

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**  
**Facultad de Ciencias Farmacéuticas Bioquímicas y Biotecnológicas**  
**Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica**



**Análisis Bioinformático de una proteína expresada en el músculo de  
*Engraulis ringens* (Anchoveta peruana). Una perspectiva nutricional.**

*Autor:*

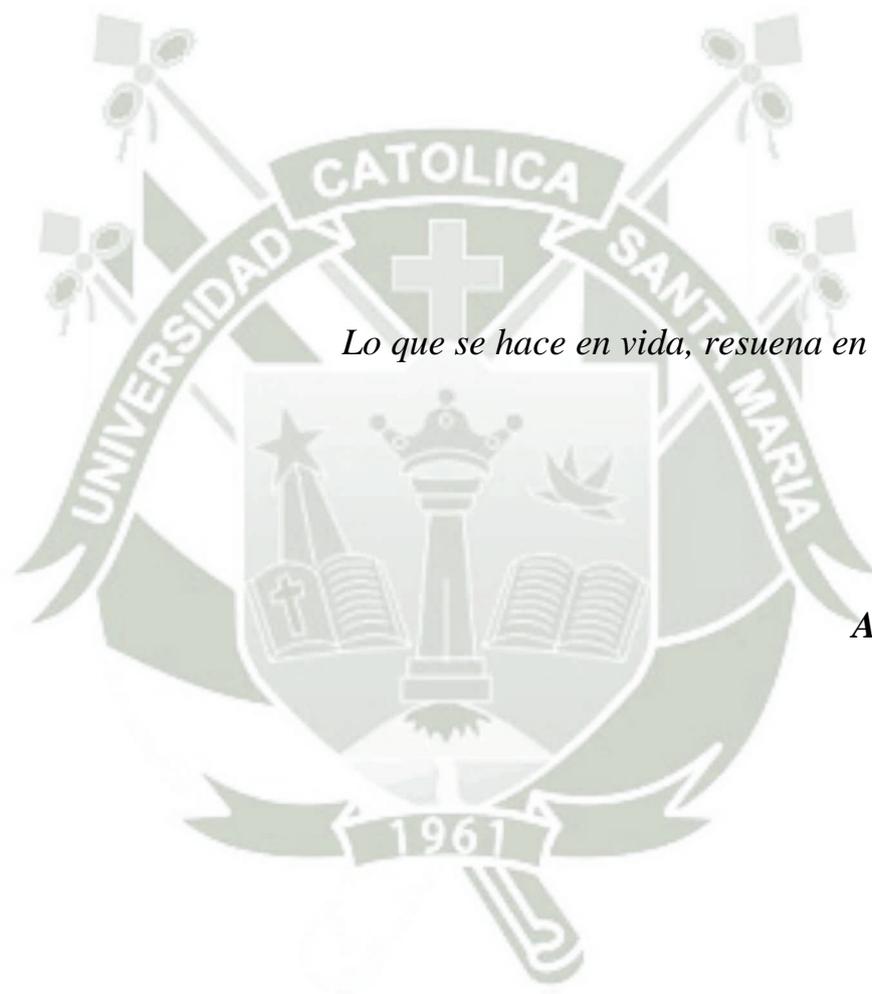
*Bachiller Alegre Loayza Christian Renato*  
*Para optar el título profesional de*  
***INGENIERO BIOTECNÓLOGO***

*Asesores:*

*Prof. Luis Alberto Ponce Soto Ph.D.*  
*Dr. Gonzalo Dávila del Carpio*

**AREQUIPA - PERÚ**

**2015**



*Lo que se hace en vida, resuena en la eternidad*

*A mi Familia*

## ÍNDICE

	Pág.
<b>Introducción.</b>	1
<b>Objetivos.</b>	4
1.    Objetivo general.	4
2.    Objetivo específico.	4
<b>Hipótesis.</b>	4
<b>Capítulo I: Marco teórico.</b>	5
<b>1.  <i>Engraulis ringens</i> (Anchoveta peruana).</b>	5
1.1.  Taxonomía.	5
1.2.  Sinonimia.	6
1.3.  Características anatómicas.	6
1.4.  Distribución geográfica.	7
1.5.  Alimentación.	8
1.6.  Composición química.	9
1.7.  Importancia económica y social.	11
<b>2.  Proteínas en peces.</b>	12
2.1.  Péptidos con actividad biológica.	13
2.1.1.  Propiedades beneficiosas de los péptidos con actividad biológica	15
<b>3.  Tecnología de la proteómica</b>	16
3.1.  Separación de proteínas	16
3.2.  Identificación y caracterización de proteínas	17
3.3.  Fragmentación de proteínas	18
<b>4.  Espectrometría de Masas</b>	19
4.1.  Preparación de la muestra	19
4.2.  Ionización de la muestra	19
4.2.1.  MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)	20
4.3.  Análisis de masa	21
4.3.1.  Analizadores de tiempo de vuelo (ToF)	21

<b>5. Análisis bioinformático en la era post-genómica.</b>	22
5.1. Huella de Masa Peptídica	23
5.2. Secueciamento utilizando datos generados con la técnica Product Ion Scan en MS/MS.	23
5.3. Secuenciación <i>de novo</i> y análisis bioinformático	24
5.4. Estabilidad y plegamientos de proteínas.	25
5.5. Las cadenas laterales	25
5.6. Estabilidad y desnaturalización de proteínas.	25
5.7. Plegamiento de proteínas:	26
5.7.1. Termodinámica del plegamiento	27
a. Entropía conformacional	27
b. Interacciones carga-carga	27
c. Enlaces de hidrógeno internos	28
d. Interacciones de Van der Waals	28
e. Interacciones hidrofóbicas	28
5.8. Predicción y modelaje de estructura de proteínas	29
5.8.1. Herramientas de evaluación del modelo de la estructura de proteínas	29
5.9. Sobreposición de estructuras y alineamientos estructurales	30
<b>6. Software y herramientas bioinformáticas</b>	31
a. 4000 Series Explorer™	31
b. Protein Pilot™	31
c. DNASTar	32
- EditSeq	32
- MegAlign	32
- Protean	32
d. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)	32
- BLAST NCBI	33
- BLAST EBI	33
e. Swiss-Model	33
f. UCSF Chimera	33
g. BIOPEP	33

<b>Capítulo II: Materiales y Métodos</b>	34
<b>1. Ubicación</b>	34
<b>2. Materiales</b>	34
2.1. Materiales Biológicos	34
2.2. Materiales de Laboratorio	34
2.3. Equipo, Aparatos e Instrumentos	35
2.4. Reactivos	35
2.5. Materiales Varios	36
2.6. Software y Herramientas Bioinformáticas	37
<b>3. Métodos</b>	38
3.1. Muestreo de <i>Engraulis ringens</i> (Anchoveta peruana).	38
3.2. Extracción de la masa muscular de <i>Engraulis ringens</i> .	39
3.3. Acondicionamiento de la masa muscular para la obtención de extractos proteicos del músculo de <i>Engraulis ringens</i>	39
3.4. Determinación de la distribución aparente del peso molecular por electroforesis unidimensional SDS-PAGE	40
3.5. Caracterización de péptidos por Espectrometría de Masa (MALDI ToF/ToF ABSciex 4800)	41
3.5.1. Escisión y digestión triptica de spots (bandas) de proteínas del músculo de <i>Engraulis ringens</i> (Anchoveta peruana).	42
3.5.2. Análisis de péptidos por espectrometría de masas MALDI ToF/ToF	42
<b>4. Análisis Bioinformático de las secuencias obtenidas del Músculo de <i>Engraulis ringens</i></b>	43
4.1. Homología y Alineamiento de las secuencias obtenidos de la proteína del Músculo de <i>Engraulis ringens</i> (Secuenciación <i>de novo</i> )	43
4.2. Construcción de cDNA en Sílico a partir de la proteína deducida del músculo de <i>Engraulis ringens</i> .	44
4.3. Análisis de la característica estructural de la proteína deducida del músculo de <i>Engraulis ringens</i> .	44

4.4. Predicción de la estructura Tridimensional y Simulación por Dinámica molecular de la proteína del músculo de <i>Engraulis ringens</i> .	44
4.5. Análisis de la proteína deducida del músculo de <i>Engraulis ringens</i> en el contenido de aminoácidos y búsqueda de péptidos encriptados con actividad biológica	45
<b>5. Flujograma de Procesos</b>	46
<b>Capítulo III : Resultados y Discusión</b>	47
<b>Capítulo IV : Conclusiones - Recomendaciones</b>	80
<b>Capítulo V : Referencias</b>	82
<b>Capítulo VI : Anexos</b>	92
Anexo 1 : Determinación de Proteínas Totales por Bradford	92
Anexo 2: Determinación de la Masa Molecular Aparente por Electroforesis 1D SDS-Page	95
Anexo 3: Métodos de Adquisición de un Espectrómetro de Masas MALDI ToF/ToF Absciex 4800 Plus, para una Proteína Expresa en el Músculo de <i>Engraulis ringens</i>	97
Anexo 4: Registro Grafico del Análisis Bioinformático en la Era Post-Genómica de una Proteína Expresa en Músculo de <i>Engraulis ringens</i> “Anchoveta peruana”. Una Perspectiva Nutricional.	99

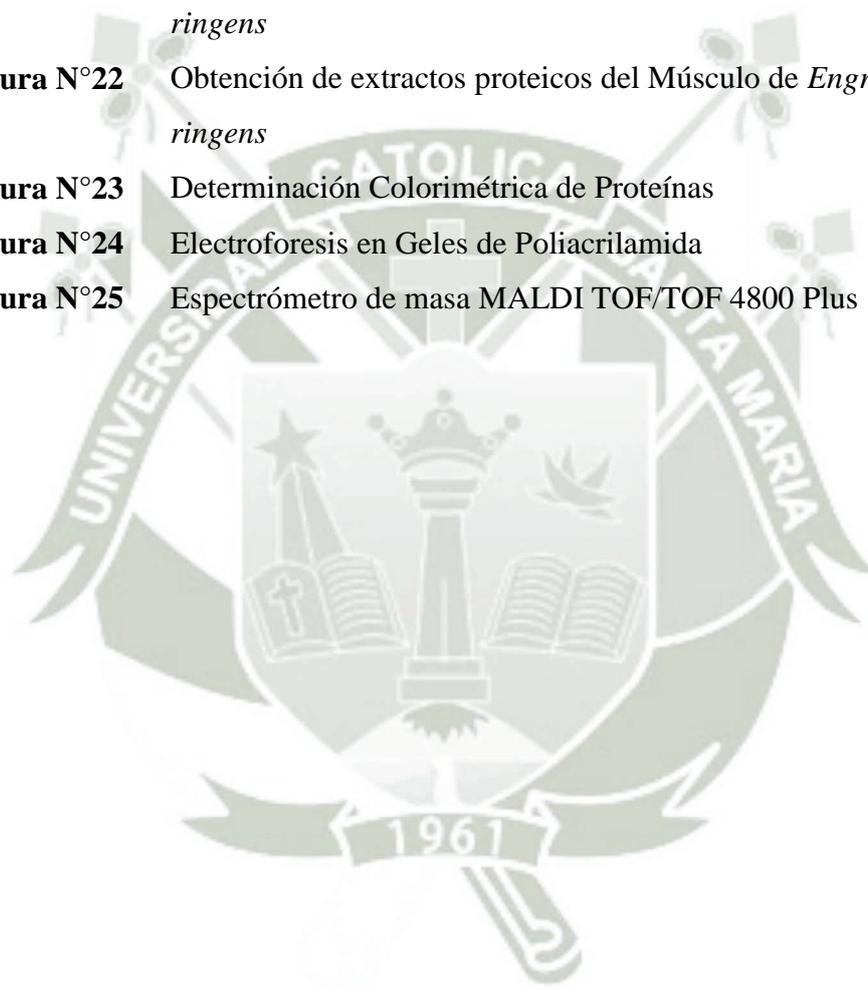
## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla N°1.</b> Composición proximal de <i>Engraulis ringens</i>	10
<b>Tabla N°2.</b> Contenido proximal de proteínas en pescados	10
<b>Tabla N°3.</b> Péptidos biológicamente activos y sus efectos en el organismo	14
<b>Tabla N°4</b> Homologías Secuenciales a la secuencia de cDNA construido de la proteína deducida	62
<b>Tabla N°5</b> Análisis de la composición de aminoácidos de las isoformas de miosina de cadena ligera 3	72
<b>Tabla N°6</b> Composición porcentual de aminoácidos en diferentes especies de pescado	74
<b>Tabla N°7</b> Péptidos encriptados con actividad biológica de la secuencia de la proteína deducida	75
<b>Tabla N°8</b> Diluciones de BSA para curva estándar	92
<b>Tabla N°9</b> Valores de ABS para curva estándar de BSA (1000 µg/ml)	93
<b>Tabla N°10</b> Concentración de proteína en el extracto líquido, presentando factor de dilución (fx) de 2	94
<b>Tabla N°11</b> Soluciones para preparación del gel de electroforesis SDS-PAGE	95
<b>Tabla N°12</b> Distribución de la masa molecular del marcador molecular	95
<b>Tabla N°13</b> Distribución de la masa molecular aparente de las proteínas expresas del Músculo de <i>Engraulis ringens</i>	96

