paralela o previa a la agregación de modo que la estructura del filamento sea más afectada y menos fácilmente reconocible tras la acción de los agentes desnaturalizantes.

En contrapartida, la temprana agregación observada en músculo de merluza confirmada tanto bioquímicamente como por el estudio de las fracciones insolubles entre las moléculas de miosina en los filamentos gruesos quizá sean responsables del mantenimiento de la estructura y menor agresividad de los agentes para disolver los filamentos gruesos lo que explica su detección en los agregados. Por otro lado, en músculo picado de bacalao el fenómeno de agregación aparece más tempranamente y ocurre de forma más intensiva que en el músculo intacto, lo que podría explicar la presencia de filamentos gruesos mejor definidos que los observados en residuos obtenidos a partir de músculo intacto a la misma temperatura y mayor semejanza



morfológica observada entre las micrografías de músculo de merluza y músculo picado de bacalao.

Asimismo la diferencia en el comportamiento observado en músculo de bacalao a las dos temperaturas puede ser el reflejo de que el proceso de desnaturalización está ralentizado a temperaturas más bajas.

Esta hipótesis sobre las diferencias en el mecanismo de desnaturalización de ambas especies aparece corroborada por estudios bioquímicos complementarios que del Mazo (1997) llevó a cabo paralelamente a los de extractabilidad en las mismas fracciones solubles basados en la determinación de la actividad  $\text{Ca}^{2+}$  ATPásica, parámetro indicativo de la funcionalidad de la miosina que ha sido utilizado para evaluar la desnaturalización de la misma por efecto de la congelación. Estos estudios demostraron un comportamiento distinto en lo referente a la evolución de la desnaturalización de la molécula de miosina en función del tiempo en las dos especies. Este autor encontró una disminución significativa de la actividad ATPásica en músculo de bacalao que atribuyeron a una desnaturalización progresiva y especialmente significativa de la miosina en los primeros estadios de almacenamiento, de modo que en la semana 22 el valor descendía desde un valor obtenido en el músculo control de 0.15 hasta 0.025 de modo que a las 49 y 63 semanas el valor de la actividad ATPásica es cero y no a la presencia de una menor cantidad de miosina en el extracto. Además se observó una desnaturalización más acusada de la molécula de miosina a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Al comparar los resultados obtenidos al medir la actividad  $\text{Ca}^{2+}$  ATPásica en músculo de merluza concluyeron que durante la conservación existían dos etapas en lo referente a este parámetro. En una etapa inicial apenas se modificaba la actividad de la miosina del extracto  $\text{S}_1$ , indicativo de que en los estadios iniciales la desnaturalización era escasa (el valor inicial de dicha actividad inicialmente era inferior a 0.04 y no se modificaba hasta la semana 22). Al final del almacenamiento en cambio no se detectó actividad de la misma. Sin embargo el dato más significativo es que la calidad inicial de la miosina era inferior a la extraída de músculo de bacalao, que se manifiesta por unos valores más bajos de la actividad  $\text{Ca}^{2+}$  ATPásica y unos valores más elevados de hidrofobicidad lo

que puede justificar que el fenómeno de agregación haya sido tan rápido desde el comienzo, ya que en algunos estudios se ha demostrado que la desnaturalización previa de las proteínas acelera el proceso de agregación posterior y quizá demuestre que la agregación exija una desnaturalización previa de las proteínas como habían sugerido Ang y Hultin (1989) en un modelo que diseñó para explicar los resultados en miosina aislada y Sotelo y Mackie (1993), lo que lleva a plantearse la importancia de la calidad inicial de la proteína, para su comportamiento posterior durante el almacenamiento en congelación.

Las mismas conclusiones sobre la evolución de la desnaturalización de la molécula de miosina pueden ser extraídas a partir de experimentos paralelos llevados a cabo por este autor basados en la medida de la hidrofobicidad superficial de la molécula de miosina. La medida de este parámetro se basa en el hecho de que la desnaturalización asociada a la congelación se traduce en la exposición de los grupos hidrofóbicos detectándose como un incremento de la hidrofobicidad superficial. El análisis en músculo de bacalao muestra un incremento de la exposición de los grupos hidrofóbicos en los primeros estadios de congelación superior a los observados en merluza y una tendencia más clara a la disminución de los valores de hidrofobicidad superficial a partir de la semana 14 que pueden ser explicados por un aumento del fenómeno de agregación que reduce el número de grupos hidrofóbicos expuestos. En merluza los valores de hidrofobicidad superficial eran superiores a los obtenidos en músculo de bacalao, pero el valor de este parámetro no sufría modificaciones significativas a lo largo de la congelación.

No puede descartarse que las diferencias observadas en el comportamiento de las proteínas puedan ser atribuidas total o parcialmente a otros factores no estrictamente relacionados con la especie como factores intrínsecos relacionados con la fecha de captura, estado nutricional, madurez sexual) que puedan influir en el estado inicial de la proteína.

La desnaturalización de la molécula de miosina quedó asimismo patente en los estudios de extractos solubles. Las moléculas de miosina polimerizan de modo

convencional lado a lado para la formación de filamentos sintéticos a PH 6-8 y una fuerza iónica baja 0.1-0.3 (Huxley, 1963, Kammerer y Bell, 1966). Estas moléculas aparecen en los extractos solubles obtenidos con soluciones salinas de fuerza iónica 0.6M y PH 7 asociada a la actina en forma de actomiosina o como moléculas individuales que no pueden ser visualizadas por tinción negativa ya que son destruidas por dicha técnica de modo que es sólo visualizaba combinada con la actina, agregada en forma de filamentos gruesos o mediante modificaciones en la técnica de tinción negativa consistentes en irradiar el soporte con luz ultravioleta.

En nuestro estudio se demuestra la existencia en los extractos solubles en sal de elementos proteicos agregados de morfología semejante a filamentos formados en los extractos solubles en sal a partir de moléculas de miosina en condiciones muy específicas. Existe enorme similitud entre los agregados constituidos por partículas proteicas globulares observados en nuestro estudio y estructuras descritas por Matsumoto et al., 1977 en micrografías obtenidas cuando soluciones de miosina almacenadas en congelación eran tratadas en soluciones de baja fuerza iónica para reconstituir filamentos. Este caso en el que se imposibilita la agregación de las moléculas de miosina para formar filamentos se justifica por desnaturalización de dichas moléculas durante su almacenamiento en congelación. En nuestro estudio el significado de la aparición de estas estructuras en los extractos solubles que no deberían encontrarse a esta fuerza iónica son signos de agregación entre moléculas de miosina.

Estos agregados proteicos descritos en las tinciones negativas se correlacionan con las encontradas por otros autores en relación con la desnaturalización-agregación de la molécula de miosina por efecto del calor y PH y el mecanismo de formación de geles a partir de estas moléculas. Sharp y Offer (1992) examinaron a nivel molecular por microscopía electrónica de transmisión aplicando la técnica de tinción negativa los agregados formados cuando soluciones de miosina en elevadas concentraciones de sal 0.6M ClK PH 6.5 se calientan entre 30 y 60°C. Estos autores encontraron estados intermedios de agregación en función de la temperatura. Después de calentar a 30°C durante 30 minutos no detectaron ningún cambio en la estructura. Después de calentar a

35°C durante 30 minutos las dos cabezas de algunas moléculas de miosina se unen y se forman algunos dímeros por agregación a través de las cabezas. Después de calentar a 40°C 30 minutos se produce la agregación a través de la cabeza de 13 moléculas de miosina o más para formar masas globulares de 60nm con las colas irradiando hacia fuera. A temperaturas más altas estos oligómeros ligados por la cabeza se agregan para formar otros de mayor tamaño (oligómeros compuestos) y las colas apenas pueden distinguirse. A 60°C la agregación es masiva y los oligómeros compuestos formados contienen un elevado número de masas globulares de 100-200 nm hasta 1  $\mu$ m mientras ninguna traza de cola puede ser identificada a esta temperatura.

Estos acúmulos proteicos u oligómeros visualizados a 60°C por tinción negativa son de morfología equivalente a los encontrados en las fracciones solubles S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> y S<sub>3</sub> obtenidas en nuestro estudio que habíamos sugerido estaban compuestas fundamentalmente por moléculas de miosina. Ha sido propuesto por estos autores que estos glóbulos estén formados por interacciones de las moléculas de miosina cabeza-cabeza, aunque no descartan que las interacciones cola-cola puedan ser importantes a la hora de formar las ramas y enlaces de la red del gel.

Por medidas de calorimetría diferencial de barrido realizadas por Fretheim et al., 1985 ha sido demostrado que se produce desnaturalización de las moléculas de miosina por la presencia de un PH ácido inferior a 5 que afecta a la forma molecular y las interacciones de la miosina, manifestándose en que en geles formados en estas condiciones se detectan agregados similares a aquellos que han sido observados a PH 6 y 0.6M en un rango de temperatura entre 40-45°C y asimismo lo atribuyeron a interacciones fundamentalmente cabeza-cabeza y otras interacciones cola-cola distintas de las convencionales a baja fuerza iónica. Estos autores asimismo encontraron que los filamentos formados a partir de moléculas de miosina en estas condiciones a menudo interaccionan formando ángulos aproximadamente rectos en los que la longitud de los filamentos entre las zonas de unión variaban en un rango entre 200-600 $\mu$ m. Las estructuras descritas en estas condiciones presentan analogía con estructuras observadas en los sobrenadantes, formando parte en ocasiones de las estructuras en forma de anillo.

No se puede descartar que la agregación de las moléculas de miosina pueda tener lugar parcialmente en la solución salina una vez que la proteína ha sido extraída de una manera equivalente al mecanismo de formación de geles, aun así se puede concluir que las moléculas de miosina durante la congelación se desnaturalizan formándose agregados en los que puedan estar ampliamente implicadas interacciones entre las cabezas de las moléculas de miosina dando lugar a estructuras proteicas como las descritas, fenómeno que además ocurre de manera más significativa y tempranamente en músculo de merluza.

El estudio inmunohistoquímico asimismo ha permitido constatar una alteración de la estructura de la cadena pesada de la molécula de miosina por efecto de la congelación que queda patente en la disminución significativa en la densidad de partículas de oro detectadas en función del tiempo de almacenamiento. El desconocimiento del epitopo exacto reconocido por el anticuerpo monoclonal impide obtener exacta información sobre el fragmento de la molécula alterada. Estos resultados preliminares revelan que la inmunohistoquímica puede ser utilizada como una herramienta útil mediante el empleo de anticuerpos específicos contra secuencias concretas de la molécula de miosina que podrían aportar información más exacta sobre su posible mecanismo de desnaturalización. La inmunoelectromicroscopía ha constituido la mejor fuente para obtener información sobre localizaciones espaciales de sitios funcionales sobre la cabeza de miosina mediante mapeos realizados sobre la molécula que han permitido un conocimiento más exhaustivo de la misma. Sutoh et al., 1989 desarrollaron anticuerpos específicos contra péptidos sintéticos cuyas secuencias correspondían a una región alrededor del residuo de lisina reactivo y dos regiones sensibles a proteasas llamadas unión J1 y J2. El examen de los complejos miosina-anticuerpo por técnicas de réplica reveló la posición exacta de estas regiones en la molécula.

Tras el estudio inmunohistoquímico cabe destacar los bajos valores obtenidos en densidad de partículas de oro por  $\mu\text{m}^2$  de banda A en el control con respecto al número de moléculas que pueden resultar accesibles al anticuerpo en la región más superficial

de la sección. Esta pérdida de antigenicidad puede ser justificada en parte por una serie de condicionantes relacionados con la accesibilidad del anticuerpo al tejido y el mantenimiento de los determinantes antigénicos (el proceso de fijación y posterior deshidratación con un solvente orgánico conlleva a la pérdida de antigenicidad en un 40-65% a lo que se debe añadir la acción de los monómeros de la resina y de esta última que supone una pérdida de antigenicidad en el caso del Lowicryl de un 60-70%). Factores de esta naturaleza junto con la utilización de diferentes lotes de anticuerpos pueden justificar las diferencias obtenidas en el marcaje en los dos experimentos.

En relación con la actina resulta más complicado extraer conclusiones sobre su alteración a partir de estos estudios. No se puede descartar que la actina esté implicada en la agregación como demuestra la presencia de interacciones entre sí de filamentos de actina observados en las tinciones negativas, filamentos que además participan en la formación de agregados de gran tamaño interaccionando incluso con la miosina. Además desde el punto de vista morfológico la actina participa en la formación de fusiones con todo tipo de filamentos, fenómeno especialmente constatable en miofibrillas de merluza donde son incluso distinguibles hileras constituidas por fusiones de filamentos finos. Las fracciones insolubles ponen de manifiesto una mayor presencia de filamentos de actina en el agregado  $P_1$  de músculo picado de bacalao y músculo almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , mientras que en merluza son escasamente identificados en los últimos estadios de almacenamiento. Sin embargo la contribución a la agregación de la actina parece inferior a la miosina, hecho confirmado por los estudios electroforéticos que pusieron de manifiesto una disminución de la cantidad de esta proteína en ambas temperaturas pero significativamente inferior a la observada para la miosina.

La estabilidad de la actina frente a la miosina ha sido demostrada en los trabajos de Connell (1962) en músculo de bacalao a lo largo de 30 semanas a  $-14^{\circ}\text{C}$ . Resultados opuestos fueron obtenidos por Matsumoto (1980) a partir de estudios llevados a cabo en sistemas modelo con actina aislada de carpa congelada y almacenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  donde se observó desnaturalización de actina.

La agregación constatada desde el punto de vista bioquímico y ultraestructural por los estudios sobre extractos solubles e insolubles aparece reflejada en los estudios morfológicos realizados sobre músculo *in situ*.

El fenómeno más destacable desde el punto de vista ultraestructural encontrado en músculo de bacalao es la presencia de un elevado número de fusiones interfilamento en avanzados estadios de congelación.

Se ha prestado especial atención a los filamentos gruesos dado que el aumento del número de fusiones entre este tipo de filamentos es más patente. Por otro lado la mayoría de los estudios ultraestructurales preliminares se han basado en este tipo de filamentos, en parte porque los filamentos finos se desorganizan perdiendo su disposición más tempranamente. Además desde el punto de vista bioquímico como se ha mencionado anteriormente la miosina es la proteína más afectada en el proceso de congelación. Los estudios por microscopía electrónica convencional realizados hasta la fecha en condiciones equivalentes no habían descrito este fenómeno que nosotros hemos encontrado de forma extensiva en músculo de bacalao a ambas temperaturas  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $-30^{\circ}\text{C}$  en estadios avanzados de almacenamiento. Únicamente se había enunciado que la congelación podía inducir la alteración del patrón hexagonal sin especificar en que manera se producía dicha alteración (Jarenbäck y Liljemark, 1975a, Aitken y Connell, 1977). La direccionalidad en las fusiones patente en la mayoría de las micrografías en músculo de bacalao parece mostrar el efecto de algún tipo de fuerza física que opera empujando y desplazando los filamentos de su posición original en la red. La importancia de la transición de la fase acuosa a hielo parece estar presente en estos cambios morfológicos ya que ésta conlleva cambios físicos importantes, como se detallará a continuación.

La cantidad de agua congelada representa el 75% del agua a  $-5^{\circ}\text{C}$  y un 86% a  $-15^{\circ}\text{C}$ , aproximándose a un 92% por debajo de  $-20^{\circ}\text{C}$ . El 8% restante lo constituye el agua de hidratación de las proteínas y permanece no congelada a  $-35^{\circ}\text{C}$ . Los solutos se concentran en el agua no congelada alcanzándose una fuerza iónica de 1M a  $-5^{\circ}\text{C}$  y 2M a  $-15^{\circ}\text{C}$ . Este incremento de la fuerza iónica cambia los coeficientes de actividad de las

sales que tamponan el PH causando el cambio de PH. Como puede observarse los cambios asociados al agua modifican asimismo alguno de los parámetros que se han propuesto como responsables de la desnaturalización experimentada por las proteínas durante el almacenamiento del músculo en congelación.

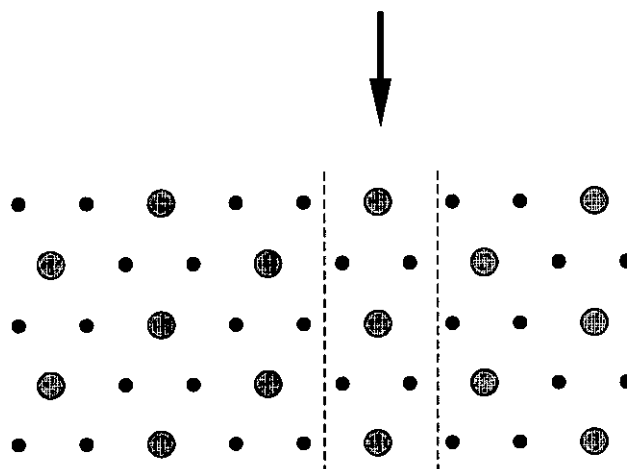
Un aspecto a tener en cuenta es la influencia del modo de congelación. Si la congelación es muy rápida por inmersión de una muestra pequeña en nieve de CO<sub>2</sub> o nitrógeno líquido o por enfriamiento contra una superficie metálica se forman cristales de hielo muy pequeños, dentro y fuera de las células musculares. En la práctica comercial, el enfriamiento ocurre más lentamente especialmente en tejidos más profundos de modo que se forman menos y más grandes cristales de hielo. Estos cristales de hielo se sitúan fundamentalmente fuera de las células, debido al más bajo punto de congelación del espacio intracelular y parecen crecer a expensas del volumen de las fibras musculares formando una red columnar anastomosada alrededor de las fibras entrando incluso en ellas. Las dimensiones transversales de las columnas de hielo pueden ser 400 µm, que es mayor que el tamaño de las fibras musculares o los espacios llenos de fluido presentes en músculo en rigor alrededor de los paquetes de fibras. La deshidratación de las fibras musculares es seguida por una contracción transversal sustancial de las fibras, sobre un 40% del área inicial transversal. Esta contracción de las fibras durante la congelación y su posterior “rehinchamiento” durante la descongelación puede justificarse por el hecho de que cuando los cristales de hielo crecen en fluidos extracelulares, los solutos incluidos proteínas solubles están más concentrados en la fase líquida. El potencial químico del agua en esta fase caerá para igualar el del hielo y la presión osmótica aumentará. Además si la concentración de sal aumenta suficientemente se puede producir la despolimerización de los filamentos gruesos lo que supone una contribución osmótica importante para producir una presión de hinchamiento. Así la presión osmótica generada por la formación del hielo estará en contra de la oposición establecida por una presión entrópica de hinchamiento (Offer y Knight, 1988). Al descongelar, la presión osmótica externa disminuye cuando los solutos llegan a estar diluidos por el hielo que se descongela y las miofibrillas se rehincharán en función de las presiones de hinchamiento electrostáticas, mecánicas y entrópicas.



Aunque se intuye que una considerable alteración de la estructura miofibrilar debe ocurrir asociada al proceso de congelación, sin embargo la ultraestructura en el estado congelado incluyendo los estudios basados en el grado de contracción de la red de filamentos y su regularidad no han sido muy abundantes y los existentes resultan contradictorios.

Estudios por microscopía electrónica revisados por Offer y Knight (1988) mostraron que cuando fibras musculares aisladas se congelan lentamente a  $-2.5^{\circ}\text{C}$  la estriación regular desaparecía mientras que éstas recuperaban su apariencia normal tras la descongelación. Aproximaciones en músculo de pescado por microscopía electrónica y difracción de rayos X llevados a cabo por Liljemark (1969) y Aitken y Connell (1977) sugerían que después de la descongelación el patrón regular de filamentos gruesos y finos presenta el mismo espaciamiento en la red que las muestras descongeladas.

Por otro lado se deben tener en cuenta los experimentos revisados por Connell (1968) en los que se lleva a cabo la fijación de músculo de bacalao directamente desde el estado congelado. Las secciones obtenidas muestran que en el estado congelado el reordenamiento hexagonal regular de los filamentos puede ser distorsionado en un reordenamiento más alargado como resultado de una contracción debida a la migración del agua en la cara más cercana al cristal de hielo y/o la compresión a la que se ve sometida la red a lo largo de una línea aproximadamente normal a la cara del cristal de hielo. Como resultado los filamentos cortados transversalmente aparecen como líneas continuas dispuestas normales a la cara del hielo en lugar de la red regular de puntos visibles que se observan en el músculo descongelado. La implicación de este reordenamiento es que pueden tener lugar interacciones entre las moléculas de proteína sobre la superficie de los filamentos situados en el plano 10-10 en el músculo congelado que no ocurra en músculo no congelado (Figura XIV) debido a que la distancia entre filamentos gruesos o entre filamentos finos entre sí en el estado congelado es menor que la distancia entre filamentos gruesos y finos, mientras que en el estado no congelado la distancia entre filamentos gruesos y finos es siempre menor que la distancia entre los dos tipos de filamentos.



**FIGURA XIV.** Diagrama que muestra la dirección de la contracción en el plano 10-10 por efecto de los cristales de hielo

Este fenómeno recogido por Connell se corresponde morfológicamente con muchas de las micrografías obtenidas en nuestro estudio en músculo de bacalao, justificando las hileras de filamentos gruesos fusionados en la misma dirección. Por otro lado hay que tener en cuenta que no es el único mecanismo de alteración detectado puesto que también se observan miofibrillas en estadios avanzados de congelación en los que aparecen miofilamentos gruesos fusionados en distintas direcciones así como miofibrillas en las que fusiones apenas pueden ser identificadas. Es remarcable el hecho de que los estudios de Connell se llevaron a cabo en músculo en estado congelado. Teniendo en cuenta que nuestro estudio se ha llevado a cabo una vez que el músculo había sido descongelado y la deformación descrita durante la congelación basada en la fusión extensiva de filamentos gruesos se mantiene después del proceso de descongelación se corrobora la hipótesis de formación de enlaces entre moléculas de proteína en los filamentos gruesos que impiden la recuperación de la disposición original de los filamentos en la red hexagonal, fenómeno que aunque hipotetizado no había sido aceptado.

El análisis de las micrografías de músculo de merluza ponen de manifiesto la diferencia en el comportamiento del músculo en las dos especies en relación a la tendencia de los distintos tipos de filamentos a fusionarse ya que en merluza las fusiones entre filamentos gruesos son escasas en estadios avanzados de congelación a pesar de tratarse de especies que pertenecen al orden gadiformes y formadoras de formaldehído.

Sin embargo se observa un predominio de hileras entre filamentos finos fusionados en el plano 10-10 y entre éstos y filamentos gruesos, fenómeno que quizá no esté reflejando en sí un hecho de deformación significativo. Fusiones en hileras de filamentos finos y otro tipo de fusiones en las que se encuentran implicados filamentos finos también se observan en músculo de bacalao y quizá el mayor número de éstas detectado en las fibras musculares de merluza pueda explicarse como resultado de un fenómeno de hipercontracción que parece haber tenido lugar en músculo de merluza por el que el número de filamentos finos presentes en la banda A es superior al del músculo postrigor normal pudiendo además contribuir el hecho de que los filamentos finos tienden a desorganizarse desde un principio.

Paralelamente a los estudios morfológicos se pretendió realizar un estudio encaminado al conocimiento de la deformación experimentada por la red hexagonal en las miofibrillas en función del tiempo de almacenamiento en congelación. Como se ha descrito anteriormente la deformación fue valorada utilizando como parámetro la excentricidad evitando así la medida de la distancia interfilamento ya que este parámetro puede depender de una serie de factores entre los que cabe destacar la longitud del sarcómero en el músculo postrigor como se justificó anteriormente, PH como se demostró en estudios por difracción de Rayos X (revisado por Offer y Knight 1988) de modo que la red de filamentos se expande lateralmente cuando el PH de las fibras de músculo en rigor glicerizadas es superior a 5 y de la fuerza iónica de manera que el tamaño mínimo ocurre a fuerza iónica aproximadamente fisiológica y si la fuerza iónica aumenta o disminuye de este valor la red se expande. Esta expansión de la red se explica por la presencia de fuerzas repulsivas entre los filamentos. Alrededor de PH 5 los

filamentos gruesos y delgados tienen carga neta cero. Aumentando el PH de 5 los filamentos se cargan negativamente. Asimismo bajando la concentración de sal desde niveles fisiológicos decrece el efecto tampón de los iones entre los filamentos cargados incrementándose en ambos casos las fuerzas repulsivas. No obstante la estructura es mantenida gracias a la existencia de los elementos estructurales transversos como la línea M, disco Z y proyecciones entre filamentos gruesos y finos en estado postrigor.