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura N°1.</b> <i>Engraulis ringens</i> (Anchoveta Peruana)	7
<b>Figura N°2.</b> Distribución geográfica de <i>Engraulis ringens</i> longitud y latitud en el mundo (proyección cilíndrica)	8
<b>Figura N°3.</b> Estrategia para la identificación de proteínas mediante espectrometría de masas	22
<b>Figura N°4.</b> Zona de pesca, frente a la Bahía de Chimbote	38
<b>Figura N°5.</b> SDS-PAGE de Proteínas musculares de <i>Engraulis ringens</i>	50
<b>Figura N°6.</b> Espectro de masas MS reflectron de péptidos tripticos correspondientes a una proteína del músculo de <i>Engraulis ringens</i> (Anchoveta peruana).	52
<b>Figura N°7.</b> Espectro de masa de fragmentos obtenidos por decaimiento post fuente (MS/MS) de una masa parental de 1287.5955 m/z.	53
<b>Figura N°8.</b> Espectro de masa de fragmentos obtenidos por decaimiento post fuente (MS/MS) de una masa parental de 1518.7573 m/z.	54
<b>Figura N°9.</b> Espectro de masa de fragmentos obtenidos por decaimiento post fuente (MS/MS) de una masa parental de 1719.8876 m/z.	55
<b>Figura N°10</b> Alineamiento de aminoácidos de las secuencias obtenidas por BLAST con las secuencias obtenidas por espectrometría	59
<b>Figura N°11</b> Árbol filogenético de las homologías secuenciales a la secuencia de cDNA construido de la proteína deducida	63
<b>Figura N°12</b> Perfil hidropático de la secuencia de aminoácidos de las proteínas	64
<b>Figura N°13</b> Grupo de Miosinas que pertenecen al conjunto de proteínas intrínsecas en la contracción isométrica en el vuelo de insectos	66
<b>Figura N°14</b> Comparación estructural de la proteína deducida de <i>Engraulis ringens</i> y proteína homóloga de <i>Liza ramado</i> .	68
<b>Figura N°15</b> Sobreposición de estructuras de la proteína deducida de <i>Engraulis ringens</i> y proteína homóloga de <i>Liza ramado</i> .	68

<b>Figura N°16</b>	Alineamiento estructural de la Sobreposición de estructuras de la proteína deducida de <i>Engraulis ringens</i> y proteína homóloga de <i>Liza ramado</i>	69
<b>Figura N°17</b>	Curva estándar de BSA (1000 µg/ml)	93
<b>Figura N°18</b>	Curva estándar de marcadores moleculares	96
<b>Figura N°19</b>	Muestreo de <i>Engraulis ringens</i> (Anchoveta peruana)	99
<b>Figura N°20</b>	Extracción de Masa Muscular de <i>Engraulis ringens</i>	99
<b>Figura N°21</b>	Proceso de Pulverizado de la Masa Muscular de <i>Engraulis ringens</i>	100
<b>Figura N°22</b>	Obtención de extractos proteicos del Músculo de <i>Engraulis ringens</i>	100
<b>Figura N°23</b>	Determinación Colorimétrica de Proteínas	101
<b>Figura N°24</b>	Electroforesis en Geles de Poliacrilamida	101
<b>Figura N°25</b>	Espectrómetro de masa MALDI TOF/TOF 4800 Plus	101



**RESUMEN:**

Las proteínas del músculo esquelético de *Engraulis ringens* muestran un gran interés en estudios proteómicos y nutraceuticos, debido a que es una especie que posee un alto porcentaje de proteína, con gran valor nutricional por su composición química. Las proteínas obtenidas a partir del músculo esquelético, fueron parcialmente separadas por electroforesis SDS-PAGE, la corrida electroforética mostró una gama de proteínas que van de 9 KDa hasta 120 KDa, posteriormente se realizó una digestión trípica a una de las proteínas presentes, spot de peso molecular aproximado de 16.6 KDa, para determinar su secuencia por espectrometría de masas (MALDI ToF/ToF). Los péptidos secuenciados fueron tres; GTYDDYVEGLR, ILGNPSADDMANKR y VFDKEGNGTVMGAELR, que por medio del software ProteinPilot, se encontró que estas secuencias pertenecen a una miosina cadena ligera 3 de *Liza ramado* de 16.4 KDa, luego según homología por BLAST y por medio del software DNASTat, se dedujo por secuenciamiento *de novo*, la composición aminoacídica completa, para evaluar su filogenia nucleotídica, su perfil hidropático y su distribución estructural y funcional en tercera dimensión; en contraste con la secuencia homóloga con la herramienta Swiss-Model y el software UCSF Chimera, se encontró una diferencia en estructura  $\beta$ -plegada y función de contracción lenta, en la isoforma de la cadena ligera 3 de miosina. Por último, en el análisis del contenido de aminoácidos esenciales se encontraron en mayor proporción lisina y leucina, como también isoleucina, metionina, arginina y valina; en el análisis de los péptidos con actividad biológica encriptados, presentaron funciones antioxidantes, estimulantes, hipotensoras, ACE inhibitoras, opioides y reguladoras.

Estos resultados indicaron que, las proteínas del músculo de *Engraulis ringens* pueden ser utilizadas como una fuente importante de alimentación por el contenido de aminoácidos esenciales y la presencia de péptidos con actividad biológica encriptados, mostrando valiosa información con proyecciones de uso biotecnológico con grandes alcances para la industria nutracéutica.

**Palabras Clave:**

*Engraulis ringens*, Actividad biológica, SDS-PAGE, Espectrometría de Masas MALDI ToF/ToF , Nutracéutica.



**ABSTRACT:**

Skeletal muscle proteins of *Engraulis ringens* show great interest in proteomic studies and nutraceuticals, because it is a species that has a high percentage of protein with high nutritional value by chemical composition. The proteins obtained from skeletal muscle were partially separated by SDS-PAGE, the electrophoretic run exhibited a range of proteins ranging from 120 KDa to 9 KDa subsequently tryptic a digestion of the proteins was carried out spot approximate molecular weight of 16.6 kDa, to determine its sequence by mass spectrometry (MALDI TOF / TOF). Three peptides were sequenced; GTYDDYVEGLR, VFDKEGNGTVMGAELR ILGNPSADDMANKR and which through software ProteinPilot revealed that these sequences belong to a myosin light chain 3 *Liza ramado* 16.4 kDa, then by BLAST homology via software and DNASTat, was deduced by sequencing novo The complete amino acid composition to assess their nucleotide phylogeny, hydropathy profile and its structural and functional distribution in three dimensions; in contrast to the sequence homologous with the Swiss-Model tool and the UCSF Chimera software, a difference was found in  $\beta$ -pleated structure and function of slow twitch in the isoform of myosin light chain 3. Lastly, analyzing the content of essential amino acids they were found in higher proportion lysine and leucine, as isoleucine, methionine, arginine and valine; in the analysis of biologically active peptides encrypted presented antioxidants, stimulants functions, hypotensive, ACE inhibitors, and regulatory opioids.

These results indicated that the muscle proteins *Engraulis ringens* can be used as an important source of food for the content of essential amino acids and the presence of biologically active peptides encrypted, displaying valuable information biotechnological use projections for long ranges nutraceutical industry

**Keywords:** *Engraulis ringens*, Biological activity, SDS-PAGE, mass spectrometry MALDI ToF / ToF, nutraceutical.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad la harina de pescado es una de las fuentes de proteína animal más concentrada (60-72%) (34), la cual alcanza una producción mundial de aproximadamente 6 millones de toneladas métricas al año y de esta, la producción peruana de harina de *Engraulis ringens* (Anchoveta Peruana) corresponde alrededor de 25% de la producción mundial. (27)

La harina de pescado proviene de materia prima esencialmente de actividades pesqueras y a menor escala de actividades acuícolas. Los peces capturados o desechos, son rápida y sencillamente procesados. Las harinas están generalmente muy poco caracterizadas a nivel de sus constituyentes y vendidas como materia prima, en su mayoría, para la elaboración de alimentos balanceados para el sector acuícola. (71)

En la actualidad, el sector productivo peruano de harina de *Engraulis ringens* (Anchoveta Peruana) tiene baja rentabilidad y competitividad frente a otros países donde existen programas de desarrollo en investigación e innovación de biotecnologías para la caracterización nutri-proteómica de los peces y la valorización biotecnológica de sus harinas y constituyentes nutraceuticos. (15)

Por otra parte entendemos que la proteína es uno de los componentes más importantes en el alimento, ya que influye en las características funcionales y nutricionales al proveer de aminoácidos esenciales y ser fuente de nitrógeno y energía. El suministro adecuado de proteína en un alimento, radica tanto en el porcentaje que presente, como en su composición de aminoácidos, factor que determina directamente el potencial digestivo, en la preferencia de absorción de los péptidos y aminoácidos obtenidos. El efecto de que la proteína sea parcialmente o totalmente hidrolizada al consumirla da lugar a que esta se aproveche mejor, al brindar los nutrientes esenciales al organismo. Esto se debe a que la velocidad de absorción de la proteína a nivel intestinal está dada por la velocidad a la que las enzimas digestivas hidrolizan la fuente proteica para que ésta pueda ser absorbida. (25).

El estudio proteómico de proteínas del músculo esquelético de *Engraulis ringens*, resulta atractivo debido a su alto porcentaje de proteína presente, es por lo que muestra un gran interés de sus propiedades funcionales como biológicas que brindan un bienestar en la salud. Es sin embargo mal valorada en comparación con otras fuentes de proteínas animales en las que la composición está bien caracterizada, con varios procesos biotecnológicos de valoración que han conducido a los conceptos de nutriproteómica, los cuales deberían ser aplicados a *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana) y sus constituyentes. A esto se añade el atraso generalizado del país en biotecnología de proteínas, esto explicaría el poco desarrollo de investigaciones e innovaciones del sector pesquero peruano.

Los proyectos de secuenciamiento a gran escala están proporcionando una generosa cantidad de secuencias de DNA. Sin embargo, aún se desconoce la función biológica de la mayoría de las proteínas codificadas por los genes detectados. Así pues, el siguiente paso en la era post-genómica debe ser el estudio funcional de todos estos genes, a partir de sus transcritos (RNA), traducidos en proteínas (PROTEOMA). Se puede decir que hay dos factores decisivos para el desarrollo de la proteómica; el primero; el secuenciamiento de genomas a gran escala y el desarrollo de bases de datos de proteínas; y el segundo; el desarrollo de una nueva plataforma proteómica basada en la electroforesis y la espectrometría de masas para el análisis de proteínas y péptidos. En los años noventa la espectrometría de masas surge como un método analítico muy poderoso, ya que abarca la mayoría de los análisis de proteínas. Este desarrollo, junto con la disponibilidad de los genomas secuenciados marca el comienzo de una nueva era. Actualmente muchas áreas de estudio han sido agrupadas dentro de la proteómica. Se pueden incluir, entre otros, los estudios de interacciones de proteínas, de modificaciones pos-traduccionales, el análisis funcional de las proteínas y estudios de localización.

Actualmente la ciencia de los alimentos ha ido promoviendo un nuevo concepto de nutrición alimentaria que incluye a aquellos alimentos que presentan una potencialidad en el mejoramiento de la salud y disminuyen los riesgos de enfermedades en el cuerpo humano. Por esto muchas industrias alimentarias, han

incluido en sus productos ciertos nutrientes y componentes bioactivos extraídos de fuentes animales y vegetales, capaces de ofrecer beneficios en la salud de los consumidores. Por lo tanto, el interés de la industria de los alimentos en encontrar materias primas naturales que presenten altos contenidos en proteínas de las cuales se pueden producir ciertos péptidos con actividad biológica con efectos benéficos en el organismo. (86)

La presente investigación tiene como objetivo central, la caracterización Bioinformática de una proteína expresada en el músculo de *Engraulis ringens*, donde la composición de aminoácidos esenciales y la búsqueda de péptidos encriptados con actividad biológica, brindan un gran alcance en la información para las propiedades nutraceuticas de dicha proteína. Esta investigación tuvo como alcance etapas desde la captura de individuos como materia prima, el acondicionamiento de la muestra, hasta la caracterización de una proteína obtenida a partir de la masa muscular de *Engraulis ringens* (Anchoveta Peruana) en cuanto a tamaño y perfil de Aminoácidos y su estudio Bioinformático de la proteína expresada.

Así mismo, las pruebas realizadas en el laboratorio, formaron parte de un entregable del proyecto: Establecimiento de un método biotecnológico de producción de fuente proteica sustituta para estadio de post-larva de langostino, mediante proteómica e hidrólisis enzimática; convenio N°157-FINCYT-FIDECOM-PIPEI-2012, Donde se trata de generar el conocimiento necesario para el desarrollo y escalamiento industrial de hidrolizados en conjunto con la empresa COPEINCA S.A.C., el proyecto fue cofinanciado con los fondos no reembolsables del FIDECOM (Fondo de Investigación y Desarrollo para la Competitividad) en la modalidad PIPEI (Proyectos de Innovación Productiva de Empresas Individuales).

**Objetivos:****1. Objetivo General:**

- Realizar un análisis Bioinformático de una proteína expresa en el músculo de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana), como perspectiva nutricional.

**2. Objetivos Específicos:**

- Separar e identificar una las proteínas presentes por electroforesis SDS-PAGE y obtener la secuencia de dicha proteína del músculo de *Engraulis ringens* por espectrometría de masas MALDI ToF/ToF y secuenciamiento *de novo*.
- Analizar y caracterizar la secuencia obtenida del músculo de *Engraulis ringens* a nivel bioinformático relacionada a su composición de aminoácidos y a la actividad biológica encriptada en su secuencia deducida, a través de bases de datos dispuestas en la red y su análisis respectivo utilizando el software DNA Star y UCSF Chimera.

**Hipótesis:**

Siendo *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana) una especie con altas propiedades nutritivas, como su alto contenido proteico, es probable que mediante el estudio bioinformático de una proteína a nivel secuencial, obtenida a partir del músculo, pueda dar un realce a su valor nutricional en razón de la presencia de aminoácidos esenciales y péptidos encriptados con propiedades biológicas.

## CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO

### 1. *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana)

*Engraulis ringens* (Anchoveta peruana), es ecológica y económicamente una de las especies de peces pelágicos más importantes en el ecosistema de la Corriente de Humboldt debido a los grandes volúmenes de captura anual en el ámbito mundial. *Engraulis ringens* es la presa de los principales depredadores superiores, incluidos los mamíferos marinos, aves marinas, peces y pescadores, donde más de 250 millones de toneladas de anchoveta han sido recolectadas por la pesquería de cerco desde 1950. Siendo *Engraulis ringens* un elemento clave de la cadena alimentaria marina en la Corriente de Humboldt, ha sido objeto de numerosos estudios (26) también cabe resaltar que es una de las especies más abundante en el litoral peruano.