El segundo de los aspectos que puede afectar a las medidas puesto que influye distorsionando los hexágonos es la oblicuidad de las secciones. El procedimiento utilizado para seleccionar las miofibrillas en las que posteriormente se realizaba el estudio morfométrico justifica de modo preliminar la perpendicularidad de las secciones. Así se tienen en cuenta al ser fotografiadas áreas que contengan al menos una miofibrilla cortada a nivel de la banda M de modo que la típica organización de dicha banda apareciera a lo largo de la miofibrilla. Dado que la dimensión de la banda M es de 600-750Å (aproximadamente el tamaño de una sección ultrafina), la presencia de la banda M a lo largo de toda la miofibrilla garantizaba la perpendicularidad de la sección en tal miofibrilla. Si se tiene en cuenta la morfología del músculo, en el que las miofibrillas aparecen empaquetadas paralelamente en la fibra muscular separadas por el retículo endoplásmico, las miofibrillas cortadas a nivel de la banda A contiguas a la miofibrilla cortada a nivel de la banda M como anteriormente se justificó se encontrarían cortadas aproximadamente perpendiculares al eje de la fibra. Además, los resultados obtenidos corroboran con su coherencia que las secciones objeto de estudio estuvieran bien orientadas como se justifica a continuación.

En el caso de que la sección fuera oblicua la variación que experimenta el diámetro máximo y el diámetro mínimo es proporcional a  $1/\cos\alpha$  donde  $\alpha$  es el ángulo de inclinación de la sección. Si el ángulo de inclinación es aproximadamente  $20^\circ$  la longitud de los diámetros incrementará en un 6% e incluso si  $\alpha$  es de  $30^\circ$  la longitud incrementará en un 15%. En nuestro estudio el incremento en los valores de excentricidad en función del tiempo es superior al 15%, por lo que parece prácticamente imposible que el ángulo de desviación durante el seccionamiento supere los  $30^\circ$ . Por

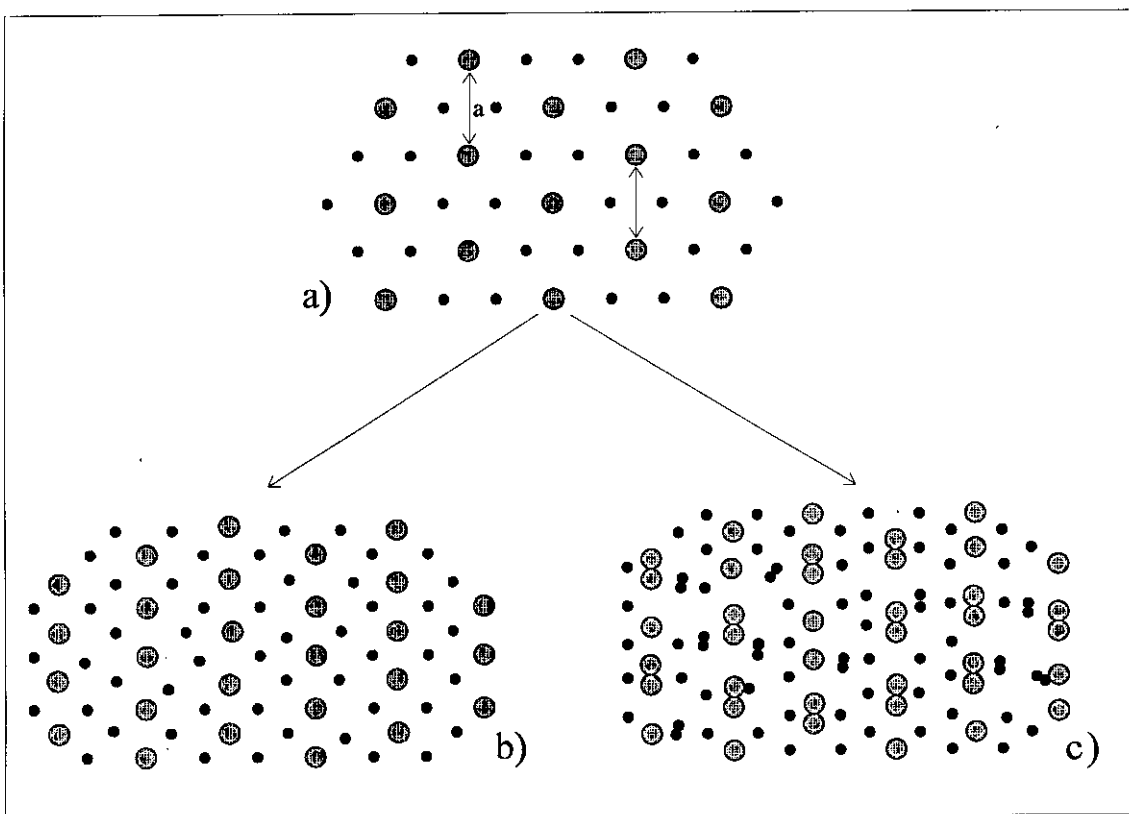
tanto los datos obtenidos tras el estudio morfométrico pueden ser fundamentalmente atribuidos a la alteración de la red hexagonal durante el almacenamiento en congelación.

En este estudio encontramos que los hexágonos de la red se deforman en músculo de bacalao de modo que el diámetro máximo incrementa con respecto al diámetro mínimo en función del tiempo de almacenamiento, reflejado en un aumento de los valores de excentricidad. Sin embargo esta aproximación es sólo válida cuando el músculo no está en un estado avanzado de degradación puesto que en periodos de almacenamiento largos la red hexagonal puede desorganizarse completamente.

Esta deformación y también desorganización observada en los hexágonos de la red de músculo de bacalao durante la congelación está correlacionada con la agregación y fusiones anteriormente descritas en el estudio morfológico. La figura XVa muestra la sección transversal a través de la banda A, siguiendo el modelo propuesto por Huxley y Brown (1967). Como resultado de la formación de enlaces entre los filamentos gruesos situados en el lado a de la celda unidad de la red de filamentos del músculo, el hexágono central se deforma llegando a ser más excéntrico Figura XVb. Si este modelo fuera extensivo significaría una deformación general de la red con una orientación preferencial. El grado máximo de dicha deformación correspondería a miofibrillas en las que existiera un elevado porcentaje de fusiones entre filamentos gruesos como muestra la figura XVc. Por otro lado hay que tener en cuenta que aunque es el mecanismo mayoritario observado en las miofibrillas objeto de estudio, en algunas miofibrillas en las que la fusión tiene lugar en diferentes direcciones, muestran la orientación de la deformación en diferentes direcciones.

La prueba más clara de la presencia de enlaces proteicos entre filamentos es la presencia de fusiones entre éstos como anteriormente se ha justificado. La existencia de una correlación entre la formación de enlaces interfilamento y el aumento de los valores de excentricidad en la red aun en las miofibrillas en las que las fusiones no son tan evidentes puede ser corroborada por los estudios de Aitken y Connell (1977). En sus estudios por Rayos X, estos autores encontraron una ausencia de reflexiones después de 15 meses a  $-10^{\circ}\text{C}$  que indicaba un progresivo incremento del desorden con el tiempo e

incrementada temperatura de almacenamiento que afectaba a los filamentos sugiriendo desorden al azar de dichos filamentos de sus posiciones originales, hallazgo que consideraron no es inconsistente con la hipótesis de la formación de puentes “crosslinkings” entre filamentos cuando éstos están aproximados en el estado congelado. Incluso un pequeño número de enlaces podrían distorsionar la red significativamente sin que tenga que manifestarse en una reducción de la distancia interfilamento.



**FIGURA XV.** Representación hipotética de la deformación experimentada por la red miofibrilar en células musculares de bacalao durante su almacenamiento prolongado en congelación. a) Red hexagonal que muestra la organización de los miofilamentos característica de músculo fresco. b y c) Deformaciones observadas en estadios avanzados de almacenamiento. En algunas miofibrillas (b) los filamentos gruesos se aproximan en el plano 10-10 lo que se traduce en un aumento de la excentricidad. En un amplio número de ellas (c) se observan fusiones extensivas entre filamentos gruesos.

Un aspecto a destacar es la diferencia de la evolución de la excentricidad a las dos temperaturas de congelación en músculo de bacalao, de modo que los valores de excentricidad a las 70 semanas en músculo a  $-30^{\circ}\text{C}$  son equivalentes a los encontrados a las 36 semanas lo que implica una evolución más lenta del sistema a la temperatura más baja de conservación en correlación con un más lento nivel de agregación observado por los estudios de extractabilidad.

Un razonamiento aportado por Aitken y Connell (1977) que puede justificar parcialmente el hecho de que la microscopía electrónica de transmisión en algunos estudios ultraestructurales previos no mostrara la distorsión del patrón hexagonal de modo que el músculo recuperaba su posición original después de descongelarse es la selectividad que conllevan los estudios por microscopía electrónica, de modo que el muestreo de las áreas objeto de estudio es bastante restringido teniendo en cuenta que pequeñas partes de ese área pueden exhibir diferencias estructurales y que en ocasiones zonas desordenadas pueden ser rechazadas al considerarlas un artefacto de la preparación de la muestra.

Las diferencias morfológicas observadas en miofibrillas de músculo de merluza asimismo se manifestaron en un patrón de deformación diferente tras el estudio morfométrico. La red hexagonal no parece experimentar una deformación significativa en función del tiempo de almacenamiento. El elevado valor de excentricidad obtenido a las 6 semanas podría ser explicado como consecuencia de algún artefacto de corte. No obstante parece improbable que sea resultado de la oblicuidad introducida por el seccionamiento porque como se explicó anteriormente un aumento de los valores de excentricidad en este rango significaría un ángulo de corte superior a  $30^{\circ}\text{C}$ . Por otro lado aparece alguna fusión entre filamentos gruesos que indica que ha existido una compresión efectiva de la miofibrilla. Estas fusiones tempranas y elevado valor de excentricidad obtenido a las 6 semanas no es inconsistente con el hecho de que la agregación entre proteínas miofibrilares ha sido confirmada por los estudios bioquímicos desde los primeros estadios de almacenamiento. El estudio comparativo de los valores de excentricidad con respecto al músculo de bacalao es demostrativo de un

escaso desplazamiento y un menor nivel de interacción entre los filamentos gruesos en esta especie en el estado congelado.

Los estudios por microscopía electrónica más relevantes sobre la deformación experimentada por la red son los llevados a cabo por Liljemark (1969) y Jarenbäck y Liljemark (1975a). Liljemark llevó a cabo medidas de la distancia entre filamentos gruesos en músculo de bacalao seleccionando la distancia menor entre éstos, para así evitar los errores de inclinación, encontrando que la distancia media podía decrecer ligeramente cuando se instaura en el músculo el rigor, pero no detectó decrecimiento después de la congelación postrigor del músculo y su almacenamiento posterior. Estos autores encontraron amplia variabilidad en los valores medios de la distancia interfilamento antes y después de la congelación. Antes de establecerse el rigor la distancia más corta encontrada fue 365 Å. Después del almacenamiento en congelación las distancias más cortas eran del orden de 265 Å, pero algunos de los especímenes que presentaban mayor grado de dureza mostraban el mismo rango que aquel presente en los estudiados en prerigor.

Nuestros resultados parecen estar más de acuerdo con trabajos posteriores de Jarenbäck y Liljemark (1975a) en criofractura. Estos autores demostraron que el valor del espacio mínimo interfilamento en mediciones equivalentes a las realizadas por Liljemark disminuía significativamente desde  $42 \pm 2.7$  nm en músculo de bacalao control a  $37.3 \pm 2.2$  nm en músculo congelado durante 2 años a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Aitken y Connell (1977) en sus estudios por Rayos X no encontraron variación significativa tras el estudio estadístico en los valores de distancia interfilamento después de 15 meses de almacenamiento en congelación de músculo de bacalao. Estos autores no justifican que las variaciones en los resultados obtenidos con respecto a otros estudios se deban al método de preparación de muestras porque aunque el procesamiento para microscopía electrónica de transmisión y criofractura puede alterar el espaciamiento entre filamentos, se debe pensar que la extensión de estos cambios durante la congelación debe incrementar con el aumento del deterioro del músculo durante el almacenamiento suponiendo el proceso lineal. Así un cambio en la magnitud



observada por Jarenbäck y Liljemark de al menos un 10% debería haber sido detectada por Connell en sus estudios. Quizá la explicación más plausible a la enorme variabilidad encontrada en los estudios morfométricos previos se encuentre en el parámetro objeto de estudio y cómo el valor de la distancia interfilamento como anteriormente se justificó depende de un elevado número de factores no controlables en estos estudios.