#### 1.1. Taxonomía:

Su clasificación Taxonómica y nomenclatura científica es (37):

**Reino:** *Animalia* - Animal

**Sub Reino:** *Bilateria*

**Infra Reino:** *Deuterostomia*

**Filo:** *Chordata* - Cordes, cordado

**Sub Filo:** *Vertebrata* - vertebrado

**Infra Filo:** *Gnathostomata*

**Superclase:** *Osteichthyes* - peces óseos

**Clase:** *Actinopterygii* - peces con aletas radiadas

**Subclase:** *neopterygians Neopterygii*

**Infraclase:** *Teleostei*

**Superorden:** *Clupeomorpha*

**Orden:** *Clupeiformes anchois*, arengues

**Suborden:** *Clupeoidei*

**Familia:** *Engraulidae anchois*, boquerones

**Subfamilia:** *Engraulinae*

**Género:** *Engraulis* Cuvier, 1816

**Especie:** *Engraulis ringens* Jenyns, 1842 (Anchoveta peruana)

## 1.2. Sinonimia:

La Anchoveta Peruana presenta una nominación científica como *Engraulis ringens* Jenyns, 1842 (35, 89), también recibe dos nominaciones en inglés como peruvian Anchovy y peruvian Anchoveta. La Anchoveta peruana en la EOL (24), usa la nomenclatura de *Engraulis ringens*, Jenyns, 1842, seguido de:

- *Anchoviella tapirulus*; Cope, 1877.
- *Engraulis pulchellus* Girard, 1855.
- *Engraulis tapirulus*; Cope, 1877.
- *Stolephorus tapirulus*; Cope, 1877.

Whitehead J.P.,(89) da a conocer las siguientes nominaciones:

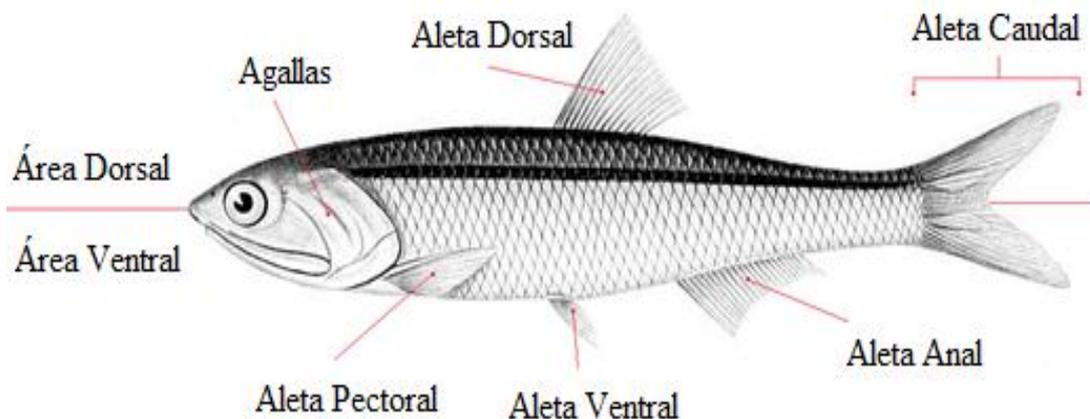
- a. *Engraulis pulchellus*, Girard, 1856 (Bahía Caldera, Chile).
- b. *Engraulis tapirulus*, Cope, 1877 (Bahía Pacasmayo, Perú - identificación dado por Böhlke, 1984).
- c. *Stolephorus tapirulus*; Abbott, 1899.
- d. *Anchoviella tapirulus*; Fowler, 1941.
- e. *Engraulis ringens*; Delfin, 1901; Jordania y Seale, 1926 (Callao, Perú; en Panamá es la *Anchoa arenicola*).
- f. Su nombre FAO Anchoveta Peruana (*peruvian Anchoveta*)

## 1.3. Características Anatómicas:

*Engraulis ringens* vive entre los 3 a 4 años de edad y en su etapa adulta, alcanza una longitud que oscila entre los 12 y 16 cm. pero puede llegar a los 20 cm. Su color varía de azul oscuro a verdoso en la parte dorsal y plateado en el vientre. (26)

Tiene el cuerpo delgado, alargado, redondo en sección transversal, presenta un hocico puntiagudo; maxilar corto y punta redondeada; la punta de la mandíbula inferior en frente de las fosas nasales; branqui-espinas menores de 38 a 49 mm. El origen de la aleta anal muy por detrás de la base del último rayo de la aleta dorsal. Una raya de plata a lo largo del flanco en individuos jóvenes, que desaparece con la edad. (29, 89)

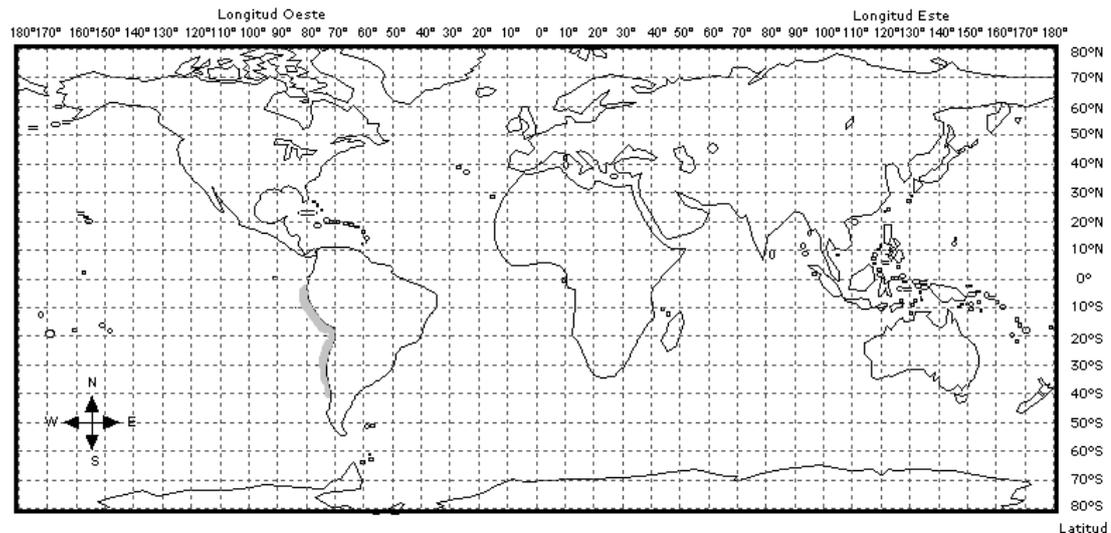
Es una especie de crecimiento rápido y vida corta, su crecimiento mensual promedio es de 1.1 cm. durante los primeros seis meses variando de acuerdo a las condiciones ambientales de cada año, su ingreso a la pesca es entre 7 – 8.5 cm. de longitud total (pre-reclutas de 6 meses de edad) principalmente entre diciembre y abril, y son los grupos de 1 año (12 – 13 cm.) y 2 años (15 - 16 cm.) los que sustentan la pesca. (29)



**Figura N°1:** *Engraulis ringens* (Anchoveta Peruana) (20)

#### 1.4. Distribución Geográfica:

Vive en aguas moderadamente frías, con rangos que oscilan entre 16° y 23°C en verano y de 14° a 18°C en invierno. (26). La anchoveta tiene hábitos altamente gregarios formando enormes y extensos cardúmenes que en periodos de alta disponibilidad, facilita que sus capturas sean de gran magnitud. (29). La distribución geográfica es en el Pacífico Sur-Oriental (desde el norte de Perú hacia el sur, hasta Chile, en su mayoría en toda la extensión de la costa del Perú).



**Figura N°2:** Distribución Geográfica de *Engraulis ringens*

Longitud y Latitud en el Mundo (Proyección Cilíndrica) (18, 89)

Según el hábitat y la biología, nos dice que es un individuo marino, costero, principalmente ubicado a 80 Km. de la costa, pero a veces a 160 Km., la formación de los cardúmenes, en aguas superficiales (desciende durante el día a un máximo de 50 m. subiendo por la noche). Depende totalmente del abundante plancton de la corriente peruana, su distribución es limitada por temporadas en el norte debido al fenómeno de “El Niño” (corriente de aguas superficiales más cálidas y menos salinas que se va extendiendo hacia el sur sobre el norte de la costa del Perú). Este fenómeno hace que la distribución migre hacia el sur en busca de aguas más frías y más salinas. Pero en algunos casos los cardúmenes migran hacia aguas más profundas. (9, 29)

### 1.5. Alimentación:

Los primeros estudios trofodinámicos sobre *Engraulis ringens* en el Perú llegaron a la conclusión de que este individuo subsista principalmente de fitoplancton. Anteriormente se pensaba que se alimentaba mayoritariamente de fitoplancton, zooplancton y larvas. Sin embargo, *Engraulis ringens* obtiene la mayor parte de su energía de zooplancton y macrozooplancton. (50, 26)

*Engraulis ringens* es planctófaga por excelencia, es decir que se alimenta exclusivamente de plancton (fitoplancton y zooplancton). Durante eventos, como el fenómeno de “El Niño”, se alimenta en gran parte de copépodos y eufáusidos; disminuyendo el consumo de fitoplancton en su dieta. (29)

Se alimenta de plancton por filtración, con un máximo de 98% de diatomeas las que se registraron en algunos estudios (principalmente *Coscinodiscus*, *Schroderella*, *Skeletonema* y *Thalassothrix*) (89). La dieta de *Engraulis ringens* depende mucho del sistema de afloramiento que mantiene un suministro continuo de nutrientes hacia las aguas superficiales donde ocurre la fotosíntesis. La corriente de Humboldt enfría las aguas, incrementa su salinidad (favorece la flotación del fitoplancton) y su contenido de oxígeno, favoreciendo la fotosíntesis. Estos factores hace que nuestro mar sea rico en *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana).

#### **1.6. Composición química:**

*Engraulis ringens* (Anchoveta peruana), posee una gran cantidad de proteínas de alta calidad alimenticia, como actina, miosina, tropomiosina y troponina (proteínas estructurales, que constituyen el 65-75% del contenido total de proteínas), que presentan una gran cantidad de aminoácidos esenciales (arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, valina) (87); también tiene alto contenido energético por la cantidad de calorías presentes y su alto contenido de ácidos grasos esenciales, como el Omega 3 y Omega 6, por lo que debería ser una fuente principal en nuestras dietas. Pero es mejor hablar de sus virtudes en comparación con los demás recursos alimenticios que encontramos en nuestras mesas día a día. *Engraulis ringens* es una excelente fuente de proteína animal de alta calidad (actina y miosina). Su alto contenido de aminoácidos esenciales hace que sea especial y adecuada para el complemento de dietas ricas en carbohidratos. Es un recurso muy rico en micronutrientes que no son usualmente encontrados en alimentos básicos. En la tabla N°1 se muestra la composición proximal de *Engraulis ringens*. y en la tabla N°2 el contenido proximal de proteínas en diferentes pescados

**Tabla N°1:** Composición proximal de *Engraulis ringens* (19,20)

**100g. de filete crudo de anchoveta contienen aproximadamente**

Grasa	4.9 g.
Humedad	70.8 g.
Proteínas	21.9 g.
Sales minerales	1.2 g
Calcio	77.1 mg
Potasio	241.4 mg%
Sodio	78.0 mg
Magnesio	31.3 mg
Calorías	185.0 Kcal
Omega 3 y 6	3.3 g

**Tabla N°2:** Contenido proximal de proteínas en Pescados (11, 19)

Pescados	Proteínas g/100 g
Albacora	18.9
Anchoveta	21.9
Bacalao de profundidad	13.1
Cojinoba	17.2
Congrio dorado	16.5
Corvina	20.5
Jurel	21.9
Lenguado	18.9
Merluza	17.3
Mero	12.2
Pejegallo	21.3
Pejerrey	16.4
Reineta	19.3
Sardina española	17.1
Trucha de cultivo	19.6

Sabemos que el Omega 3, combate el colesterol malo y previene los males cardiovasculares. Las vitaminas A y D, permiten el bienestar mental. El potasio, hierro, fósforo y calcio intervienen en el desarrollo físico. Las Proteínas son el alimento de los músculos, porque hacen que se regeneren más rápido y fortalece los tendones y ligamentos aparte de que impiden que se formen coágulos sanguíneos y por lo tanto se reduzcan los problemas cardíacos. (35, 53)

### **1.7. Importancia Económica y Social:**

La industria pesquera constituye un área importante de producción, contribuyendo sostenidamente a la economía peruana. Pues se capturan cada año millones de toneladas de *Engraulis ringens*, mayormente con bolicheras industriales donde luego bombean la captura desde la bodega a las fábricas de harina y aceite. Los centros importantes de pesca y transformación son Chimbote, Paita, Salaverry, Callao, Ilo, Chancay y Huacho. El fenómeno de El Niño tiene una influencia negativa en el recurso. IMARPE (35) establece los períodos y las zonas de pesca de la anchoveta.

Los beneficios que rinde se manifiestan de diversas maneras: (29)

- a) Crecimiento del Producto Bruto Interno, en los últimos años la pesquería se ubicó en segundo lugar en cuanto a su contribución al Producto Bruto Interno.
- b) Contribución al comercio, el sector pesquero viene alcanzando niveles altos en el rubro de exportaciones, los cuales generan un elevado ingreso de divisas.
- c) Contribución a la generación de empleos, la industria pesquera genera muchas fuentes de empleo, especialmente en la región costera del país.
- d) Contribución a la oferta alimentaria, en el caso de *Engraulis ringens* se viene incentivando su consumo humano directo, a través de salados y conservas tipo anchoas.

En el mercado nacional el costo promedio de la anchoveta es de 2.00 Nuevos Soles(S/.) por cada Kilogramo. Estos precios tan bajos son porque el 96% de especies marinas que se capturan al año son de anchoveta. Por esta razón y por su

gran contenido nutricional se recomienda que su consumo sea diario, y poder lograr una alternativa para combatir la desnutrición infantil. (20)

## 2. Proteínas en Peces:

Las proteínas son el principal componente estructural de las células y tejidos, siendo necesarias para el crecimiento y el desarrollo corporal, para el mantenimiento y reparación de tejidos, por su acción catalítica y como constituyentes esenciales de ciertas hormonas. (74) Las especies marinas comprenden aproximadamente un 50% de la biodiversidad mundial, el mar representa un enorme recurso para nuevos compuestos. (22)

El contenido de proteína en carne de pescado crudo puede variar del 17 al 22% (w/w) (55), de las cuales hay proteínas miofibrilares, sarcoplásmicas y estroma, que son los tres grupos principales de proteínas musculares en el pescado.