En suma las diferencias observadas en la deformación experimentada por las redes en el músculo de ambas especies parecen razonablemente explicadas en función de:

1) Factores físicos fundamentalmente relacionados con la forma de redistribución del agua.

El músculo es un sistema de multicomponentes constituido por un espacio extracelular e intracelular por lo que los cristales de hielo pueden formarse en ambos compartimentos confiriendo distintas configuraciones al tejido. Se acepta de modo general que el superenfriamiento alcanzado en el espacio intracelular es siempre más bajo que en el espacio extracelular (Meryman, 1966). Este efecto es debido a la mayor concentración de soluto existente en el fluido intracelular o la existencia de una diferencia de temperatura entre el exterior y el interior de las fibras, lo que conduce a que el comienzo de la nucleación del cristal de hielo siempre se produzca en el espacio extracelular. Sin embargo si el grado de extracción de calor es suficientemente alto para eliminar el calor de cristalización del núcleo extracelular y producir un grado de superenfriamiento en el interior de las células se puede producir la nucleación de cristales de hielo en el espacio intracelular. De acuerdo con este concepto, el hielo intracelular se formará cuando se empleen métodos de eliminación del calor rápidos. Este efecto ha sido verificado histológicamente y cuantificado en términos del tiempo característico ( $t_c$ ).  $T_c$  es definido como el tiempo que el punto analizado invierte en decrecer su temperatura desde  $-1^{\circ}\text{C}$  (comienzo de la congelación) a  $-7^{\circ}\text{C}$  (congelación del 80% del agua presente) y supone una medida del grado de congelación local. Calvelo (1981) ha demostrado en músculo de ternera que con un valor de  $t_c=0.5$  minutos se forman cristales intracelulares y extracelulares con varios cristales por fibra.

Para  $t_c=20$  minutos el tamaño de los cristales de hielo es más grande detectándose la presencia de cristales extracelulares e intracelulares, detectándose un cristal por fibra. Para valores de  $t_c>23$  minutos la presencia de hielo solamente fue registrada en los espacios extracelulares. Posteriormente el hielo extracelular crece a expensas del agua del interior de la célula como consecuencia de que el fluido interfibras se ha concentrado como consecuencia de la congelación por lo que las fibras llegan a distorsionarse y contraerse adoptando formas irregulares. La morfología de distribución del hielo para los tiempos anteriormente considerados es válida cuando la congelación ocurre paralelamente a las fibras. En caso de congelarse en una dirección transversal a las fibras el comportamiento es diferente puesto que sólo se pueden formar cristales de hielo intracelulares para  $t_c<5$  minutos mientras que en longitudinal esto ocurre también a  $t_c=20$  minutos. Como se ha justificado anteriormente en condiciones ideales en los métodos de congelación lenta el área ocupada por cristales intracelulares es escasa pero hay que tener en cuenta que se pueden establecer gradientes de temperatura durante la congelación del músculo que conduzca a la distribución de grados de congelación locales. Esta distribución es función de condiciones asociadas a la congelación (temperatura inicial, temperatura del agente empleado en la congelación, resistencia al calor interfacial, grosor del espécimen).

En este sentido deben tenerse en cuenta los trabajos de Tanaka (1965). Este autor encontró que utilizando el mismo método de congelación en dos especies distintas en el que  $t_c$  era aproximadamente 2.5 horas el porcentaje de hielo detectado en el espacio extra e intracelular encontrado difería en ambas especies manifestándose en diferencias morfológicas importantes. Tanaka estableció una correlación entre la alteración de la distancia interfilamento y el porcentaje de hielo extracelular que se formaba en el tejido muscular tras la congelación de modo que en músculo de abadejo (*Theragra chalcogramma*) almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 12 meses detectó una disminución de la distancia interfilamento relacionado con un predominio de la congelación extracelular (60% de cristales en forma de hielo extracelular, porcentaje que se mantenía constante desde un mes hasta los doce meses) mientras que en jurel (*Seriola guingeradista*) este fenómeno, al que dio el nombre de fibrilación, no se observó durante dicho periodo de

almacenamiento donde el porcentaje de hielo extracelular no superaba el 20%. Estos autores además establecieron una correlación entre la disminución en la distancia interfilamento y los valores de solubilidad, de modo que en músculo de abadejo la disminución progresiva de la distancia interfilamento se correspondía con una disminución del porcentaje de actomiosina extraída, mientras que en jurel el porcentaje de actomiosina extraída no variaba a lo largo del almacenamiento en relación con el hecho de que no se observa una disminución de la distancia interfilamento. El efecto preventivo de la congelación intracelular quedó asimismo puesto de manifiesto en un experimento paralelo llevado a cabo por estos autores, en el cual soluciones de actomiosina extraída de músculo fresco fueron congeladas y almacenadas durante varios días a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El grado de desnaturalización de la actomiosina de jurel fue tan rápida como la de abadejo lo cual demuestra que la congelación intracelular tenía el efecto de prevenir la desnaturalización de la actomiosina.

La presencia de grandes cristales de hielo entre miofibrillas en métodos de congelación lentos ha sido descrita en numerosos estudios por microscopía electrónica. Bello et al. (1982) utilizando métodos de congelación lenta describen el inicio de formación de cristales de hielo en el interior del sarcoplasma. El agua de zonas sarcoplásmicas y miofibrillas contiguas migran por difusión al área más concentrada donde los cristales de hielo se forman, cuyo crecimiento empuja las miofibrillas.

Se puede pensar que las diferencias morfológicas observadas en nuestro estudio en ambas especies se puedan atribuir a una diferencia interespecífica en el porcentaje de hielo extra e intracelular o la selectividad que conllevan los estudios por microscopía electrónica de modo que las miofibrillas seleccionadas en merluza no hubiesen sufrido una presión efectiva por efecto de la congelación en función por ejemplo de la posición que ocupan dichas miofibrillas con respecto al núcleo de formación del cristal de hielo. Así Bello et al. (1982) observaron que las miofibrillas situadas en la periferia de largos espacios ocupados por cristales de hielo presentaban un aspecto más deshidratado y compacto que en tejidos no congelados o aquellos congelados utilizando métodos rápidos.

2) El segundo de los aspectos por el que se podría justificar las diferencias observadas en la red en ambas especies son factores intrínsecos relacionados con las características o susceptibilidad de las proteínas miofibrilares a la desnaturalización en relación con diferencias interespecíficas. Es conocido que complejos de actomiosina aislados de diferentes especies difieren en la estabilidad frente al calor y las miosinas aisladas de distintos peces se agregan a distintas velocidades cuando se almacenan en soluciones con una fuerza iónica de 0.5M (Connell 1968).

Asimismo es conocido que la estabilidad a la congelación puede variar en función de factores intraespecíficos como la estación de captura, estado nutricional, madurez sexual, estado migratorio (Love 1988). Se encontraron diferencias significativas en la solubilidad de las proteínas durante la congelación a  $-18^{\circ}\text{C}$  en merluza capturada en distintos meses del año (Colmenero et al., 1988) pero no en otras especies, si bien algunos autores achacaron estas diferencias en la solubilidad proteica en función de la estación a cambios en el colágeno más que en las proteínas miofibrilares (Montero y Borderías, 1990). Incluso la temperatura del agua previa a la captura puede influir en las reacciones químicas que puedan tener lugar durante el almacenamiento en congelación. Simpson y Haard (1987) observaron que bacalao del Atlántico aclimatado en agua de mar a  $0^{\circ}\text{C}$  o  $10^{\circ}\text{C}$  previo el sacrificio difería en el punto de congelación del músculo debido a la formación de proteínas anticoagulantes endógenas a  $0^{\circ}\text{C}$ . El grado de reacciones bioquímicas y pérdida de calidad sensorial durante el almacenamiento en congelación era más bajo en el músculo del espécimen aclimatado al frío. Además hay que tener en cuenta la influencia del procesamiento postcaptura sobre cambios posteriores durante el almacenamiento en congelación que varía en función de la especie y otros factores. Algunos estudios han demostrado que el deterioro de la calidad incrementa si el pescado se ha mantenido en hielo antes de la congelación. Jiang et al. (1987) han descrito que en algunas especies los nucleótidos de adenosina (ADP, AMP, IMP) que se producen en pescado fresco retardan la desnaturalización de la actomiosina durante el almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$ , mientras que los nucleótidos que se producen en pescado más envejecido aceleran esta reacción. Por otro lado otras especies entre las que se incluyen bacalao del atlántico y merluza roja

muestran un menor grado de deterioro en textura cuando éstos se mantienen en hielo durante varios días antes del almacenamiento en congelación, hecho éste que se ha relacionado con el agotamiento del óxido de trimetil amina y cofactores para la reacción de la TMAO demetilasa (Ragnarsson y Regenstein, 1989).

Por otro lado se ha demostrado que el espaciamiento de la red hexagonal depende además de otros factores expuestos anteriormente de la desnaturalización de la miosina. El mecanismo por el cual la desnaturalización de la miosina puede causar la contracción de las miofibrillas podría ser una reducción de la carga de los filamentos gruesos pero más probablemente se deba a un cambio en la forma de la molécula de miosina. Por ejemplo un cambio en la forma de las proyecciones como consecuencia de un acortamiento de la región del subfragmento 2 de la cola de la miosina o por una reducción en la longitud de las cabezas de miosina (Walker y Trinick 1986). Así se ha demostrado que una contracción de las cabezas de 2nm resulta en un decrecimiento en la separación entre filamentos gruesos y finos de 1.2nm lo que produce un fenómeno de contracción en la red. Cuando las cadenas ligeras reguladoras son eliminadas de la miosina de moluscos, las cabezas de miosina se acortan 3 nm como se visualizó por tinción negativa (Walker y Trinick en una comunicación personal). En cambio en miosina cardíaca la eliminación de las cadenas ligeras reguladoras causa que las cabezas sean más redondeadas pero no se detectaron cambios en longitud.

Asimismo en el mecanismo de agregación de las moléculas de miosina puede ser de vital importancia el mecanismo previo de desnaturalización. Ejemplo de esto lo constituyen experimentos en los que la selectividad a la hora de eliminar cadenas ligeras por distintos medios se traduce en distintos mecanismos de agregación de la molécula de miosina. Cuando las cadenas ligeras LC<sub>2</sub> son eliminadas se produce agregación a través de la región del cuello de las cabezas, fenómeno que es revertido cuando las cadenas ligeras LC<sub>2</sub> son añadidas (Pastra-Landis y Lowey, 1986). En condiciones en las que las cadenas ligeras LC<sub>1</sub> y LC<sub>3</sub> fueron selectivamente eliminadas, la agregación de las cabezas parecía ser diferente en el sentido de que se producían contactos más extensivos entre las cabezas con la posibilidad incluso de agregaciones intramoleculares

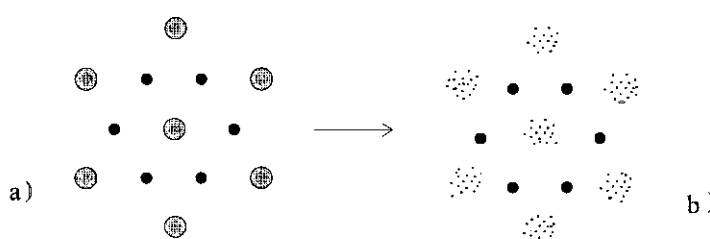
(Sharp y Offer 1992). Ha sido sugerido que la pérdida de cadenas ligeras causa agregación cabeza-cabeza por la exposición de áreas hidrofóbicas sobre la superficie de la cadena pesada (Bagshaw, 1980). Hay que tener en cuenta que las cadenas ligeras se extienden desde la unión cabeza-cola hasta aproximadamente la mitad de la cabeza. Una posible explicación a los diferentes tipos de agregación es que cuando las cadenas ligeras del tipo  $LC_2$  se pierden, se expone un área hidrofóbica en la base de las cabezas pero como consecuencia de la curvatura de la cabeza las dos áreas hidrofóbicas de una molécula no se pueden asociar. Sin embargo, cuando las cadenas ligeras  $LC_1$  o  $LC_3$  se pierden el parche hidrofóbico expuesto puede ser más extenso y además la posición del parche con respecto a la curvatura de la cabeza puede permitir ambas asociaciones intra e intermoleculares entre las cabezas.

De las dos hipótesis anteriormente expuestas existen varios argumentos a favor de que el origen de la deformación observada en nuestro estudio pueda estar relacionado con el propio mecanismo de desnaturalización/agregación de la molécula de miosina. En primer lugar si se tiene en cuenta el primer supuesto descrito anteriormente sobre el efecto preventivo de una menor deshidratación intracelular tal y como describió Tanaka (1965) deberíamos esperar que en músculo de bacalao a ambas temperaturas donde el número de fusiones interfilamento identificadas y valores de excentricidad son más elevados los valores de extractabilidad de actomiosina fueran inferiores a los detectados en merluza. Por el contrario los niveles de extractabilidad en merluza son considerablemente inferiores a los encontrados en bacalao a lo largo de todo el periodo de almacenamiento, lo que confirma que la agregación en merluza pueda tener lugar de forma más extensiva a nivel intrafilamento como ya se había demostrado por las micrografías electrónicas obtenidas de las fracciones insolubles.

Por otro lado el análisis morfológico de las miofibrillas de músculo de merluza pone de manifiesto indicios de compresión que tienden a disponer los filamentos en hileras de manera equivalente a la deformación observada en músculo de bacalao. Evidencia de que la aproximación de los filamentos es efectiva es la presencia de algunas fusiones entre filamentos gruesos. Sin embargo el número de fusiones entre

estas fusiones son escasas y los valores de excentricidad no se modifican sustancialmente aunque el efecto de la presión parece ejercer un acercamiento de éstos en el plano 10-10 del mismo modo que se observa en músculo de bacalao.

La morfología de los filamentos gruesos aparece también afectada por la congelación. El efecto que se produce es una pérdida de cohesión entre las moléculas de miosina con lo que los filamentos gruesos aparecen más laxos, hecho que es especialmente constatado en músculo de bacalao almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las estructuras encontradas recuerdan morfológicamente a aquellas formadas por despolimerización de las moléculas de miosina en los filamentos gruesos por efecto de una elevada fuerza iónica como consecuencia de la presencia de una elevada concentración de sal que ejerce su acción debilitando las uniones de tipo secundario entre las colas de las moléculas de miosina. En el esquema representado por Offer y Knight (1988) se observan puntos que representan las colas de las moléculas de miosina después de la despolimerización de los filamentos gruesos. Si bien la acción de una elevada concentración de sal no tiene porqué ser la responsable del cambio morfológico experimentado por los filamentos gruesos, se puede concluir de manera similar a la justificación de las micrografías obtenidas en fracciones insolubles que el mecanismo de desnaturalización consiga una alteración de la estructura en músculo de bacalao independientemente de la contribución de la agregación intrafilamento, fenómeno este último que por la información obtenida por distintas fuentes predomina en merluza donde la agregación detectada incluso desde el comienzo haya permitido mantener la estructura inicial de los filamentos gruesos en estadios avanzados de congelación.



**FIGURA XVI.** Esquema que representa parte del mecanismo de hinchamiento de miofibrillas en sal representado por Offer y Knight (1988). a) Sección transversal en la banda A de fibra muscular esquelética. b) Estructura formada por despolimerización de los filamentos gruesos por acción del ClNa. Los puntos representan las colas de las moléculas de miosina.

implicación de los estudios ultraestructurales en músculo de pescado durante el almacenamiento en congelación se ha basado en una correlación entre éstos y los efectos indeseables que tienen lugar en dichos músculos, especialmente la dureza y pérdida de la capacidad de retener agua después de la descongelación. Liljemark (1969) estableció como conclusión de su trabajo que un empaquetamiento de los filamentos gruesos no era un prerequisite para el endurecimiento de las fibras musculares, cuya causa quizá debía buscarse dentro de los propios filamentos o en sus relaciones independientemente de las distancias entre ellos.

Aitken y Connell (1977) asimismo concluyeron que ambos fenómenos, dureza y pérdida de agua pueden ocurrir sin una disminución de la distancia interfilamento.

Tanaka (1965) estableció una correlación entre la disminución de la distancia interfilamento, disminución de los valores de extractabilidad de actomiosina y dureza en músculo de abadejo.

A partir de nuestro estudio se puede intuir que haya una relación entre nuestros hallazgos morfológicos y los efectos adversos anteriormente descritos. Así en mediciones de textura (resistencia a la cizalladura con la célula de Kramer) llevadas a cabo por del Mazo (1997) en estas muestras, el músculo de bacalao almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  presentaba un incremento de la resistencia a la cizalladura desde las 8 semanas con un valor de 15N/g hasta un valor máximo entre las 22 y 36 semanas de 28 N/g, a partir de este momento se producía una ligera disminución que puede explicarse por pérdida de cohesividad de la muestra, que permite un más fácil acceso de las ranuras de la célula de Kramer. Este estudio llevado a cabo en músculo de merluza a  $-20^{\circ}\text{C}$  no reveló diferencias en cuanto al valor de la resistencia a la cizalladura en función del tiempo de almacenamiento (12N/g).

Estas variaciones observadas en textura en músculo de bacalao fueron correlacionadas en los estudios bioquímicos con el tipo de agregado insoluble en ClNa formado, de modo que en músculo de bacalao almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  el periodo de tiempo en el que se detecta un aumento de la dureza se correlaciona con una mayor presencia de



enlaces covalentes interprotéicos en avanzados estadios de almacenamiento, mientras que en merluza donde no se observan variaciones muy significativas en la naturaleza de los agregados tampoco existen variaciones en los valores de textura. No obstante debe tenerse en cuenta que en músculo de merluza a las 14 semanas se pueden detectar agregados insolubles en SDS y ME que darían idea de un aumento del número de enlaces covalentes desde el control hasta las 14 semanas y sin embargo los valores de resistencia a la cizalladura apenas se modifican en esta especie en función del tiempo.

En el estudio morfológico se observa una correspondencia entre los datos ultraestructurales y texturales de modo que en los periodos en los que aumenta el endurecimiento en músculo de bacalao se detecta un aumento de las fusiones interfilamento, mientras que en merluza donde no existen diferencias en los valores de textura tampoco existían diferencias significativas en la disposición de los filamentos gruesos en la miofibrilla.

Estos resultados permiten hipotetizar que quizá estas diferencias en textura tengan su correspondencia con las diferencias morfológicas observadas en las que puedan incluso estar involucradas las variaciones en la naturaleza química de los enlaces implicados en la agregación, corroborando el supuesto planteado por varios investigadores sobre la influencia de la reducción de la distancia interfilamento por medio de la formación de enlaces entre ellos en el endurecimiento de las fibras.

En relación con el proceso de desnaturalización-agregación se pretendió establecer la importancia de la contribución en dicho proceso del formaldehído que es uno de los agentes propuestos como fundamentales en el proceso de agregación de las proteínas miofibrilares dentro de especies que pertenecen al orden gadiformes. La aplicación de técnicas autorradiográficas realizadas sobre músculo inyectado con  $^{14}\text{COH}$  permite una aproximación más cercana sobre el lugar y posible mecanismo de acción de dicho agente en condiciones fisiológicas que los sistema modelo basados en la adición de formaldehído a extractos proteicos.

En nuestro estudio se pone de manifiesto que el formaldehído interacciona con proteínas de naturaleza miofibrilar aun después del tratamiento del músculo con CNa y SDS lo que permite sugerir que pueda estar asociado a dichas proteínas fuertemente a través de enlaces covalentes. No obstante y aunque el formaldehído que permanece asociado al residuo insoluble representa un bajo porcentaje del total inyectado (aproximadamente un 0.1%), esto no significa que por ello no tenga incidencia modificando las proteínas miofibrilares. Así estudios llevados a cabo por Ang y Hultin (1989) han demostrado que tras la incubación de proteínas con formaldehído tenía lugar un pequeño decrecimiento del número de grupos amino reactivos, hecho que además se correlacionaba con un cambio significativo en las propiedades fisicoquímicas. Así cuando miosina de bacalao fue congelada a  $-80^{\circ}\text{C}$  en presencia de una concentración 1mM de formaldehído se producía una pérdida en un 1.6% de los grupos amino reactivos que se traducía en una pérdida de solubilidad de un 25-30% después de una hora de incubación, lo que significa que un pequeño número de modificaciones de los grupos de cadena más laterales pueden afectar la estabilidad de algunas proteínas cuando están sometidas a condiciones de estres.

Uno de los aspectos a destacar es la selectividad en la interacción del formaldehído con determinados restos musculares observada en nuestros estudios. Podría pensarse que el efecto del formaldehído sea consecuencia de una interacción masiva de dicho compuesto en el área cercana al punto de inyección y que un exceso de dicho agente haya influido en desorganizar la estructura completamente. A este respecto se debe tener en cuenta que las áreas sarcoméricas desorganizadas distan en escasas micras de otras más organizadas que presentan estructuras sarcoméricas reconocibles para pensar que este aspecto haya influido significativamente en la selectividad patente en la unión del formaldehído a determinadas áreas.

Esta selectividad podría ser explicada en función del estado de las proteínas a nivel local. La congelación lleva implícita el cambio en la conformación de las proteínas a causa de la retirada del agua; aspecto que favorece la interacción y acción desnaturalizante del formaldehído según han demostrado estudios recientes (Singh y

Wangh 1977, Ang y Hultin 1989, Sotelo y Mackie, 1993). Probablemente una diferencia de condiciones incluso localmente pueda influir en la interacción del formaldehído destacando aspectos como:

- 1) La concentración de moléculas de soluto en el microambiente de la proteína en el proceso de congelación.
- 2) Retención de suficiente agua líquida alrededor de la proteína para permitir el ataque a los sitios de la proteína blanco.

La importancia de las condiciones presentes en el músculo en relación a la acción del formaldehído quedó puesta de manifiesto por Ang y Hultin (1989). Estos autores encontraron que en extractos de miosina de músculo de bacalao a los que se había añadido formaldehído y posteriormente congelado a  $-25^{\circ}\text{C}$  durante una hora no mostraban pérdida de solubilidad y una escasa disminución en los valores de la actividad ATPásica. Al comparar estos datos con muestras almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante el mismo tiempo a las que se había añadido una concentración de formaldehído equivalente, éstas habían perdido la solubilidad; hecho éste atribuido a que el proceso de congelación descongelación en sí mismo conducía a dicha pérdida de solubilidad. Estos resultados se explicaron en términos de que en el músculo almacenado a  $-25^{\circ}\text{C}$  realmente no se alcanzó dicha temperatura por lo que permanecía en la muestra una mayor cantidad de agua no congelada que en la muestra congelada a  $-80^{\circ}\text{C}$  o durante periodos de almacenamiento más largos a  $-25^{\circ}\text{C}$ , con lo que la concentración de sal en la solución de miosina no era tan elevada causando menor desnaturalización proteica.

En este sentido nuestros estudios ultraestructurales muestran heterogeneidad en el comportamiento de miofibrillas próximas entre sí en lo referente a la deformación experimentada por la red y presencia de fusiones en dichas miofibrillas. Asimismo ya se discutió la mayor influencia de acción de los cristales de hielo en la deshidratación de las miofibrillas que se encuentran más próximas a la cara de dicho cristal Bello et al. (1982)

El primer aspecto a destacar se refiere a las proteínas afectadas por este agente. El análisis morfológico de los residuos proteicos pone de manifiesto que los restos musculares a los que se encuentra asociado el formaldehído pueden corresponderse con restos de banda A. El hecho de que el formaldehído afecte fundamentalmente a miosina ha sido ampliamente aceptado. Childs (1973) demostró que tropomiosina y cadena pesada de miosina eran las proteína más susceptibles a la insolubilización. Oshini y Rodger (1979a) encontraron que la cadena pesada de miosina, cadenas ligeras y troponinas desaparecían con concentraciones crecientes de formaldehído. Matthwes et al. (1980) responsabilizaron a la interacción del formaldehído con cadenas pesadas de miosina en la formación agregados de alto peso molecular constituidos por estas moléculas.

Ang y Hultin (1989) demostraron en sistema modelo la influencia del formaldehído en la agregación e insolubilización de la molécula de miosina.

Respecto al mecanismo de acción del formaldehído, uno de los aspectos más controvertidos se refiere a la participación de este agente en la formación de enlaces interproteicos.