1. Las proteínas miofibrilares (proteínas estructurales) representan el 65-75% (w/w) del total de proteínas en los músculos de peces y mariscos (85) Estas proteínas solubles en alto contenido de sal consisten fundamentalmente de la miosina, actina, tropomiosina, m-proteína, alfa-actinina, beta-actinina, c-proteína y la troponina T, I y C, de los cuales la miosina y actina son los que se encuentran con mayor abundancia. (84)
2. Las proteínas sarcoplásmicas (solubles en agua) constituyen aproximadamente el 15-35% (w/w) de la proteína muscular total. En general, esta fracción de proteína se compone principalmente de la mioglobina, hemoglobina, proteínas de citocromo y una amplia variedad de enzimas endógenas. Sin embargo, el nivel de cada proteína puede variar significativamente entre las especies. (8)
3. Proteínas del estroma o del tejido conectivo se componen fundamentalmente de colágeno y elastina (85), en general, las proteínas musculares contienen aproximadamente 3% (w/w) de las proteínas del estroma, sin embargo en algunos peces, como el tiburón y la raya, estas pueden representar el 10% (w/w) de la

proteína muscular total. El colágeno es la proteína más abundante en peces (41), presente en los huesos, piel, tendones, cartílago y músculo.

El tejido muscular se compone de muchas proteínas diferentes con funciones especializadas, pero la contracción del músculo da como resultado principalmente la interacción de dos proteínas predominantes; actina y miosina. Las fibras musculares de actina y miosina forman la maquinaria bioquímica causante de la contracción muscular; estas dos proteínas forman la estructura y función del músculo que es común en todos los animales. (67)

El papel de la proteína en la dieta humana se ha reconocido recientemente en todo el mundo. Las proteínas en toda dieta se han convertido en una fuente de componentes fisiológicamente activos, que tienen un impacto positivo en la función del cuerpo después de la digestión gastrointestinal. Los aminoácidos esenciales y péptidos con actividad biológica se pueden producir por tres métodos:

- a. Extracción con disolvente.
- b. La hidrólisis enzimática.
- c. Fermentación microbiana de proteínas de los alimentos.

Los péptidos bioactivos de los alimentos marinos, son a menudo eficaces en la promoción de la salud y conducen a una reducción en el riesgo de contraer ciertas enfermedades. (75)

### **2.1. Péptidos con actividad biológica:**

Los péptidos con actividad biológica, peptidos bioactivos o biopeptidos; son secuencias de aminoácidos (fragmentos específicos de proteína) de peso molecular menor a 6 KDa, con tamaño de 2 a 20 aminoácidos, aparentemente inactivas dentro la proteína intacta, también se pueden activar al ser liberados durante la digestión del alimento en el organismo, o por un proceso previo del mismo (hidrólisis enzimática, fermentación, uso de solventes). (86)

Las proteínas presentes en la dieta son tradicionalmente conocidas como fuentes de energía y aminoácidos esenciales para el crecimiento y mantenimiento de diversas funciones corporales. Además, contribuyen a las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de los alimentos ricos en proteína. En los últimos años, las proteínas de los alimentos han adquirido un valor agregado, debido a la actividad de los péptidos que presentan actividad biológica (86).

Los péptidos bioactivos cumplen una función biológica en el organismo que lo consume. Las funciones de los péptidos con actividad biológica (38), permiten su utilización como ingredientes en la elaboración de alimentos funcionales y con ello obtener un efecto beneficioso para alguna función corporal del individuo, mejorando su salud o reduciendo el riesgo de padecer ciertas enfermedades.

**Tabla N°3:** Péptidos biológicamente activos y sus efectos en el organismo (38)

<b>Péptidos</b>	<b>Efecto en el organismo</b>
Inmunomoduladores	Estimulan la respuesta inmune
Inhibidores de la enzima Convertidor de Angiotensina-I	Reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares
Antioxidantes	Previenen enfermedades degenerativas y envejecimiento
Reguladores del tránsito intestinal	Mejoran la digestión y absorción
Reguladores de la proliferación intestinal	Reducen la proliferación de Tumores cancerígenos
Antimicrobianos	Reducen el riesgo de infecciones
Hipocolesterolémicos	Reducen el Riesgo de padecer enfermedades
Anticoagulantes	Reducen los riesgos de padecer trombos

Como se ha comentado anteriormente, los péptidos con actividad biológica no son más que una pequeña secuencia de aminoácidos encriptados en proteínas, pero de alta importancia por a su actividad; sin embargo, su biodisponibilidad al consumir proteínas alimentarias no está tan clara, ya que para ser liberados sufren la acción de

las proteasas gástricas e intestinales y han de poder atravesar el epitelio intestinal y llegar a los tejidos periféricos a través de la circulación sanguínea para poder ejercer su acción.

Entonces la importancia de los organismos marinos como fuente de nuevas sustancias bioactivas está creciendo rápidamente en los últimos años debido a su contenido proteico y disponibilidad, por ello se están desarrollando técnicas para obtener estos péptidos bioactivos a nivel de laboratorio e industria a partir de proteínas alimentarias mediante digestión enzimática y darle el valor agregado para que estos péptidos al ser liberados sean asimilados en forma directa. (17)

### **2.1.1. Propiedades beneficiosas de los péptidos con actividad biológica:**

Desde 1980 la producción de hidrolizado de proteína se utilizan con frecuencia como fuente de sustancias proteicas en diferentes tipos de muestras dietéticas, nutricionales y medicinales (38). Los péptidos mejoran el valor nutricional de los alimentos ya que se pueden aplicar en:

- El enriquecimiento de alimentos, especialmente bebidas.
- Dietas compuestas para las personas mayores con la deficiencia de la secreción de jugos gástricos.
- Dietas para deportistas, como fuente de nitrógeno disponible en péptidos y aminoácidos.
- Dietas para los pacientes con problemas metabólicos y enfermedades del sistema digestivo.
- Preparativos necesarios en la alimentación parenteral y enteral, para pacientes.
- Fórmulas de alimentos para niños y bebés.

Los dipéptidos y tripéptidos pueden ser absorbidos en el tracto digestivo, de manera rápida y eficientemente que los aminoácidos libres debido a su corto tamaño, los péptidos cortos se usan también como los aditivos a algunos de los productos alimenticios que son pobres en aminoácidos. (38)

### 3. Tecnología de la proteómica:

El desarrollo de la proteómica se debe en parte a los avances importantes realizados en la tecnología de proteínas, esta metodología disponible tiene sus limitaciones y actualmente todavía no es posible realizar muchos tipos de proteómica. Por lo que es necesario mejorar algunas de estas limitaciones y desarrollar nuevas tecnologías. (2)

#### 3.1. Separación de proteínas

La tecnología más usada para la separación de proteínas es la electroforesis en geles de poliacrilamida, esta técnica es la más eficaz para resolver mezclas complejas de proteínas.

Para muchas aplicaciones proteómicas, la electroforesis en una dimensión, es el método de elección. Las proteínas se separan de acuerdo a su masa. Es una técnica sencilla, reproducible y permite la separación de proteínas de 10 a 300 KDa. La electroforesis es la migración de solutos iónicos, bajo la influencia de un campo eléctrico, estas partículas migran hacia el electrodo positivo, en dependencia de una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional.

Es de destacar que a escala analítica, los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad, y sirven como método de separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas, donde aportan un potente criterio de pureza. Se pueden conocer también mediante estas técnicas, las características ácido-básicas de las proteínas presentes en un extracto crudo, lo que da la información necesaria si se pretende realizar una separación cromatográfica basada en diferencias de carga. Es útil además para determinar otros parámetros como peso molecular, punto isoeléctrico y número de cadenas polipeptídicas de las proteínas. (64)

La tecnología más usada para la separación de proteínas es la electroforesis en geles de poliacrilamida, esta técnica es la más eficaz para resolver mezclas complejas de

proteínas por tamaño y carga. SDS (Dodecil Sulfato de Sodio) es un detergente que desnaturaliza las estructuras terciarias y secundarias, con una carga negativa que se correlaciona con su longitud, permitiendo estimar pesos moleculares. (88)

El sistema SDS-PAGE de Laemmli es un gel discontinuo con un gel de apilamiento superior (stacking gel) y gel de resolución inferior (running gel) que tienen diferentes concentraciones de poliacrilamida. El gel de apilamiento superior tiene un menor porcentaje de poliacrilamida permitiendo que las proteínas se muevan a través de forma rápida y se apilen en una banda estrecha antes de entrar en un alto porcentaje de poliacrilamida que es el gel de resolución para la separación. Las proteínas pequeñas se moverán a través del gel de resolución más rápidamente que las proteínas grandes. (47)

### **3.2. Identificación y caracterización de proteínas**

En los proyectos proteómicos la identificación de proteínas es esencial. Es el primer paso para otros estudios que suponen en última instancia la caracterización funcional. Además, en el caso de los geles dimensionales, la identificación de las bandas conduce a la creación de mapas de referencia, que definen las proteínas expresadas por unos organismos o tejido en una condición determinada. Las proteínas pueden ser identificadas por diversos procedimientos, entre los que se incluyen la secuenciación del extremo N-terminal, detección con anticuerpos específicos, composición de aminoácidos, co-migración con proteínas conocidas, sobre-expresión y delección de genes. Todos estos métodos generalmente son lentos, laboriosos, o caros, y por tanto no resultan apropiados para su utilización como estrategias a gran escala. (78)

Es por este motivo que; debido a su rapidez y elevada sensibilidad, la espectrometría de masas se ha convertido en el método de detección para la identificación de proteínas a gran escala. El análisis de las proteínas mediante espectrometría de masas ha sido posible gracias al desarrollo de varios métodos de ionización suave para convertir biomoléculas grandes, polares y no volátiles en iones en fase gaseosa.

Los espectrómetros de masa están formados al menos por una fuente de iones, un analizador de masas y un detector que mide la relación masa/carga ( $m/z$ ) de los iones en fase gaseosa. Esta técnica tan robusta implica:

1. La conversión de los péptidos en iones en fase gaseosa mediante técnicas de ionización suave, como ionización/desorción asistida con láser en matriz (MALDI) a partir de una muestra en estado sólido, o la ionización mediante electro-spray (ESI) de una muestra en solución.
2. Separación de los iones según su  $m/z$  en un analizador de masas (por ejemplo un analizador tipo ToF (*Time of Flight*), cuadrupolo, trampa iónica, etc.)
3. Fragmentación opcional de los iones peptídicos.
4. Medida de las masas en un detector obteniendo un espectro de masas que refleja la abundancia de los iones frente a su valor  $m/z$ .

Recientemente se han desarrollado fuentes que se acoplan a un analizador QToF o a dos analizadores ToF en tándem (MALDI-ToF/ToF). Para la identificación de proteínas se han desarrollado diversas estrategias:

- Identificación mediante huella peptídica (PMF: peptide mass finger printing) o mapeo peptídico utilizando un espectrómetro tipo MALDI-TOF.
- Identificación mediante fragmentación de péptidos obteniendo la secuencia total o parcial de los aminoácidos (etiqueta de secuencia) utilizando un espectrómetro de masas en tándem.

### 3.3. Fragmentación de proteínas.

Las estrategias más utilizadas en la identificación de proteínas por espectrometría de masas (MS) requieren que la muestra sea fragmentada, ya sea por métodos químicos o enzimáticos, en sus constituyentes peptídicos. (78)

En general las proteínas que poseen enlaces disulfuro en su estructura no se digieren, y aquellas que son digeridas producen mezclas de péptidos muy complejas. Por esta

razón resulta necesario reducir y alquilar los residuos de cisteína en las proteínas que han sido resueltas por electroforesis antes de llevar a cabo la digestión. Este proceso comprende 2 pasos: primero se reduce el enlace disulfuro y posteriormente se alquilan los grupos tiol de los residuos de cisteína. De esta manera la proteína se encuentra desplegada de forma tal que mejora el rendimiento durante el proceso de digestión. (78)

#### **4. Espectrometría de Masas:**

Mediante espectrometría de masas es posible obtener información estructural de las proteínas tal como la secuencia de aminoácidos y la masa de los péptidos. Esta información puede utilizarse para identificar proteínas comparando los resultados con diferentes bases de datos. La espectrometría de masas también resulta útil para identificar y localizar modificaciones post-traduccionales en las proteínas. (88) La recolección de información por medio de MS se divide en las siguientes etapas:

##### **4.1. Preparación de la Muestra.**

Como se mencionó previamente, la proteína a estudiar, proviene de una mezcla proteica; la que se separa empleando generalmente técnicas electroforéticas. Se sabe que la conversión de la proteína en sus constituyentes peptídicos proporciona una mayor información que la obtenida con la proteína completa, por lo que es necesario llevar a cabo una fragmentación de la misma (la técnica más utilizada es la hidrólisis). Una vez obtenidos los constituyentes peptídicos, estos pueden ser purificados por diferentes técnicas (RP-HPLC, utilizando ZipTips o material de perfusión de poros).

##### **4.2. Ionización de la Muestra.**

Para el análisis de muestras biológicas por MS es necesario que las moléculas estén cargadas eléctricamente y secas. Este requisito se cumple convirtiendo las moléculas en iones desolvatados. Han sido varias las técnicas que se han desarrollado con este

fin, las primeras de ellas se basaron en el impacto de electrones y en la ionización química. Estas técnicas resultaron efectivas para ionizar moléculas pequeñas pero no para la ionización de moléculas de alto peso molecular, como las biomoléculas.