La naturaleza agregadora del formaldehído participando en la formación de enlaces de naturaleza covalente debía esperar manifestarse en la aparición de estructuras sarcoméricas definidas y altamente resistentes a la extracción consecutiva llevada a cabo con el C1Na y SDS de modo comparativo con nuestros estudios de fracciones insolubles en los que una mayor resistencia a la extracción atribuida a una modificación en el tipo y/o número de enlaces se manifiesta de modo general en una mayor organización de la estructura sarcomérica. Por el contrario en el músculo tratado con formaldehído y almacenado a  $-10^{\circ}\text{C}$  durante 22 semanas los restos miofibrilares que no presentan marcaje muestran una integridad superior a aquellos en los que se detecta el formaldehído interaccionando con restos proteicos e incluso a la encontrada en músculo de bacalao tras el tratamiento de  $P_1$  con SDS a las 36 semanas de almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Esto significa que existe un proceso efectivo de agregación por efecto de la

congelación en el que no se descarta la participación de enlaces de naturaleza covalente. Sin embargo en las micrografías el formaldehído no parece tener efecto como agente agregante sobre las proteínas miofibrilares. El efecto sobre las fracciones musculares sobre las que aparece interaccionando parece ser desorganizando la estructura, lo que presenta mayor correspondencia con las teorías más recientes que otorgan un papel desnaturizador al formaldehído (Ang y Hultin 1989).

Aunque se había establecido una estrecha correlación entre la hidrólisis de TMAO y cambios físicos en las proteínas, sin embargo existe poca evidencia sobre la participación del formaldehído en la agregación de proteínas.

En 1975 Connell reconfirmó que las proteínas en músculo de bacalao en condiciones extremas de dureza no están agregadas fundamentalmente por la participación de enlaces covalentes; y que los enlaces de tipo metileno que se habían propuesto como fundamentales tras la interacción del formaldehído con proteínas no son abundantes.

Por el contrario, Dingle et al., (1977) sugirió que la formación de enlaces covalentes de tipo metileno como consecuencia de la reacción de proteínas con el formaldehído tenía un papel importante en la desnaturalización de proteínas y endurecimiento del músculo en esta especie.

Gill et al. (1979) concluyeron que los cambios asociados al endurecimiento de músculo de merluza durante el almacenamiento en congelación son escasamente debidos a la formación de enlaces entre las proteínas estructurales por la acción del formaldehído.

Resultados similares a los de Connell fueron obtenidos por Owusu-Anshay y Hultin (1987). Estos autores no creen en la formación masiva de agregados de alto peso molecular en músculo picado de merluza en el que se encuentran implicados enlaces covalentes de tipo metileno, ya que de un 84% de proteínas miofibrilares que son inextraídas un 2% de las proteínas formaban agregados de peso molecular superior a 200kDa en presencia de mercaptoetanol, e incluso en otras muestras donde se produce la

insolubilización de un 74% de proteínas miofibrilares no se detectaba fracciones de elevado masa molecular. Parece según estos estudios que los cambios físicos en las proteínas y los consiguientes deterioros en la textura no requieren la formación de enlaces de naturaleza covalente por acción del formaldehído.

Ha sido sugerido por Connell (1975) que el formaldehído puede reaccionar con las proteínas formando nuevos grupos que podrían participar en la formación de enlaces no covalentes que puedan estar implicados en los cambios observados en el tejido muscular de pescado.

Uno de los puntos en los que nuestras micrografías podrían presentar controversia con la mayoría de los estudios bioquímicos es que se ha establecido de modo general que el decrecimiento en el porcentaje de proteína extraído estaba relacionado con el porcentaje de formación de formaldehído, DMA y endurecimiento del músculo congelado en especies gadiformes. Sin embargo estudios de Gill et al. (1979) mostraron que no existe siempre este tipo de relación entre dichos parámetros, de modo que en merluza de las tres variables, dimetil amina y formaldehído fueron útiles a la hora de establecer una correlación con los cambios texturales, frente al porcentaje de proteína extraíble que resultó un parámetro menos fiable. Estos datos tienden a sugerir que el mecanismo de endurecimiento en músculo puede ser muy complicado.

Ang y Hultin (1989) encontraron que la presencia de formaldehído en soluciones de miosina causaba alguna agregación de dichas moléculas por la presencia de fracciones de Pm superior a 200kDa en presencia de agentes que reducen los puentes disulfuro. Sin embargo la cantidad de fracciones de elevada masa molecular que se formaban no incrementaban significativamente cuando la concentración de formaldehído aumentaba de 1 a 30 mM. Puesto que la pérdida de solubilidad incrementaba en un 70% a niveles de formaldehído de 20mM concluyó que la formación de enlaces no era un prerequisite para la pérdida de solubilidad, e incluso alguna de estas fracciones de elevado Pm eran detectadas en muestras congeladas en ausencia de formaldehído mientras que ninguna fracción de alto Pm se formaba cuando las soluciones de miosina no se congelaban. Por tanto la pérdida de solubilidad

detectada en muchos estudios en los que se ha añadido formaldehído no tienen porqué estar asociados necesariamente a la formación de enlaces entre proteínas. Por medio de interacciones con grupos laterales de cadena de las proteínas, el formaldehído puede incrementar la tasa de desnaturalización de proteínas durante el almacenamiento en congelación. Este incremento en la desnaturalización podría conducir a la agregación de proteínas a través de interacciones no covalentes. Estos cambios no están restringidos a aquellos causados por formaldehído sino que cualquier mecanismo por el que se modifiquen las cadenas laterales de las proteínas tendrían efectos similares, de modo que aunque los cambios que se producen en las proteínas durante el almacenamiento en congelación ocurran más rápidamente ante la presencia de formaldehído, el músculo de pescado que carezca de esta capacidad puede sufrir cambios similares aunque probablemente más lentamente por diferentes mecanismos Ang y Hultin (1989). Prueba de ello es que el endurecimiento y pérdida de solubilidad tiene lugar en algunas especies en las que la producción de formaldehído es escasa (Laird y Mackie, 1981, Lim y Haard, 1984).

El efecto desnaturalizante obtenido por Ang y Hultin (1989) de la molécula de miosina durante el almacenamiento en congelación en presencia de formaldehído puedan ser explicados por la existencia de diferentes estados de desnaturalización que podrían ser justificados por diferencias en la estructura terciaria de la molécula.

Sotelo y Mackie (1993) propusieron un modelo según el cual la molécula de miosina desplegada por efecto de la congelación puede interaccionar con el formaldehído en la zona interna impidiendo la recuperación de su estructura tridimensional tras la descongelación. El efecto desnaturalizante fue asimismo confirmado por estudios por microscopía electrónica llevados a cabo por Oshini y Rodger (1980). Estos autores observaron cambios en la forma de las proteínas a nivel molecular de filamentosas (actomiosina) a partículas granulares al incrementar la concentración de formaldehído añadido.

Por otro lado se debe tener en cuenta que la mayoría de las condiciones en las que se ha estudiado el efecto del formaldehído son distintas a las que ocurren durante el

almacenamiento del músculo en congelación. Babbit et al. (1972) encontraron que se producía un decrecimiento en el 75% de la extractabilidad de proteínas en músculo in situ a concentraciones de formaldehído de 0.003%. Estudios realizados por Childs (1973) demostraron que un 75% de miofibrillas resultaban insolubilizadas tras su incubación con una concentración de formaldehído del 0.05%, mientras que se necesitaba un 0.2% de formaldehído añadido a extractos proteicos para conseguir una pérdida de extractabilidad equivalente a la obtenida en músculo o miofibrillas.

Los resultados obtenidos por estos autores permiten sugerir dos hipótesis:

- a) El formaldehído tiene poco efecto sobre la extractabilidad in situ.
- b) El formaldehído es un desnaturalizante más efectivo en un músculo que en un extracto de proteínas.

Nuestros resultados ponen de manifiesto escasa participación del formaldehído en la insolubilización de las proteínas, actuando más bien como modificador de la estructura de las mismas en las zonas sarcoméricas en las que este agente aparece interaccionando.





## CONCLUSIONES

- Existen diferencias sustanciales entre especies en el fenómeno de agregación proteica durante el almacenamiento del músculo en congelación. En músculo de merluza la aparición de la agregación es más temprana y el fenómeno apenas depende de la temperatura de almacenamiento. Por el contrario en músculo de bacalao la temperatura tiene gran influencia como muestra el escaso nivel de agregación del músculo almacenado a  $-30^{\circ}\text{C}$  en estadios avanzados de almacenamiento frente al almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La influencia de la integridad muscular es tal que a menor integridad mayor velocidad e incidencia en el fenómeno de agregación de esta especie.
- Respecto a la naturaleza química de la agregación entre proteínas miofibrilares se pone de manifiesto la importancia de la participación de enlaces de naturaleza secundaria (puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas) así como de enlaces de naturaleza covalente disulfuro y no disulfuro, siendo una excepción el músculo de bacalao almacenado a  $-30^{\circ}\text{C}$  que muestra escasa participación de enlaces covalentes.
- La temperatura es un parámetro que afecta de modo diferente a la evolución química de la agregación dentro de cada especie. En músculo picado de bacalao y músculo íntegro almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , los enlaces de naturaleza secundaria aparecen antes que los de naturaleza covalente. A  $-30^{\circ}\text{C}$  la agregación es atribuida a la presencia de enlaces de naturaleza secundaria, pudiendo detectarse de forma incipiente la presencia de enlaces covalentes disulfuro en los últimos estadios de almacenamiento. En músculo de merluza la temperatura no ejerce prácticamente influencia en la naturaleza química de la agregación. En ambas temperaturas los enlaces covalentes aparecen tempranamente, no existiendo modificaciones significativas en la naturaleza de los enlaces implicados en la agregación en función del tiempo.

- En la agregación entre moléculas de miosina parecen ampliamente implicadas interacciones de tipo cabeza-cabeza que explicarían la presencia de los oligómeros constituidos por partículas proteicas de naturaleza globular presentes en los extractos solubles.
- El estudio inmunohistoquímico ha demostrado la existencia de desnaturalización como resultado de un cambio conformacional de la cadena pesada de miosina en músculo de bacalao por efecto de la congelación.
- En músculo de bacalao el fenómeno de agregación se manifiesta en la formación de enlaces entre moléculas de proteína que se traducen en fusiones entre filamentos gruesos o deformaciones que modifican la distancia entre dichos filamentos en determinados planos cristalográficos. En músculo de merluza la agregación no se manifiesta en un aumento de las fusiones o alteraciones significativas de la disposición de los filamentos gruesos durante el almacenamiento de esta especie en congelación.
- El origen de la deformación en la red constituida por filamentos gruesos en las dos especies parece estar más relacionada con el mecanismo de desnaturalización /agregación de la miosina que con las fuerzas producidas por la redistribución del agua durante la congelación.
- Pueden establecerse diferencias en el mecanismo de desnaturalización-agregación de la molécula de miosina para las diferentes especies. En músculo de merluza se observa un predominio de agregación intermolecular dentro de un mismo filamento desde tempranos estadios de almacenamiento. En músculo de bacalao parece existir un fenómeno de desnaturalización en dichos estadios iniciales que puede contribuir a desorganizar la estructura del filamento grueso. Este hecho no descarta una agregación intrafilamento paralela o posterior a dicha desnaturalización a pesar de que la agregación entre filamentos gruesos es un fenómeno ampliamente extendido en músculo de bacalao en estadios avanzados de almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $-30^{\circ}\text{C}$ .

- Las diferencias morfológicas entre especies en la disposición de los filamentos gruesos en las miofibrillas se correlacionan con las modificaciones en los datos de textura observados en el músculo durante el almacenamiento del músculo en congelación, corroborando la hipótesis sobre la influencia del acortamiento de la distancia entre filamentos gruesos y el endurecimiento de las fibras musculares. Si bien no es descartable que pueda establecerse una correlación entre modificaciones químicas de los enlaces y variaciones en la ultraestructura en función del tiempo con cambios en la textura del músculo.

- El formaldehído interacciona con proteínas de naturaleza miofibrilar por medio de enlaces resistentes a la acción de agentes que hidrolizan enlaces de tipo secundario. Este agente no sería responsable, en gran medida, de la insolubilización de dichas proteínas por la agregación debida a la formación de enlaces covalentes asignándole un papel como agente que participe o haga a las proteína más susceptibles a la desnaturalización durante el almacenamiento del músculo en congelación.



## BIBLIOGRAFÍA.

Aitken, A. y Connell, J.J. (1977). The effect of frozen storage on muscle filament spacing in fish. Freezing, Frozen storage and Freeze-drying. P. 187-191. International Institute of Refrigeration, Paris.

Amano, K. y Yamada, K. (1965). A biological formation of formaldehyde in cod flesh. En: "FAO-The Technology of Fish Utilization". P. 73-78. Ed R.Kreuzer. Fishing News (Books), London.

Ang J.F. y Hultin H.O. (1989). Denaturation of cod myosin during freezing after modification with formaldehyde. J.Food Sci. 54, 814-818.

Babbitt, J.K., Crawford, D.L. y Law, D.K. (1972). Decomposition of trimethylamine oxide and changes in protein extractability during frozen storage of minced and intact hake (*Merluccius merluccius*) muscle. J.Agr.Food.Chem. 20, 1052-1054.

Bagshaw, C.R. (1980). Divalent metal ion binding and subunit interactions in myosin: a critical review. J.Muscle.Res. Cell. Motil. 1, 255-277.

Bauer, R., Hezel U. y Kurz, D. (1987). High-resolution imaging of thick biological specimens with an imaging Electron Energy Loss Spectrometer. Optik 77, N° 4 171-174.

Bechtel, P.J. (1986). Muscle development and contractile proteins. En:"Muscle as Food". P 1-35. Ed. P.J. Bechtel. Academic Press, Inc. Orlando, California, EEUU.

Bello, R.A., Luft, J.H. y Pigott, G.M. (1981). Improved histological procedure for microscopic demonstration of related changes in fish muscle tissue structure during holding and freezing. J.Food.Sci. 46, 733-737.

Bello, R.A., Luft, J.H. y Pigott G.M. (1982). Ultrastructural study of skeletal fish muscle after freezing at different rates. J.Food.Sci. 47, 1389-1394.

- Buttkus, H. (1970). Accelerated denaturation of myosin in frozen solution. *J.Food Sci.* 35, 558-562.
- Buttkus, H. (1971). The sulfhydryl content of rabbit and trout myosins in relation to protein stability. *Can. J. Biochem.* 49, 97-102.
- Buttkus, H. (1974). On the nature on the chemical and physical bonds which contribute to some structural properties of protein foods: a hypothesis. *J.Food.Sci.* 39, 484-492.
- Calvelo A. (1981). Recent studies on meat freezing. *Dev.Meat.Sci.* 2, 125-158.
- Castell, C.H. y Smith, B. (1973). Measurement of formaldehyde in fish muscle using TCA extraction and the Nash reagent. *J.Fish.Res.Bd. Can.* 30, 91-98.
- Colmenero F.J., Tejada M. y Borderías A.J. (1988). Effect of seasonal variations on protein functional properties of fish during frozen storage. *J.Food.Biochem.* 12, 159-170.
- Connell, J.J. (1959). Aggregation of cod myosin during frozen storage. *Nature.* 183, 664-665.
- Connell, J.J. (1962). *J.Sci.Food.Agric*, 13, 607.
- Connell, J.J. (1965). The use of Sodium Dodecyl sulphate in the study of protein interactions during the storage of cod flesh at -14°C. *J.Sci Fd Agric.* 16, 769-783.
- Connell, J.J. (1968). The effect of freezing and frozen storage on the proteins of fish muscle. En: "Low Temperature Biology of Foodstuffs". P. 333-358. Eds. J.Hawthorn y E.J.Rolfe. Pergamon Press, Oxford, Reino Unido.
- Connell, J.J y Howgate, P. (1969). Discussion of refer.5. "Freezing and Irradiation of Fish". P. 145. Ed R Kreuzer Fishing News (Books) Ltd, London.
- Connell, J.J. (1975). The role of formaldehyde as a protein cross-linking agent acting during the frozen storage of cod. *J.Sci.Food.Agric.* 26, 1925-1929.

- Chiba, A., Hamaguchi, M., Kosaka, M., Tokuno, T., Asai, T., y Chichibu, S. (1991). Quality evaluation of fish meat by phosphorus-nuclear magnetic resonance. *J. Food Sci.* 56, 660-664.
- Childs, E.A. (1973). Interaction of formaldehyde with fish muscle in vitro. *J. Food Sci.* 38, 1009-1011.
- Del Mazo (1997). Comportamiento de las proteínas miofibrilares de músculo de bacalao (*Gadus morhua*, L.) y merluza (*Merluccius merluccius*, L.) durante su conservación en congelación. (Trabajo de tesis doctoral).
- Dingle, J.R. y Hines, J.A. (1975). Protein instability in frozen flesh from fillets and frames of several comercial atlantic fishes during storage at  $-5^{\circ}\text{C}$ . *J. Fish. Res. Board. Can.* 32, 775-783.
- Dingle, J.R., Keith, R.A. y Lall, B. (1977). Protein instability in frozen storage induced in minced muscle of flatfish by mixture with muscle of red hake. *Can. Inst. Food. Sci Technol. J.* 10, 143-146.
- Dyer, W.J. (1951). Protein denaturation in frozen and stored fish. *Food Res.* 16, 522-527.
- Dyer, W.J. (1967). Frozen fish muscle-chemical changes and organoleptic quality. *Cryobiology.* 3, 297-305.
- Egelman, E.H. y De Rosier, D.J. (1983). Appendix: A model for D-actin derived from image analysis of isolated filaments. *J. Mol. Biol.* 166, 623-629.
- Elliot, G.F., Lowy, J. y Worthington, C.R. (1963). An X-ray and light diffraction study of the filament lattice of striated muscle in the living state and in rigor. *J. Mol. Biol.* 6, 295-305.
- Fretheim, K., Egelandsdal, B. y Harbitz, O. (1985). Slow lowering of PH induces gel formation of myosin. *Food Chemistry.* 18, 169-178.



Fürst, D.O., Osborn, M., Nave, R. y Weber, K. (1988). The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten nonrepetitive epitopes starting at the Z line extends close to the M-line. *J.Cell.Biol.* 106, 1563-1572.

Galembeck, F., Ryan, D.S., Whitaker, J.R. y Freeney, R.E. (1977). Reaction of proteins with formaldehyde in the presence and absence of sodium borohydride. *J.Agric.Food.Chem.* 25, 238-245.

Gill, T.A., Keith, R.A. y Smith Lall, B. (1979). Textural deterioration of red hake and haddock muscle in frozen storage as related to chemical parameters and changes in the myofibrillar proteins. *J.Food.Sci.* 44, 661-667.

Haard, N.F. (1992). Biochemical reactions in fish muscle during frozen storage. En: "Seafood science and technology". P. 176-209. Ed. G. Bligh. Fishing News (Books), Oxford, Londres.

Hanson, J. y Huxley, H.E. (1953). Structural basis of the cross-striations in muscle. *Nature, Lond.* 172, 530-535.

Hasselbach, W. (1953). Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Muskelfibrillen bei totaler und partieller Extraktion des-L-Myosins. *Naturfosch.* 8b, 449-453.

Hasselbach, W. y Schneider, G. (1951). Der L-Miosin-und Aktingehalt des Kaninchenmuskels. *Biochem. Z.* 321, 461-468.

Holmes KC. (1997). The swinging lever-arm hypothesis of muscle contraction. *Curr Biol* 7, 112-118.

Howgate, P. (1979). Fish. En: "Food Microscopy". P. 343-392. Ed. J.G. Vaughan Academic Press INC (London).

---

Hultin, H.O. (1992). Trimethylamine-N-Oxide (TMAO) Demethylation and Protein Denaturation in Fish Muscle. In: Advances in seafood biochemistry: Composition and quality. P. 25-42. Eds. Flick and Martin. Technomic Publishing Co. Inc. Lancaster, Pennsylvania, EEUU.

Huxley, H.E. (1951). Low-angle X-ray diffraction studies on muscle. Disc. Faraday. Soc.II, 148-153.

Huxley, H.E. (1953a). Electron microscope studies of the organization of the filaments in striated muscle. Biochim. Biophys.Acta, 12, 387-394.

Huxley, H.E. (1957). The double array of filaments in cross-striated muscle. J. Biophysic. and Biochem. Cytol. 3, 5, 631-647.

Huxley, H.E. (1963). Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle. J. Mol Biol. 7, 281-308.

Huxley H.E. (1972). Molecular basis of contraction in cross striated muscles. En: "The structure and function of muscle". Ed. G.H. Bourne. Academic Press. INC. New York. EEUU.

Huxley, H.E. y Brown, W. (1967). The Low-angle X-ray diagram of vertebrate striated muscle and its behaviour during contraction and rigor. J. Mol. Biol. 30, 383-434.

Huxley, H.E. y Hanson, J. (1957). Quantitative studies on the structure of cross-striated myofibrils. I. Investigations by interference microscopy. Biochim. Biophys. Acta 23, 229-249.

Jarenbäck, L. y Liljemark, A. (1975a). Ultrastructural changes during frozen storage of cod (*Gadus morhua* L.). Journal of Food Technology. 10, 229-239.

Jarenbäck, L y Liljemark, J. (1975b). Ultrastructural changes during frozen storage of cod (*Gadus morhua* L.). Journal of Food Technology. 10, 309-325.

---

Jiang, S.T., Hwang, B.S. y Tsao, C-Y. (1987). Effect of adenosine nucleotides and their derivates on the denaturation of myofibrillar proteins in vitro during frozen storage at -20°C. *J.Food Sci.* 52, 117-123.

Kaminer, B. y Bell, A.L. (1966). Myosin filamentogenesis: Effects of PH and ionic concentration. *J.Mol.Biol.* 20, 391-401.

Kawashima, T., Arai, K. y Saito, T. (1973). Studies on muscular proteins of fish-IX. An attempt on quantitative determination of actomyosin in frozen surimi from Alaska-Pollack. *Bull.Jpn.Soc.Sci.Fish.* 39, 207-214.

Kelleher, S.D., Buck, E.M., Hultin, H.O., Parkin, K.L., Licciardello y J.J., Damon, R.A. (1981). Chemical and physical changes in red hake blocks during frozen storage. *J.Food Sci.* 47, 65-70.

King, F.J. (1966). Ultracentrifugal analysis of changes in the composition of myofibrillar proteins extracts obtained from fresh and frozen cod muscle. *J.Food Sci.* 31, 649-663.

Knappeis, G.G. y Carlsen F. (1968). The ultrastructure of the M line in skeletal muscle. The ultrastructure of the M line in skeletal muscle. The ultrastructure of the M line in skeletal muscle. The ultrastructure of the M line in skeletal muscle. The ultrastructure of the M line in skeletal muscle. *J.Cell. Biol.* 38, 202-211.

Laird, W.M., Mackie, I.M. y Hattula, T. (1980). Studies of the changes in the proteins of cod frame minces during frozen storage at -15°C. En: *Advances in fish science and technology* P. 428-434. Jubilee conference of the Torry Research Station, Aberdeen UK. Eds J.J Connell, staff of Torry Research Station. Fishing News Books: Surrey, UK.

Laird, W.M. y Mackie, I.M. (1981). Protein changes during frozen storage of cod. En: "Advances in the Refrigerated Treatment of Fish". P 349-355. Refrigeration Science and Technology, I.I.R. Commissions C2, D1, D2, D3, Boston, EEUU.

- Le blanc, E.L., Le blanc, R.J. y Blum, I.E. (1988). Prediction of quality in frozen cod (*Gadus morhua*) fillets. *J.Food.Sci* 53, 328-340.
- Lee, C.M. (1982). Physical and biochemical changes in fish muscle under various freezing conditions. *Quick Frozen Foods* 45, 30-32.
- Liljemark, A. (1969). Influence of freezing and cold storage on the submicroscopical structure of fish muscle. In: *Freezing and Irradiation of Fish* P 140-146. Ed R. Kreuzer Fishing News (Books) Ltd, London.
- Lim, H.K. y Haard, N.F. (1984). Protein insolubilization in frozen Greenland Halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*). *Journal of Food Biochemistry*. 8, 163-187.
- Love, R.M. (1966). Freezing of animal tissue. En: *Cryobiology* P.317-406. Ed H.T. Meryman, Academic Press, New York. EEUU.
- Love, R.M. (1988). The food fishes. "Their intrinsic variation and practical implications". Ed H.T. Meryman. Academic Press Van Nostrand Reinhold, New York.
- Love, R.M. y Abel, G. (1966). *J.Fd.Tecnol* 1, 323.
- Lowey, S., Goldstein, L., Cohen, C. y Luck, S.M. (1967). Proteolytic degradation of myosin and the meromyosins by a water-insoluble polyanionic derivative of trypsin: properties of a helical subunit isolated from heavy meromyosin. *J.Mol Biol.* 23, 287-304.
- Lowey, S., Slater, H.S., Weeds, A.G. y Baker, H. (1969). Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. *J Mol Biol* 42, 1-29
- Mackie, I.M. (1993). The effects of freezing on flesh proteins . *Food Reviews International* 9, 547-610.
- Mao, W. y Sterling, C. (1970). Parameters of texture change in processed fish: Crosslinkage of proteins. *J.Texture Studies* 1, 484-490.