La espectrometría de masas se revolucionó en 1981 gracias a la introducción del bombardeo rápido de átomos (FAB, fastatombombardment) por Barber. Esta técnica permitió la ionización y detección de biomoléculas con buena sensibilidad. Hoy en día, los métodos más empleados para generar iones desolvatados son el MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization) y el ESI (electrosprayionization) estos, han reemplazado por completo al FAB. Tanto el MALDI como el ESI son métodos de ionización suaves donde se mantiene la integridad de la muestra. (88)

#### **4.2.1. MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)**

En este método la muestra se incorpora en una matriz de moléculas y posteriormente es sometida a radiación con un láser. El láser promueve la formación de iones moleculares. La matriz, capaz de absorber luz de la longitud de onda emitida por el láser, está constituida por una molécula pequeña tal como el ácido 2,5-dihidroxibenzóico, el ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico o el ácido sinapínico. Tanto la muestra como la matriz se colocan en una placa de metal y se dejan evaporar, propiciando la formación de cristales. La placa de metal se coloca en el espectrómetro y el láser es dirigido automáticamente a sitios específicos de la placa. La luz emitida por el láser, generalmente con una longitud de onda de 337 nm. causa la desorción y la ionización de la muestra tanto por protonación como por desprotonación, generando iones predominantemente monovalentes. Los iones producidos son posteriormente acelerados hasta el analizador. El proceso puede estar automatizado desde la aplicación de la muestra hasta la recolección y el análisis de los datos, lo que constituye la principal ventaja del MALDI. Adicionalmente, no siempre es necesaria que las muestras a analizar sean sometidas a procesos de purificación después de la digestión en gel, lo que constituye otra ventaja de este método sobre el ESI. (88)

### 4.3. Análisis de Masa.

Después de la conversión de proteínas o péptidos en iones moleculares, estos son acelerados desde la fuente de iones hacia el analizador de masa. En el analizador de masa los iones son separados de acuerdo a su relación carga-masa ( $m/z$ ) en el vacío.

#### 4.3.1. Analizador de Tiempo de Vuelo (ToF).

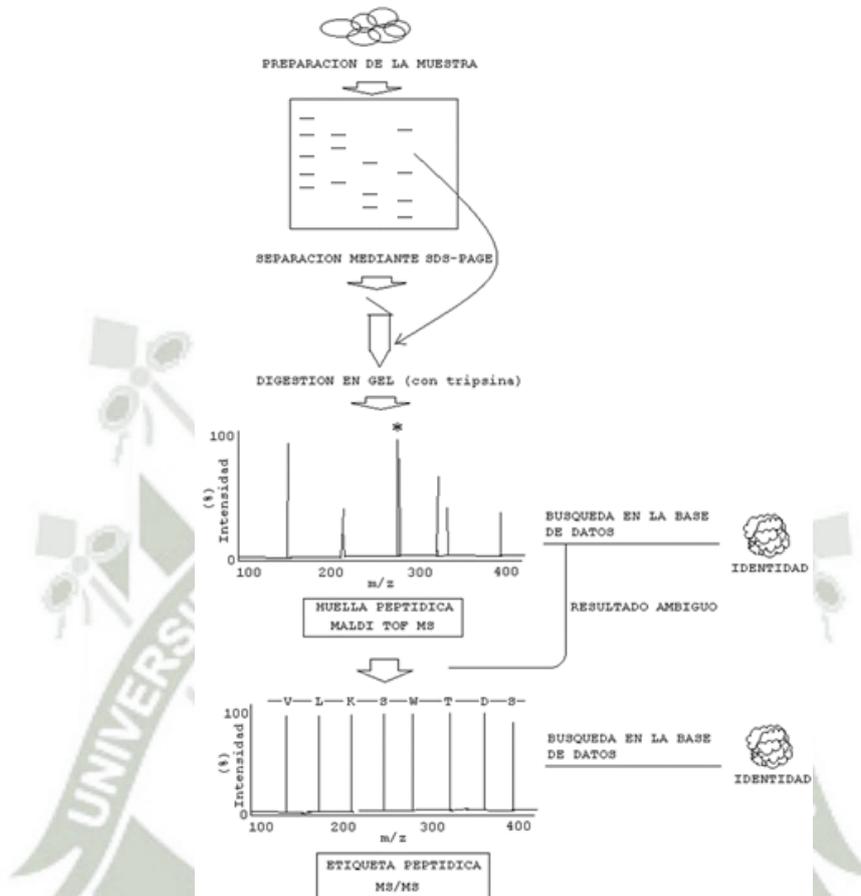
Éste es uno de los analizadores más simples. Mide la relación  $m/z$  de un ión determinando. El ión es impulsado con una velocidad inicial, la cual depende directamente de su masa. El tiempo de vuelo requerido para recorrer la longitud de un tubo desde que el ión abandona la fuente de iones, es proporcional a la raíz cuadrada de su relación  $m/z$  dada una aceleración constante provocada por el voltaje.

$$\text{Tiempo de Vuelo} = K \sqrt{\frac{m}{z}}$$

Algunos analizadores de masa ToF incluyen un espejo de iones o reflectrón al final del tubo de vuelo, el cual repele los iones a través de este tubo y los dirige al detector. De esta forma, se ve incrementada la longitud del tubo de vuelo con lo que mejora la resolución. El reflectrón sirve también para corregir las pequeñas diferencias en la energía cinética que existe entre iones de la misma masa. Estas diferencias se deben a la posición que guarda cada ión en la fuente de iones, al momento de que son acelerados al aplicar una diferencia de potencial. Las diferencias en la energía cinética de los iones se reducen debido a que los iones con energía cinética mayor viajan más lejos en el reflectrón que los iones con energía cinética menor. Esto, ocasiona que los iones con la misma masa se enfoquen mejor en el detector, mejorando considerablemente la resolución y la precisión del cálculo de masas. (88)

Debido a su rapidez y elevada sensibilidad, la espectrometría de masas se ha convertido en el método de detección para la identificación de proteínas a gran escala, siendo primer paso para el estudio de proteoma de distintos organismos. La

estrategia general empleada para la identificación a gran escala de proteínas mediante espectrometría de masas, se muestra en la figura N° 3.



**Figura N°3:** Estrategia para la identificación de proteínas mediante espectrometría de masas (63).

## 5. Análisis bioinformático en la era post-genómica.

Los datos generados en un espectrómetro de masas, son visualizados en forma de picos; a la representación gráfica de los datos se le denomina espectro de masas. Cada uno de los picos de un espectro de masas, representa valores de  $m/z$  y la intensidad de cada señal.

Definir la identidad o secuencia de una proteína a partir de su espectro de masa, es un procedimiento común en estudios de proteómica. Utilizando la información contenida en las bases de datos, es posible identificar rápidamente un gran número de proteínas con gran precisión.

La identificación exitosa de proteínas, depende de la calidad de los datos generados en el espectrómetro de masas, de los datos contenidos en la base de datos y del método empleado en la búsqueda de datos. En general, existen diversas estrategias para el manejo de datos obtenidos por MS. (32)

### **5.1. Huella de masa peptídica.**

La huella de masa peptídica (Peptide Mass Finger Printing, PMF). Esta técnica comprende los siguientes pasos: digestión de la proteína, análisis por MALDI-ToF y empleo de algoritmos de búsqueda en bases de datos.

Para llevar a cabo el análisis de datos, cada proteína en la base de datos es digerida teóricamente empleando el mismo agente, utilizado para fragmentar la proteína problema. Posteriormente se compara el espectro obtenido por PMF con los espectros teóricos generados en la base de datos; se calcula y asigna una “puntuación”, la cual refleja la paridad entre los datos experimentales y los teóricos obtenidos por la base de datos. La proteína identificada como la más probable, es aquella con la puntuación más alta. (88)

Esta técnica posee la ventaja de ser bastante rápida, sin embargo no es buena cuando se trabaja con mezclas de proteínas a pesar de que se han desarrollado algunos programas para tal fin. La presencia de un alto número de modificaciones post-traduccionales en la proteína problema puede generar un espectro de masa distinto a los predichos por las bases de datos, lo que representa un problema para el análisis. La técnica PMF puede ofrecer mejores resultados si la búsqueda en las bases de datos es suplementada con una secuencia parcial. (88).

### **5.2. Secuenciamiento utilizando datos generados con la técnica Product Ion Scan en MS/MS.**

Como se mencionó previamente, la fragmentación de péptidos utilizando la técnica ion product scan o de decaimiento post-fuente de masas, proporciona información

acerca de la secuencia. La información obtenida a partir de una secuencia es indudablemente más precisa que la proporcionada por la masa molecular. Por tanto, la secuencia de un péptido suficientemente largo puede ser suficiente para identificar una proteína que ha sido caracterizada previamente.

Es posible llevar a cabo un análisis manual del espectro de masa para determinar la secuencia tomando como base los iones (de la serie *b* y *y*) generados.

Los resultados obtenidos también pueden interpretarse en bases de datos, a este tipo de búsqueda se le denomina MS/MS no interpretado (uninterpreted MS/MS). Generalmente basta con obtener la secuencia de dos péptidos para identificar una proteína de un genoma conocido. Son muchas las bases de datos disponibles para realizar búsquedas de este tipo, sin embargo, presentan problemas en el análisis cuando existen modificaciones y polimorfismo en las proteínas. (21)

### **5.3. Secuenciación *de novo* y análisis bioinformático.**

El objetivo de esta aproximación es obtener secuencias completas de aminoácidos que se deduzcan *de novo* de espectros MS/MS (mediante interpretación manual o con ayuda de algoritmos) y buscar homologías frente a proteínas presentes en bases de datos, a través de un exhaustivo análisis bioinformático. El secuenciamiento *de novo* es necesario cuando el análisis por MFP o MS/MS no interpretado no produce resultados confiables. Esto es común en casos en que el genoma del organismo del cual procede la proteína no ha sido caracterizado completamente. Aunque la proteína de interés pueda no ser identificada o sea una proteína desconocida, la información de la secuencia puede ser utilizada para clonar el gen correspondiente. (88)

En condiciones de baja energía, el ión precursor se fragmenta para producir iones *-b* y *-y* de longitudes variadas. La secuencia de los iones de ambas series es complementaria, de manera que, es posible obtener una secuencia completa aun cuando existan gaps (diferencias) en la secuencia de una u otra serie. Cuando los péptidos son obtenidos por digestión con tripsina, el extremo C-terminal de los

mismos es arginina o lisina. En un espectro MS/MS, el residuo C-terminal se puede observar en el fragmento correspondiente al ión- $yI$ . Por tanto, el punto de inicio de la serie, siempre será conocido. A la masa observada del ión- $yI$  hay que añadir la masa de una molécula de agua y de un protón. Si la masa del ión  $yI$  es de 175 Da, entonces el residuo es arginina; en cambio, si la masa es de 147 Da el residuo es lisina. Una vez identificado el ión  $yI$  en el espectro, la secuencia de la serie puede iniciarse a partir de ese punto.

#### **5.4. Estabilidad y plegamientos de proteínas.**

A pesar de que aún no es posible la predicción de proteínas solamente a partir de los principios básicos de la física, nosotros entendemos la naturaleza general de las interacciones que determinan las estructuras de las proteínas. Para asumir su estructura nativa, la proteína debe optimizar las interacciones intra o inter-residuos, sujetas a limitaciones en la curva espacial trazada por la cadena principal. Las conformaciones preferidas por la cadena principal predisponen las formas de plegamiento en dirección a motivos estructurales formados o inducidos. Lo característico en cada proteína es su secuencia de cadenas laterales, luego las interacciones que envuelven a las cadenas laterales determinan la conformación de la cadena principal, de esta forma la cadena principal escoge entre las posibles conformaciones permitidas. (72)

#### **5.5. Las cadenas laterales**

Las cadenas laterales ofrecen la versatilidad físico-química necesaria para generar todos los padrones de plegamientos diferentes. Las cadenas laterales de los veinte aminoácidos varían en tamaño, carga eléctrica, polaridad, forma y rigidez. (72)

#### **5.6. Estabilidad y desnaturalización de proteínas.**

La estabilidad de la estructura nativa de las proteínas, se define como la diferencia de energía libre entre los estados nativo y desnaturalizado de la proteína. Las

proteínas, no siempre son estables, pues la ruptura de unas pocas interacciones no covalentes son suficientes para desestabilizar la estructura nativa. (49)

Sin embargo las proteínas no están diseñadas como moléculas rígidas, son muy flexibles. Su estado nativo, es meta-estable y la ruptura de uno a tres enlaces de hidrógeno o unas pocas interacciones hidrofóbicas, pueden modificar fácilmente la conformación de las proteínas. La adaptabilidad conformacional al cambiar las condiciones de la disolución en que se encuentran, permite llevar a cabo funciones biológicas críticas.

La desnaturalización, se define como cualquier modificación de la conformación nativa de la proteína, a nivel de la estructura cuaternaria, terciaria o secundaria, que no involucre ruptura de los enlaces peptídicos. La desnaturalización puede ser reversible en algunas condiciones. En las condiciones típicas del procesamiento de alimentos, la desnaturalización es por lo general irreversible. (49)

Una proteína desnaturalizada no es más que una cadena de aminoácidos sin una estructura tridimensional definida ni estable. A menudo, las proteínas desnaturalizadas pierden su solubilidad y precipitan.

Las consecuencias que trae una desnaturalización a la proteína son: descenso de la solubilidad, modificación de la capacidad de fijar agua, pérdida de actividad biológica, mayor susceptibilidad al ataque por proteasas (aumento de la digestibilidad) y el incremento de viscosidad intrínseca.

### **5.7. Plegamiento de Proteínas:**

El plegamiento de proteínas es el proceso por el cual una proteína alcanza su estructura tridimensional. La función biológica de una proteína depende de su correcto plegamiento, si una proteína no se pliega correctamente será no funcional, por lo tanto no será capaz de cumplir su función biológica.