- Matsumoto, J.J. (1979). Denaturation of fish muscle proteins during frozen storage. En "Proteins at Low temperature". P.205-224. Ed. O Fennema. Am. Chem. Soc., Washington, D.C., EEUU.
- Matsumoto, J.J. (1980). Chemical deterioration of muscle proteins during frozen storage. En "Chemical deterioration of proteins". P. 95-124. Eds. J.R.Whitaker y M.Fujimaki. ACS Symp. nº 123, Am.Chem.Soc., Washington, D.C., EEUU.
- Matsumoto, J.J., Tsuchiya, T., Noguchi, S., Ohnishi, M. y Akahane, T. (1977). Presentado en el 26 Congreso Pure and Applied Chemistry, Tokyo.
- Matthews, A.D., Park, G.R. y Anderson, E.M. (1980). Evidence for the formation of covalent crosslinked myosin in frozen stored cod minces. En: "Advances in Fish Science and Technology". P 438-444. Ed. J.J. Connell. Fishing News Books Ltd. Surrey. Reino Unido.
- Meryman H.T. (1966). The interpretation of freezing rates in biological materials. *Cryobiology* 2, 165-170.
- Montero, P., Borderías A.J. (1990). Behaviour of myofibrillar proteins and collagen in hake (*Merluccius merluccius*) muscle during frozen storage and its effect on texture. *Z.Lebensm Unters Forsch.* 190, 112-117.
- Moore, P.B., Huxley H.E. y De Rosier D.J. (1970). Three-dimensional reconstruction of F-actin thin filaments and decorated thin filaments. *J.Mol.Biol.* 50, 279-295.
- Muramoto, M., Yamamoto, Y., y Seki, N. (1989). Comparison of calpain of various fish myosins in relation to their thermal stabilities. *Bull.Jap.Soc.Sci.Fish.* 55, 917-923.
- Noda, T., Isogai, K., Hayashi, H. y Katunuma, N. (1981). Susceptibilities of various myofibrillar proteins to cathepsine B and morphological alteration of isolated myofibrils by this enzyme. *J.Biochem.* 90, 371-379.

Noguchi, S. y Matsumoto, J.J. (1970). Studies on the control of the denaturation of the fish muscle proteins during the frozen storage-I. Preventive effect of Na-glutamato. Bull. Japan.Soc.Sci.Fish. 36,1078-1087.

Offer, G. y Knight, P. (1988). The structural basis of water holding in meat. Part 1: General principles and water uptake in meat processing. P. 63-243. En Developments in meat science-4. Ed Ralston Lawrie. Elsevier applied science.

Oguni, M., Kubo, T. y Matsumoto, J.J. (1975). Studies on the denaturation of fish muscle proteins- I Physico-chemical and electron microscopical studies of freeze-denatured carp actomyosin. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 41, 1113-1123.

Oshini, M. y Rodger, G.W. (1979a). Effect of formaldehyde addition at different ionic strength on salt-extractable proteins of fish muscle. En: "Advances in Fish Science and Technology. P.459-466. Ed. J.J.Connell.Fishing News Books Ltd., Farnham, Reino Unido.

Ohnishi, M. y Rodger, G.W. (1980). Analysis of the salt soluble protein fraction of cod muscle by gel filtration. In: Advances in fish science and technology. P 422-428. Eds. Jubilee conference of the Torry Research Station, Aberdeen UK, J.J Connell, staff of Torry Research Station. Fishing News Books: Surrey, UK.

Osnishi, M., Tsuchiya, T. y Matsumoto J.J. (1978). Electron microscopic study of the cryoprotective effect of aminoacids on freeze denaturation of carp actomyosin. Bull. Japan.Soc.Sci.Fish. 44, 755-762.

Owusu-Ansah, Y.J. y Hultin, H.O. (1987). Effect of in situ formaldehyde production on solubility and crosslinking of protein of minced red hake muscle during frozen storage. J.Food.Biochem. 11, 17-39.

- Parkin, K.L. y Hultin, H.O. (1981). A membrane fraction from red hake muscle catalyzing the conversion of TMAO to dimethylamine and formaldehyde. P. 475-481. Advances in the refrigerated treatment of fish. International Institute of Refrigeration. Boston (USA)
- Partman, W. (1964). Electron microscopic changes in the meat of fish and warmblooded animals during the chilling and freezing process. *Kaltetechnik* 16, 341-345
- Pastra-Landis, S.C. y Lowey, S.(1986). Myosin subunit interactions. Properties of the 19000-dalton light chain-deficient myosin. *J.Biol chem* 261, 14811-14816.
- Peachy, L.D., Heath, J.P. y Lamprecht, G. (1986). The use of an energy-filtering electron microscope to reduce chromatic aberration in images of thick biological specimens. In: proceedings of the 44th Annual Meeting of the Electron Microscopy Society of America P 88-91. Ed. G.W. Bailey . San Francisco Press, Inc., San Francisco USA.
- Pepe, F.A. (1967). The myosin filament. I. Structural organization from antibody staining observed in electron microscopy. *J.Mol.Biol.* 27, 203-225.
- Perry, S.V. y Corsi, A. (1958). Extraction of proteins other than myosin from the isolated rabbit myofibril. *Biochem.J.* 68, 5-12.
- Powrie, W.D. (1973). Low-temperature preservation of Foods and Living Matter P 282. Eds. O.R. Fennema, W.D. Powrie y E.H. Marth Marcel Dekker, Inc., New York.
- Ragnarsson, K. y Regenstein, J.M. (1989). Changes in electrophoretic patterns of gadoid and non-gadoid fish muscle during frozen storage. *J.Food.Sci* 54, 819-823.
- Rayment, I., Rypniewski, W.R., Schmidt-Base, K., Smith, R., Tomchick, D.R., Benning, M.M., Winkelmann, D.A., Wesengerg, G. y Holden, H.M. (1993). Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: A molecular motor. *Science* 261, 50-58.

- Reay, G.A. (1933). The influence of freezing temperatures on haddock's muscle. Part I. *J.Soc.Chem.Ind.Lond.* 52, 265-269.
- Regenstein, J.M., Schollosser, M.A., Samson, A. y Fey, M. (1982). *Chemistry and biochemistry of marine food products*. Avi, Westport, Connecticut, P 137-148.
- Rehbein, H. (1985). Does formaldehyde form cross-links between myofibrillar proteins during frozen storage of fish muscle?. *Refriger.Sci.Technol.* 4 93-99.
- Reid, D.S., Doong, N.F., Snider, M., y Foin, A. (1986). Changes in the quality and microstructure of frozen rockfish. "Seafood quality determination". P1 Eds. D.E. Kramer y J. Liston. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Rice, R.V. (1961a). Conformation of individual macromolecular particles from myosin solutions. *Biochim.Biophys.Acta* 52, 602-604.
- Rice, R.V. (1961b). An electron microscopical examination of configurations of ribonucleic acid and other polyelectrolytes. *Biochim.Biophys.Acta* 53, 29-43.
- Rice, R.V.(1964). *Biochemistry of muscle contraction*. Ed J.Gerley.P.141. Little Brown, Boston, Massachusetts.
- Sharp, A. y Offer, G. (1992). The mechanism of formation of gels from myosin molecules. *J.Sci.Food.Agric.* 58, 63-73.
- Shenouda S.Y.K. (1980). Theories of protein denaturation during frozen storage of fish flesh. *Advances in Food Research.* 26, 275-311.
- Sikorski, Z.E y Kolakowska, A. (1990). Congelación de alimentos marinos. En "Tecnología de los productos del mar. Recursos, composición nutritiva y conservación". P 151-167. Ed. Z.E Sikorski. Acribia S.A, Zaragoza, España.
- Simpson, M.V. y Haard, N.F. (1987). Temperature acclimation of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and its influence on freezing point and biochemical damage of postmortem muscle during storage at 0°C and -3°C. *J. Food. Biochem.* 11, 69-93.



- Singh, R.P. y Wang, C.Y. (1977). Quality of frozen foods. *J.Food.Proc.Eng.* 1, 97-127.
- Slayter, H.S. y Lowey, S. (1967). Substructure of the myosin molecule as visualized by electron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 58(4),1611-1618.
- Sotelo, C.G. y Mackie, I.M. (1993). The effect of formaldehyde on the aggregation behaviour of bovine serum albumine during storage in the frozen and unfrozen states in the presence and absence of cryoprotectants and other low molecular weight hydrophilic compounds. *Food Chem.* 47, 263-270.
- Sotelo, C.G., Aubourg, S.P., Pérez Martín, R.I. y Gallardo, J.M. (1994). Protein denaturation in frozen stored hake (*Merluccius merluccius* L.) muscle: The role of formaldehyde. *Food Chem.* 50. 265-274.
- Sotelo, C.G., Piñeiro, C. y Pérez Martín, R., (1995). Denaturation of fish proteins during frozen storage: role of formaldehyde. *Z Lebensm Unters Forsch* 200, 14-23
- Sutoh, K., Tokunaga, M. y Wakabayashi, T. (1989). Electron microscopic mappings of myosin head with site-directed antibodies. *J.Mol.Biol* 206, 357-363.
- Szent-György, A.G., Holtzer, H. y Johnson, W.H. (1964). En: *Biochemistry of muscle contraction*. Ed J.Gergekey. P 354. Little , Brown, Boston, Massachussetts.
- Takahashi, K., Nakamura, F. y Inoue, A. (1981). Postmortem changes in the actin-myosin interaction of rabbit skeletal muscle. *J.Biochem.* 89, 321-324.
- Takahashi, K., Nakamura, F. y Okamoto, M. (1982). A myofibrilar component that modifies the actin-myosin interaction in postrigor skeletal muscle. *J.Biochem.* 92,809-815.
- Tanaka, K. (1965). Electron-microscopic studies on toughness in frozen fish. En: *The Technology of Fish Utilisation*. P 121-125. Ed R. Kreuzer. Fishing News (Books) Ltd London.

Tejada, M., Careche, M., Torrejón, P., Del Mazo, M.L., Solas, M.T., García, M.L. y Barba, C.(1996). Study of protein extracts and aggregates forming in minced cod (*Gadus morhua*) during frozen storage. *J.Sci.Food. Agric.* 44, 3308-3314.

Toyohara, H., Kimoshita, M., Ando, M., Yamashita, M., Konogaya, S., y Sakaguchi, M. (1993a). Elevated activity of cathepsin L-like protease in the jellied meat of Japanese flounder. *Bull.Jap.Soc.Sci.Fish.* 59,1909-1914.

Toyohara, H., Kimoshita, M., Kimura, I., Sakate, M. y Sakaguchi, M. (1993b). Cathepsin L-like protease in Poacific hake muscle infected by myxosporidian parasites. *Bull.Jap.Soc.Sci.Fish.* 59,1101-1108.

Tsuchiya, T., Tsuchiya, Y., Nonomura, Y. y Matsumoto J. (1975). Prevention of freeze denaturation of carp actomyosin by sodium glutamate. *J. Biochem.* 77, 853-862.

Tsuchiya, Y. , Tsuchiya, T. y Matsumoto, J.J. (1980). The nature of the cross-bridges constituting aggregates of frozen stored carp myosin and actomyosin. En: "Advances in fish science and technology". P. 434-438. Eds Jubilee conference of the Torry Research Station, J.J Connell, Staff of Torry Research Station. Fishing New Books: Surrey, UK.

Walker, M. y Trinick, J. (1986). Electron microscope study of the effect of temperature on the length of the tail of the myosin molecule. *J Mol Biol* 192, 661-667

Walker, M. y Trinick, J. (1988). Visualization of domains in native and nucleotide-trapped myosin heads by negative staining. *Journal of Muscle Research and Cell Motility.* 9, 359-366.

Walker, M., Knight, P. y Trinick, J. (1985). Negative staining of myosin molecules . *J.Mol.Biol.* 184, 535-542.

Winkelmann, D.A., Mekeel, H. y Rayment, I. (1985). Packing analysis of crystalline myosin subfragment-1. Implications for the size and shape of the myosin head. *J Mol Biol.* 181, 487-501.

Wolfe, F.H. y Samejima, K. (1976). Further studies of postmortem aging effects on chicken actomyosin. *J.Food Sci.* 41, 244-249.

Yamashita, M. y Komagaya, 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.