### 5.7.1. Termodinámica del plegamiento

En condiciones fisiológicas, el proceso de plegamiento de una proteína globular está claramente favorecido termodinámicamente, esto es, el incremento de energía libre global del proceso debe ser negativo (aunque alguno de sus pasos puede ser positivo). Este cambio se consigue equilibrando una serie de factores termodinámicos como la entropía conformacional, las interacciones carga-carga, los puentes de hidrógeno internos, las interacciones hidrofóbicas y las interacciones de Van der Waals. (51, 62)

#### a. Entropía conformacional

Se define entropía conformacional del plegado, como la disminución de la entropía de la aleatoriedad en definitiva, durante el paso desde una multitud de conformaciones de ovillo aleatorio hasta una única estructura plegada. La energía libre, representada en la ecuación  $\Delta G = \Delta H - T \Delta S$ , demuestra que el  $\Delta S$  negativo realiza una contribución positiva a  $\Delta G$ , es decir; el cambio de entropía conformacional se opone al plegado, por ello, el  $\Delta G$  global, que debe ser negativo, se debe a que o bien  $\Delta H$  es negativo y grande o a algún otro aumento de la entropía con el plegado. En la práctica se dan ambas cosas. La fuente de  $\Delta H$  negativo es el cúmulo de interacciones favorables energéticamente que se dan. en el interior del glóbulo proteico, interacciones que suelen ser no covalentes. (51)

#### b. Interacciones carga-carga

Las interacciones carga-carga se dan entre grupos polares y cargados de las cadenas laterales de los aminoácidos componentes del polipéptido, puesto que los grupos carboxilo y amino del carbono alfa están implicados en el enlace peptídico, de este modo, dichos grupos ionizados se atraen y forman un equivalente a sales entre residuos del polipéptido, de hecho, se denominan puentes salinos.(51) Evidentemente, dichas interacciones desaparecen cuando el pH del medio varía (alto o bajo), que hace que se pierda el estado de ionización del grupo; de hecho, esta es

una de las causas de la desnaturalización rápida de las proteínas mediante adición de ácidos o bases, y subyuga a las proteínas a un entorno de un pH tamponado y moderado, que es el fisiológico. (48)

#### **c. Enlaces de hidrógeno internos**

Las cadenas laterales de muchos aminoácidos se comportan como donadores o como receptores de enlaces de hidrógeno. Además, si los protones amida o los carbonilos del armazón polipeptídico no están implicados en el enlace peptídico, pueden interactuar también en este tipo de uniones estabilizadoras. Si bien los enlaces de hidrógeno son débiles en disolución acuosa, su gran número puede estabilizar y lo hace en la estructura terciaria proteica. (51)

#### **d. Interacciones de Van der Waals:**

El denso empaquetamiento en el núcleo de las proteínas globulares facilita la interacción débil entre grupos moleculares sin carga. Dichos enlaces son de baja energía, pero su abundante número suple su debilidad. Cada interacción individual sólo contribuye en unos pocos Kilojulios a la entalpía de interacción negativa global. Pero la suma de todas las contribuciones de todas las interacciones, sí que puede estabilizar a la estructura plegada. De este modo, una contribución energética favorable a partir de la suma de las interacciones intramoleculares, compensa de modo más que suficiente la entropía desfavorable del plegado. (51)

#### **e. Interacciones hidrofóbicas:**

Por definición, cualquier sustancia hidrofóbica en contacto con el agua provoca que ésta huya y se agrupe en estructuras. Esta ordenación corresponde a una disminución de la entropía del sistema. En el caso de las proteínas, los residuos hidrofóbicos de los aminoácidos quedan orientados, en su plegamiento, hacia el interior de la molécula, en contacto con sus semejantes y alejados del agua. En consecuencia, la internalización de los grupos hidrófobos aumenta la aleatoriedad del sistema, por

consiguiente, produce un aumento de entropía al doblarse. Este aumento de entropía produce una contribución negativa a la energía libre del plegado y aumenta la estabilidad de la estructura proteica. (51)

## **5.8. Predicción y modelaje de estructura de proteínas**

Los métodos de predicción de la estructura de una proteína a partir de la secuencia de aminoácidos incluyen (10):

- a. Tentativas de predicción de la estructura secundaria: sin intentar agregar estas regiones tridimensionalmente, los resultados son listas de regiones de la secuencia que formarían hélices alfa y regiones que formarían cintas de hojas beta.
- b. Modelaje por homología: predicción de la estructura tridimensional de una proteína a partir de estructuras conocidas de una o más proteínas relacionadas. Los resultados son un conjunto completo de coordenadas para las cadenas principal y lateral, con la intención de proponer un modelo estructural e alta calidad, comparable a una estructura experimental de baja resolución.
- c. Reconocimiento del padrón de plegamiento o topología (fold recognition): dada una biblioteca de estructuras conocidas, determinando cual de ellas comparte un padrón de plegamiento con una proteína de interés de secuencia conocida, con estructura desconocida. Si el padrón de plegamiento de la proteína blanco no está presente en la biblioteca, tal método debería ser capaz de hacer esa identificación. Los resultados son una indicación de una estructura conocida que tenga la misma topología (padrón de plegamiento). Que la proteína blanco, o la conclusión de que ninguna proteína de la biblioteca posee la misma topología que la proteína blanco.

### **5.8.1. Herramientas de evaluación del modelo de la estructura de proteínas**

La evaluación de la calidad del modelo es un paso crucial en el modelado de homología según la herramienta SWISS-MODEL, esta es evaluada extensivamente y comparada sumo detalle y cuidado, siendo la calidad de los modelos individuales los que brindan tal resultado. Por lo tanto, las datos de gráficas como ANOLEA

significan potencial de fuerza; GROMOS energía empírica del campo de fuerza; y QMEAN, que proporcionan y permite al usuario estimar la calidad local de la estructura predicha, siendo el más importante, ya que Swiss-Model los usa para la evaluación de calidad de modelos.

- **QMEAN:** Es una función de puntuación compuesta, tanto para la estimación de la calidad global de todo el modelo, así como para el local de análisis por residuo de diferentes regiones dentro de un modelo.

### 5.9. Sobreposición de estructuras y alineamientos estructurales

El estudio de proteínas de estructura conocida se facilita enormemente cuando existe relación secuencial entre ellas, siendo este el caso del análisis de familias de proteínas; no obstante cada vez más se describen en la literatura ejemplos de proteínas que muestran un andamiaje (scaffold) similar, incluso cuando sus secuencias no están relacionadas, en estos casos comparar estructuralmente las proteínas resulta muy difícil, especialmente cuando tampoco existen estructuras secundarias regulares comunes.

El alineamiento de secuencias y de estructuras secundarias regulares, son utilizadas como elementos principales para realizar clasificaciones de proteína en bases de datos, donde las proteínas son agrupadas por métodos automáticos y se reflejan las tendencias estructurales de las familias de proteínas, pero no necesariamente las relaciones funcionales y evolutivas entre ellas, quedando ocultas a los métodos automáticos. Sin embargo, la clasificación se realiza manualmente y tiene que en cuenta los datos bibliográficos sobre las funciones de las proteínas. Este hecho permite encontrar esta clasificación dividida en tres grupos: proteínas homologas cercanas, homologas remotas y proteínas análogas. El primer grupo incluye proteínas con similitudes secuenciales significativas entre ellas, mientras los dos últimos grupos relacionan proteínas con poca o ninguna homología secuencial. Así, estas proteínas se dividen en homologas remotas (cuando tienen relación estructural

y/o funcional y derivan de un ancestro común), y proteínas análogas (cuando no están relacionadas con un gen ancestral). (10)

El incremento del número de estructuras terciarias conocidas hace útil y necesario el desarrollo de métodos para la comparación de estructuras, paralelamente al desarrollo de métodos de análisis secuencial. Esto se justifica porque los alineamientos estructurales de proteínas, pueden descubrir propiedades estructurales y funcionales.

## **6. Software y herramientas bioinformáticas:**

Los últimos avances en la investigación en ciencias biológicas están produciendo un enorme crecimiento en el volumen y la complejidad de la información biológica disponible. Las tecnologías de la información y las comunicaciones son cruciales para posibilitar el almacenamiento e interpretación de estos datos en los centros de investigación de un modo eficiente y robusto. Se crean numerosas bases de datos y herramientas de análisis tanto en software como hardware.

### **a. 4000 Series Explorer<sup>TM</sup>: (5)**

Software que permite la manipulación y recolección de datos provenientes del Equipo MALDI ToF/ToF ABSciex 4800 Plus, permite obtener espectros de masa en tiempos de vuelo en tándem, quiere decir que tiene la sensibilidad más alta disponible en los modos MS y MS/MS este analizador combina todas las ventajas de MALDI en un espectrómetro de masa.

### **b. Protein Pilot<sup>TM</sup>: (1)**

Software que simplifica la identificación de proteínas, lo que le permite identificar cientos de modificaciones peptídicas y divisiones no tripticos simultáneamente. Distinguir fácilmente isoformas de proteínas, subconjuntos de proteínas, y suprimir los falsos positivos, así como visualizar las asociaciones proteína-peptido y

relaciones. Con la entrada genérica para instrumentos SCIEX través del Formato que nos brinda su PMF, el software es compatible con todos los sistemas de la proteómica MS/MS.

**c. DNASTar:** (23)

DNASTAR es un software que proporciona lo necesario para la información genómica, y proteómica de la biología estructural, y la investigación de la biología evolutiva y está disponible con herramientas individuales para satisfacer mejor sus necesidades:

- **EditSeq:** Es una aplicación principalmente como una utilidad para importar y editar algunos formatos de archivo menos comunes. Con EditSeq, puede modificar manualmente la secuencia.
- **MegAlign:** Software de alineación de secuencias, tanto como para secuencias de ADN y secuencias de proteínas, usando una gama de pairwise y múltiples métodos de alineación. Pantallas gráficas Rich le permiten ajustar la alineación de su acabado, así como analizar la filogenia, las diferencias en la química, estructural o funcionales.
- **Protean:** Ayuda a predecir patrones de visualización, composición de aminoácidos, las características estructurales secundarias, y las propiedades físico-químicas de las secuencias de proteínas a través de su completo conjunto de herramientas de análisis de proteínas.

**d. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool):** (13)

Es una herramienta para la búsqueda de homólogos según su alineamiento básico local, donde encuentra las regiones de similitud local entre secuencias. El programa compara nucleótidos o secuencias de proteínas en bases de datos y calcula la significación estadística de los partidos. BLAST puede utilizarse para inferir las relaciones funcionales y evolutivas entre secuencias, así como ayudar a identificar a los miembros de las familias de genes.

- **BLAST NCBI:** (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) Pertenecce al Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), mediante el podemos acceder a la información biomédica y genómica.
- **BLAST EBI:** (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/ncbiblast/>) perteneciente al Archivo de Nucleótidos Europeo (ENA) dado por el Instituto Biotecnológico o Europeo (EBI) proporciona un registro completo de información de secuencia de nucleótidos del mundo, que cubre la secuencia de datos en bruto, información ensamblaje de secuencias y anotación funcional.

**e. SWISS-MODEL: (82)**

Es un servidor de homología proteica estructural de modelado totalmente automatizado, accesible a través del servidor web ExPASy. El propósito de este servidor es hacer un modelamiento de la proteína accesible a todos los bioquímicos y biólogos moleculares del mundo.

**f. UCSF Chimera: (83)**

Es un programa altamente extensible para la visualización y análisis de las estructuras moleculares y los datos relacionados, incluyendo mapas de densidad, ensamblajes supramoleculares, la secuencia de alineaciones, resultados de acoplamiento, trayectorias, y conjuntos de conformación interactivos. Las imágenes y animaciones son de alta calidad. UCSF (Universidad de California San Francisco)

**g. BIOPEP: (12)**

Es una herramienta de búsqueda que realiza el cálculo del perfil de actividad biológica potencial de péptidos encriptados de una base de datos de diferentes revistas indexadas y organizada por la Facultad de Ciencias de la Alimentación de la Universidad de Warmia y Mazuria de Olsztyn, en la Cátedra de Bioquímica de Alimentos.

.

## CAPITULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. Ubicación:

El presente trabajo se realizó en los Laboratorios ubicados en las instalaciones de centro de investigación BIOTEC CMC, en planta de Camposol S.A.C., Distrito de Chao, Provincia de Virú, Departamento de La Libertad.

#### 2. Materiales:

##### 2.1. Material Biológico:

- *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana).

##### 2.2. Materiales de Laboratorio:

- Frasco transparente con tapa rosca de 50 mL.
- Frasco transparente con tapa rosca de 100 mL.
- Frasco transparente con tapa rosca de 500 mL.
- Tubos falcon de 50 mL.
- Mortero de porcelana
- Tubos centrífuga de 50 mL
- Papel Filtro Watman N°1
- Tubos de ensayo 13x100 mm.
- Vaso de Precipitación de 100 mL.
- Vaso de Precipitación de 250 mL.
- Termómetro digital
- Tubos endorf de 1.5 mL.
- Tubos endorf de 200 µL.
- Puntas para pipetas sin filtro 1000-5000 µL.
- Puntas para micropipetas con filtro 0-20 µL.
- Puntas para micropipetas con filtro 0-200 µL.
- Puntas para micropipetas con filtro 100-1000 µL.

### 2.3. Equipos, Aparatos e Instrumentos:

- Sistema de Purificación de Agua Ultrapura MilliQ (MERCK)
- Congeladora a -80°C (Ilshin Biobase)
- Balanza Analítica Explorer(OHAUS)
- Centrifuga Refrigerada (PrO-Research)
- Refrigeradora (Electrolux)
- Sistema Doble de Placas “Owl™ Dual – Gel Vertical Electrophoresis Systems P8DS - 1” (Thermo Scientific)
- Espectrofotómetro Evolution UV-V 260 Bio (Thermo Scientific)
- Pipeta Automática - Micropipeta 0.5-10 µL. (Axygen)
- Pipeta Automática - Micropipeta 5-50 µL. (Axygen)
- Pipeta Automática - Micropipeta 20-200 µL.(Axygen)
- Pipeta Automática - Micropipeta 100-1000 µL. (Axygen)
- Pipeta Automática - Micropipeta 1000-5000 µL. (Axygen)
- Accesorios para Formación de Geles en Electroforesis 1D: Cubeta para formación de geles (Carrier), Cristales Planos de Vidrio 10x10 cm. (placas), Peines 10 cm. x 10 pozos y Separadores de 0.8 mm. de 10 cm. (Thermo Scientific)
- Fuente de Poder Electrico (Thermo Scientific)
- MALDI ToF/ToF ABSciex 4800.(ABSciex)
- Placa MALDI (OptiPlate-384 well Microplate)

### 2.4. Reactivos:

- Nitrógeno Líquido
- Cloruro de Sodio, NaCl grado analítico (CalBiochem)
- Etanol Absoluto 99.8% (J.T.Baker)
- Ácido Clorhídrico HCl 36.5-38.0% (J.T.Baker)
- Hidróxido de Sodio, NaOH grado analítico (Merck)
- BSA (Albumina de Suero Bovino)- (SIGMA)
- Coomassie Brilliant Blue G-250 (SIGMA)
- Ácido Fosfórico al 85 % (J.T.BAKER)
- Agua Milli-Q (Millipore)

- Glicerol, grado molecular (JT.Baker)
- Glicina (Bio-Rad)
- Marcadores Molecular de Proteínas (Thermo Scientific)
- Acrilamida (MERCK)
- N,N-metileno-bisacrilamida (Merck KGaA - Darmstadt, Germany)
- Tris-Base (JT.Baker)
- Dodecil Sulfato de Sodio, SDS (Sodium Dodecil Sulafate) (Promega)
- N-N-N-N-Tetrametiletilenediamina (TEMED) (Promega)
- Persulfato de Amonio, PSA (Omnipure)
- Azul de Bromofenol (SIGMA)
- Ditiotreititol (DTT)(Promega)
- Metanol para análisis EMSURE (MERCK)
- Ácido Acético Glacial (JT.Baker)
- Acetonitrilo (Merck)
- Bicarbonato de Amonio (Merck)
- Tripsina, grado secuenciamiento (Promega)
- Matriz  $\alpha$ CHCA (Acido alfa-4-hidroxicinámico Ciano)
- Acido Trifloro Acético 25% (Merck)

## 2.5. Materiales Varios:

- Caja de tecnopor de 20 L.
- Guantes venitex (guantes de Nitrilo, Talla 7.5)
- Guantes de cuero o guantes protectores
- Hielo seco y Pica hielo
- Bolsas ziplop
- Bolsas de polipropileno transparentes
- Cinta de embalaje
- Marcador grueso
- Papel toalla
- Tabla de picar
- Pinzas quirúrgicas
- Bisturí N°4

## 2.6. Softwares y Herramientas Bioinformáticas:

- 4000 Series Explorer™ (Software que permite la manipulación y recolección de datos provenientes del Equipo MALDI ToF/ToF ABSciex 4800 Plus)
- ProteinPilot™ (Software que simplifica la identificación de proteínas)
- DNASTat (Software que proporciona información genómica, y proteómica)
  - EditSeq (Importa y edita secuencias).
  - MegAlign (Alineamiento múltiple de secuencias).
  - Protean (Herramienta de análisis de proteínas).
- BLAST (Herramienta para la búsqueda de homólogos según alineamiento)
  - NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
  - EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/ncbiblast/>)
- SWISS-MODEL (Servidor de homología proteica estructural de modelado) (<http://swissmodel.expasy.org/>)
- UCSF Chimera (Programa para la visualización y el análisis de las estructuras moleculares)
- BIOPEP (Herramienta de búsqueda que realiza el cálculo del perfil de actividad biológica encriptada) (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>)

### 3. Métodos

#### 3.1. Muestreo de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana).

Se colectó la materia prima; *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana) en la bahía de Chimbote, en el muelle CRIANI, provincia de Santa, región Ancash; desde las 11 a 13 horas, que llegaron de alta mar las embarcaciones artesanales (bolicheras). Se seleccionaron individuos con características de tamaño mayores a 12 cm. (edad en la cual alcanzaron la madures sexual y están aptos para ser consumidos - IMARPE), que tengan características de frescura; en la piel, pigmentación viva y brillante con consistencia tersa y firme; en los ojos, la córnea transparente y la pupila negra brillante; las escamas firmemente adheridas; el abdomen terso y liso sin flacidez ni hinchazón. (7)

Los individuos seleccionados fueron transportados en hielo al laboratorio, en cajas de tecnopor, embolsados para evitar daño, en una proporción individuo /hielo 1:2 (w/w), para conservar su frescura hasta el momento de su procesamiento. (43). En el laboratorio fueron limpiados con solución salina NaCl 0.9% y papel toalla humedecido en alcohol al 90% para desinfectar externamente, luego fueron almacenados en bolsas herméticas dentro de cajas a - 80 °C.

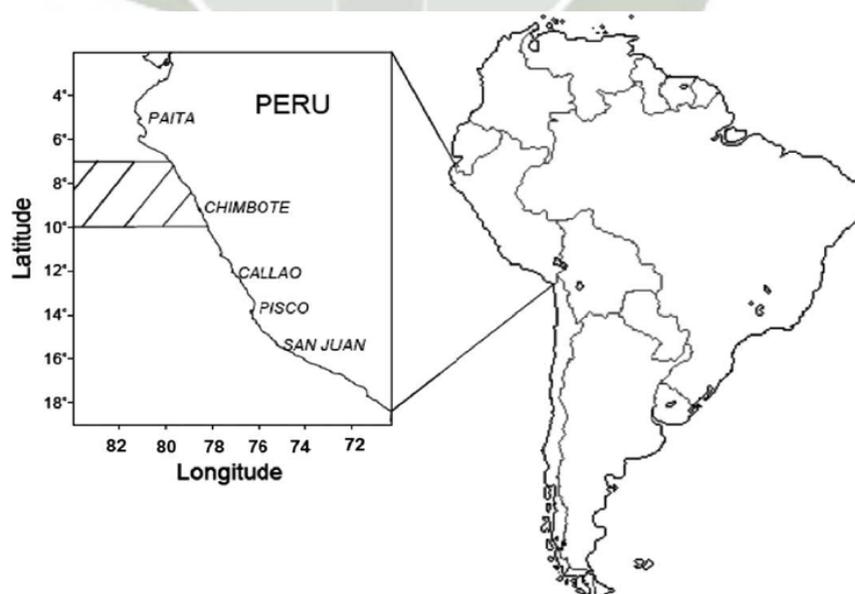


Figura N°4: Zona de Pesca, frente a la Bahía de Chimbote (9)

### 3.2. Extracción de la masa muscular de *Engraulis ringens*.

Para la extracción de la masa muscular de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana) se tomó como referencia base, la reportada por Belén D.(7); haciendo modificaciones para una sencilla y completa extracción. Se extrajo las escamas y la piel superficial, se hizo incisiones; una que fue detrás de las agallas y la otra anterior a la aleta caudal, ambas incisiones, en ambos lados del individuo. Luego se retiró por completo la aleta dorsal con una pinza, la que formó una abertura lineal en casi toda la parte dorsal del individuo, que por su estado semi-congelado se abrió con el bisturí haciendo incisión lineal por todo el dorso hasta llegar a la espina, se terminó de retirar el músculo de forma manual, se eliminaron las vísceras y el resto de la anchoveta, quedándonos únicamente con el músculo. Posteriormente este fue limpiado de restos con solución salina NaCl al 0.9 %, luego almacenado a -80 °C, hasta la ejecución de ensayos posteriores.

### 3.3. Acondicionamiento de la masa muscular para la obtención de un extracto proteico del músculo de *Engraulis ringens*.

Se acondicionó la materia prima para la obtención de un extracto rico en proteínas, primero se trituró en trozos finos con ayuda del equipo quirúrgico y luego se pulverizó usando nitrógeno líquido en mortero de porcelana. Se suspendió en buffer Tris-HCl 50 mM, NaCl al 0.9 %, pH 7.8. A una proporción 1:1 (w/v), luego se homogenizó por un lapso de 5 min. en vortex a máxima revolución; posteriormente se filtró en una gasa estéril, con el fin de separar restos biológicos, se dejó sedimentando por 24 horas a 4 °C y se centrifugó a 6000 g. por 10 min. y se colectó el sobrenadante.

Una vez obtenido el extracto rico en proteínas del músculo de *Engraulis ringens*, se procedió a la detección colorimétrica y cuantificación de proteínas totales presentes, procedimiento que se realizó siguiendo la metodología reportada por Bradford M. M. (14) y modificada por Randall I.K. (68), la que se detalla en el Anexo 1.

### **3.4. Determinación de la distribución aparente del peso molecular por electroforesis unidimensional SDS-PAGE:**

Para la determinación de la distribución aparente del peso molecular se tomó como metodología base, la citada por Laemmli U.K. (47), para electroforesis en gel, SDS-PAGE (gel de Dodecil Sulfato de Sodio - Poliacrilamida).

El montaje del sistema de electroforesis para un gel plano de 0.8 mm. de grosor; se montó el sándwich, con dos placas de vidrio (una tiene un rebaje) y los dos separadores en vertical entre ellas y a ambos lados, en medio se colocó la plantilla que ayuda en la adecuada ubicación de los separadores; por último se introdujo en el soporte formador de geles y se sujetó el conjunto en el carrier.

Se preparó geles de poliacrilamida discontinuos, presentando un gel de concentración de 5 % y gel de corrida de 12.5 %, estos fueron preparados a partir de una solución stock de acrilamida al 30 % y N,N-metileno-bisacrilamida al 0.8 % disueltos en agua Milli-Q.

El gel de inferior (gel de separación o resolución/resolving gel) se preparó en un vaso precipitado con 12.5% de Acrilamida en tampón Tris-HCl 1.0 M, a pH 8.8 conteniendo de SDS y Persulfato de Amonio (PSA) con N-N-N-N-Tetrametiletilenediamina (TEMED) para la polimerización (Anexo 2). Esta solución fue agreda de inmediato, hasta unos tres centímetros del borde superior en la placas que se encuentran en el carrier, luego se añadió una pequeña cantidad de agua destilada (esto hace que la superficie del gel quede recta) una vez que ya polimerizó, descartar el agua añadida. Posteriormente se preparó el gel superior (gel de concentración o apilamiento/staking gel) con 5 % de acrilamida en tampón Tris-HCl 1.0 M, pH 6.8; SDS, TEMED y persulfato de amonio. El TEMED y la solución recién preparada de PSA se añadieron poco antes de verter los geles, debido a que estos polimerizan los geles. Antes de que polimerice se introdujo en la parte superior el peine, que formó en el gel acumulador los pocillos para luego poder aplicar las muestras.

Las muestras fueron diluidas en tampón de muestra (Tris-HCl 0.08, M pH 6.8, SDS 0.02 M, glicerol 0.1 M, azul de bromofenol 0.2 M y DTT 0.1 M) hasta obtener una concentración final de proteína de 1 µg/mL. Luego se dejó en baño maría por 5 min. A 95 °C. Se dejó enfriar a temperatura ambiente.

La electroforesis SDS-PAGE se realizó con 12 µL. de la muestra por pozo, en un sistema doble de placas OwlTM Dual, en tampón de corrida (Tris-HCl 0.025 M; glicina 0.192 M con SDS 1 mM a pH 8.3) a amperaje inicial de 25 mAmp. hasta la entrada de la proteína en el gel de separación y posteriormente a 30 mAmp. mantenidos hasta el final de la corrida. Fueron usados como patrón los siguientes marcadores de masa molecular, obtenidos de Thermo Scientific: beta-galactosidasa (116 KDa), albumina de suero bovino (66.2 KDa), ovoalbumina (45.0 KDa), lactato deshidrogenasa (35.0 KDa), REasa Bsp98I (25.0 KDa), beta-lactoglobulina (18.4 KDa), lisozima (14.4 KDa).

Después de la corrida electroforética, el gel fue coloreado con solución colorante (0.25 % de comassie Blue G-250, 40 % Metanol, 10 % Ácido acético). El gel fue embebido en solución colorante toda la noche. En seguida, el gel fue lavado con solución decolorante (10 % ácido acético y 40 % Metanol) hasta visualizar las bandas. Decolorado el gel, este se mantuvo en agua y se traspasó a papel celofan para luego ser interpretado, determinando la distribución aparente de peso molecular. (Anexo 2)

### **3.5. Caracterización de la proteína por espectrometría de masa (MALDI TOF/TOF ABsciex 4800)**

La caracterización molecular de una de las principales proteínas constitutivas en *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana) estuvo basado en protocolos establecidos para estudios de aproximación proteómica en otras especies de peces. (5,6)

### 3.5.1. Escisión y digestión trípica de la banda (spot) de proteína del músculo de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana).

Se identificó una banda o spot definido o representativo en el gel de poliacrilamida SDS-PAGE de proteínas del músculo de *Engraulis ringens*, esta fue escindida utilizando un bisturí y colocada en un microtubo centrifuga de 1.5 mL. Posteriormente se procedió a decolorar cada pieza de gel, añadiendo 100  $\mu$ L. de bicarbonato de amonio 100 mM. en acetonitrilo en proporción 1:1 v/v, por 30 min. agitando en vortex periódicamente, dependiendo de la intensidad de la coloración de la pieza de gel extraída. Luego se agregó 500  $\mu$ L. de acetonitrilo e incubo a temperatura ambiente con agitación en vortex ocasional hasta observar la deshidratación de las piezas de gel, se removió el acetonitrilo de las muestras y estas fueron almacenadas a -20 °C hasta el momento de su procesamiento.

Para la digestión trípica dependiendo del grosor de cada pieza de gel se adicionó buffer tripsina (25 mM de bicarbonato de amonio, pH 7.8 con 25 ng/ $\mu$ L. de tripsina grado secuenciación) hasta cubrir por completo, se incubó 30 min a 37°C, se removió el exceso de solución enzimática y se agregó 10  $\mu$ L. de buffer bicarbonato de amonio e incubo a 37 °C durante toda la noche para la escisión enzimática. Los digeridos trípticos fueron almacenados a -20 °C hasta el momento de su análisis por espectrometría de masas. (77)

### 3.5.2. Análisis de péptidos por espectrometría de masa MALDI ToF/ToF.

Las fracciones de péptidos obtenidas, fueron mezcladas con solución matriz (10 mg/mL. de  $\alpha$ CHCA disueltos en 30 % de acetonitrilo con 0.01 % de ácido trifloro acético) en una proporción de 1/1 (v/v). Se depositó 1  $\mu$ L. de la mezcla en los pozos de muestra de la placa MALDI (OptiPlate-384 well Microplate). Después de evaporarse el solvente de la mezcla, se observaron los cristales formados de péptidos/matriz. Posteriormente La placa MALDI ingresó al analizador 4800 MALDI ToF/ToF con los parámetros optimizados del equipo. (5) Se empleó el modo de operación reflectrón para la detección de masa de los diferentes péptidos trípticos,

obteniendo un espectro de masa de la fracción. Posteriormente se realizó un análisis de fragmentación de péptidos, denominado decaimiento post fuente, para ello se seleccionó los péptidos de mayor abundancia y se determinó las masas de todos sus fragmentos generados. Esta información espectral fue luego analizada por paquetes bioinformáticos con la finalidad de obtener la secuencia de aminoácidos de los péptidos encontrados así como la identificación de las proteínas origen, presentes en músculo de *Engraulis ringens*. (5) Los análisis de secuencias peptídicas para la caracterización de las proteínas fueron realizadas, mediante el programa Protein Pilot utilizando algoritmos Mascot, Paragon y Progroup.

#### **4. Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas del músculo de *Engraulis ringens*.**

##### **4.1. Homología y alineamiento de las secuencias obtenidas de la proteína del músculo de *Engraulis ringens* para la secuenciación *de novo***

La búsqueda de homólogos se realizó en la base de UniProtKB/Swiss-Prot (swissprot) un banco de datos exclusivo de proteínas del NCBI, (Centro Nacional de Información Biotecnológica), donde se analizó las secuencias, mediante el BLAST Standar Protein (Basic Local Alignment Search Tool - Herramienta de búsqueda según alineamiento básico local para proteínas según su secuencia de aminoácidos presentes):

[http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). (13)

De las proteínas homólogas encontradas se escogieron los que presentaron mayor porcentaje de identidad y así poder ser alineadas, en base a las secuencias obtenidas anteriormente, haciendo uso del Software DNASTar con las herramientas EditSeq y MegAlin para poder deducir la secuencia completa de nuestra proteína manualmente por Secuenciación *de novo*.(23)

#### **4.2. Construcción de cDNA *in silico* a partir de la proteína deducida del músculo de *Engraulis ringens*.**

A partir de la secuencia de la proteína deducida, se obtiene el DNA complementario, haciendo uso de la herramienta bioinformática de traducción inversa que acepta una secuencia de proteína como entrada y genera una secuencia de DNA complementario que representa la secuencia de codificación no degenerado más probable, encontrada en web-side nominada como una Suit de Manipulación de Secuencias (SMS): [http://www.bioinformatics.org/sms2/rev\\_trans.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html) (80); luego determinar su homología y alineamiento de las secuencias para obtener el árbol filogenético haciendo uso de BLAST-nucleotide del EBI (Instituto Europeo de Bioinformática): <http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/ncbiblast/nucleotide.html>. (13)

#### **4.3. Análisis de la característica estructural de la proteína deducida del músculo de *Engraulis ringens*.**

La característica estructural estudiada, fue la de hidropatía, para realizar una suposición estructural previa, haciendo uso del software DNASTAR usando la herramienta Proteam. Para hallar su perfil hidropático según Kyte-Doolittle, que se basa en hidrofobicidad de los aminoácidos.

#### **4.4. Predicción de la estructura tridimensional y simulación por dinámica molecular de la proteína del músculo de *Engraulis Ringens*.**

La determinación de la estructura secundaria, tridimensional, se realizó con la Herramienta bioinformática SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) (82) y la simulación de la dinámica molecular de la proteína, se realizó con el software USCF Chimera 1.5.3. (83) que permitió comparar dos conformaciones de la misma proteína en términos de similitud estructural y hallar sus variantes.

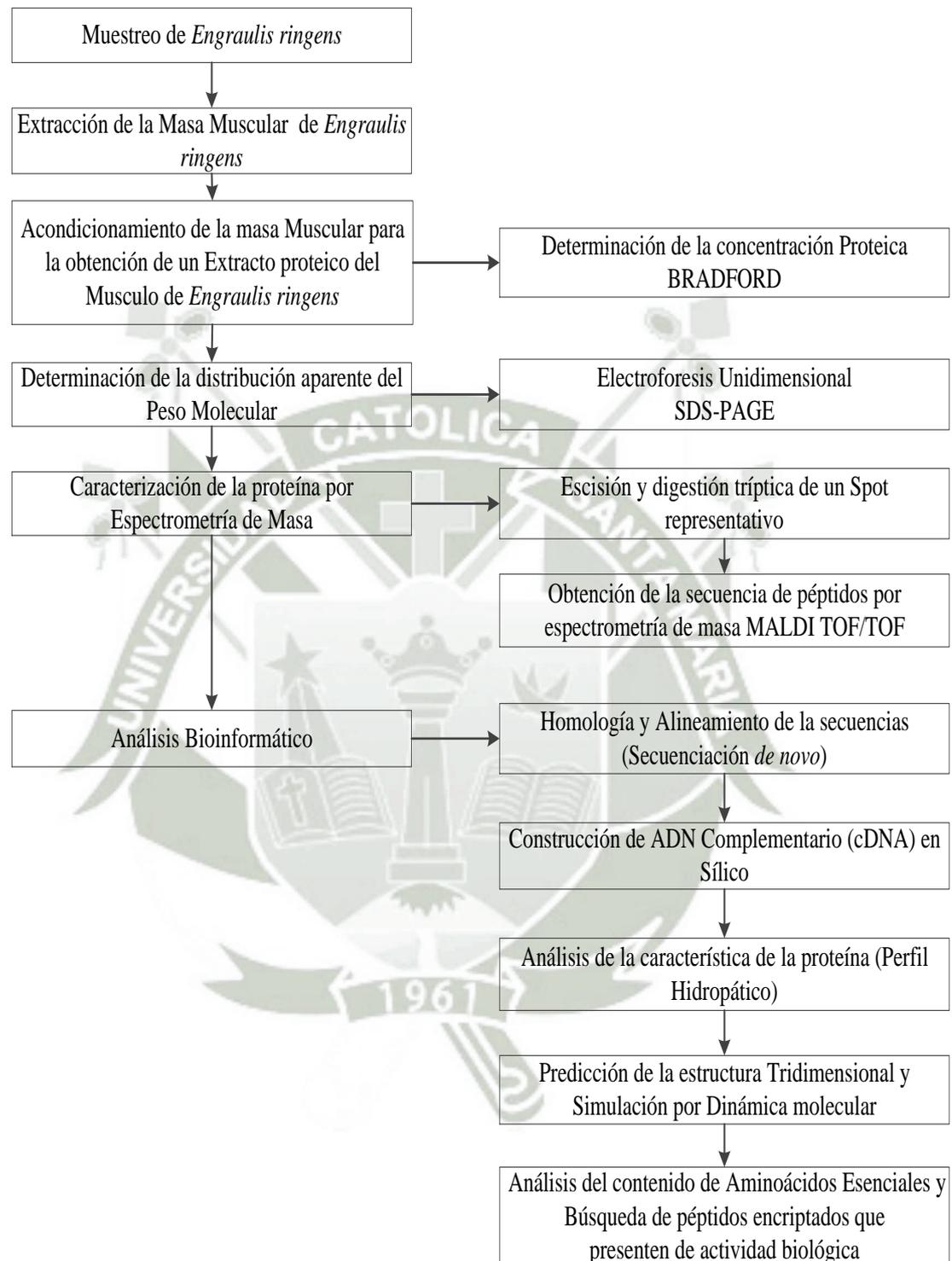
#### **4.5. Análisis de la proteína deducida del músculo de *Engraulis ringens* en el contenido de aminoácidos y búsqueda de péptidos encriptados con actividad biológica.**

La secuencia deducida fue sometida a un análisis del contenido de aminoácidos haciendo uso de la herramienta Proteam del software DNASTat, resaltando el contenido de aminoácidos esenciales.

La búsqueda de péptidos encriptados que presentan actividad biológica se realizó empleando el sitio BioPep: <http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>, (12) el cual contiene base de datos de secuencias de aminoácidos con actividad biológica reportada en revistas indexadas.



### 5. Flujograma de Procesos:



### CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 1. Preparación de la materia prima proveniente de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana) para la separación por electroforesis SDS-PAGE. de proteínas expresas del músculo esquelético.

En el muestreo de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana), se colectaron un total de 190 individuos, con longitudes iguales o mayores a 12 cm. Ya en laboratorio los individuos fueron limpiados y desinfectados, luego almacenados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su procesamiento. La extracción de tejido muscular de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana) tuvo un rendimiento de 56.48 % equivalente a  $11.37\text{ g.} \pm 1.00\text{ g.}$  de músculo por individuo; presentando una longitud promedio de  $13.44\text{ cm.} \pm 0.42\text{ cm.}$  ( $>12\text{ cm.}$  – parámetro de pesca establecidos por IMARPE, (35)) y un peso total de  $20.13\text{ g.} \pm 1.48\text{ g.}$  Al extracto rico de proteínas obtenido por el acondicionamiento de la materia prima, se determinó la concentración de proteínas totales por colorimetría según la metodología de Bradford, donde se realizó una curva estándar para el reactivo a partir de una solución stock de BSA (albumina de suero bovino) de  $1000\text{ }\mu\text{g/mL}$ . mostrando en el extracto una concentración de proteína de  $1014.75\text{ }\mu\text{g/mL.} \pm 18.19\text{ }\mu\text{g/mL}$ .

Las especies marinas son un alimento predominantemente proteico, si bien hay que decir que existen muchas más especies de peces que de animales productores de carne (incluso sin contar cefalópodos, crustáceos y mariscos), en el caso del tejido muscular, existe una variedad en el contenido proteico, ya que es variable dependiendo del tipo del pescado, de su alimentación y de la parte del cual se extrajo la proteína.

La determinación colorimétrica por el reactivo de Bradford, se basa en la unión de un colorante, Comassie Blue G-250 (azul brillante de coomassie) a las proteínas a través de grupos ionizados. Pues forma interacciones entre los residuos de aminoácidos

básicos: arginina, lisina e histidina y también una interacción débil con aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina y triptófano.

El contenido de proteínas en el músculo de peces va desde un 17 a 22%, si recordamos la composición de las proteínas en el músculo: las miofibrilares representan un 60.5% (miosina, actina, conectina, tropomiosina, troponina C, I y T, actinas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , miomesina etc.). Las sarcoplasmáticas un 29 % (hemoglobina, mioglobina, enzimas y otros) y el tejido conectivo representa un 10.5% (colágeno, elastina y proteínas mitocondriales) (85)

Las proteínas solubles, son aquellas que pueden ser extraídas por agua y se encuentran mayormente en el sarcoplasma de la célula muscular. Las proteínas solubles en sal, pueden ser solubilizadas por soluciones de alta fuerza iónica y están presentes en su mayoría en las miofibrillas y las proteínas insolubles son componentes mayormente del tejido conectivo, no son solubles en soluciones de alta fuerza iónica.

Si bien el padrón de expresión de proteínas estructurales podrían mantenerse constante en peces, existe un nivel de incertidumbre en la identificación de las mismas en *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana) a lo largo del tiempo, en razón de los niveles de expresión de las especies, debido a los cambios presentados en su propio genoma para su adaptación y supervivencia. Por lo que las proteínas presentes en los peces dependen mucho de su ecosistema y un factor fundamental es su alimentación.

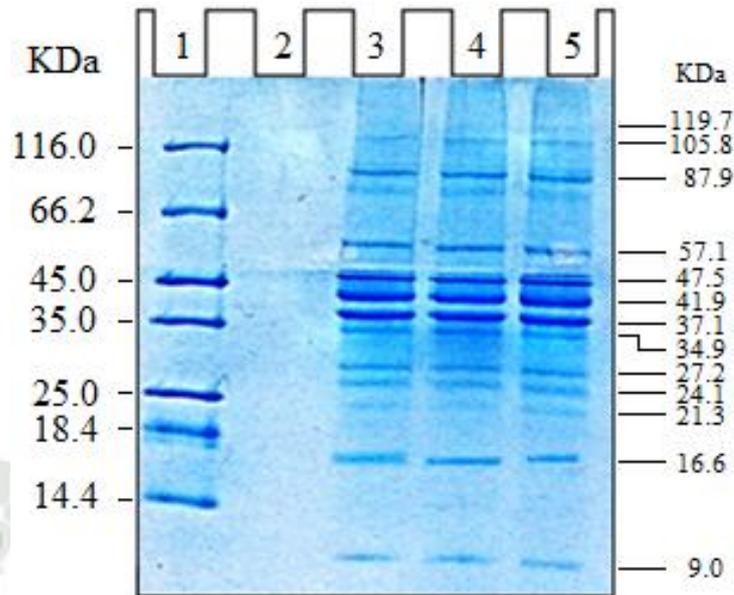
El uso del músculo de *Engraulis ringens* como fuente de proteína resulta por demás interesante, debido a esto existe un gran interés en obtener productos o subproductos con elevado valor nutricional y con función biológica mejorada, que incrementen el bienestar y la salud de la persona.

## 2. Determinación de la distribución aparente del peso molecular por electroforesis unidimensional SDS-PAGE:

El grupo de proteínas sarcoplasmáticas es característico de cada especie marina. Esta fracción de proteínas, es la que se utiliza para la identificación de especies por métodos electroforéticos. Así mismo, la caracterización de las proteínas obtenidas en cuanto a su tamaño se refiere, es otro parámetro de interés a evaluar, ya que la distribución del peso molecular puede ser de utilidad para la predicción de la capacidad antigénica, por lo que, los problemas de alergenicidad han sido relacionados a la presencia de proteínas de alto peso molecular, los que en ocasiones proporcionan un sabor amargo al pescado. (33,59)

En ese sentido, los resultados obtenidos de la distribución de las proteínas musculares muestran niveles de expresión a través de la electroforesis en SDS-PAGE, con un rango de proteínas que van desde 9 a 120 KDa, representado en la Figura N°5. Donde se muestra el gel de corrida y se evidencia la distribución de las proteínas, mostrando en el carril uno el marcador molecular, siendo las bandas de beta-galactosidasa (116.0 KDa), albumina de suero bovino (66.2 KDa), ovoalbumina (45.0 KDa), lactato deshidrogenasa (35.0 KDa), REasa Bsp98I (25.0 KDa), beta-lactoglobulina (18.4 KDa) y lisozima (14.4 KDa); y en los carriles 3, 4 y 5, la distribución aparente del extracto proteico obtenido a partir del músculo de *Engraulis ringens*.

Según Venugopal V., (85) se sabe que la miosina es una proteína de tamaño considerable que presenta un peso aproximado de 500 KDa, esta a su vez la conforman subunidades que son dos cadenas largas de 200 KDa cada una, y cuatro cadenas cortas de 20 KDa cada una. Actina presenta un peso molecular de 42 KDa, paramiosina presenta un peso molecular entre 200 y 258 KDa, y esta a su vez consiste de dos subunidades de 95 y 125 KDa.



**Figura N°5:** SDS-PAGE de Proteínas musculares de *Engraulis ringens* (Gel Dodecil Sulfato de Sodio - Poliacrilamida al 12.5%). Mostrando en el carril uno el marcador molecular, a partir del carril tres la distribución aparente de las proteínas musculares de *Engraulis ringens*. (Anexo 2)

### 3. Caracterización de péptidos por espectrometría de masa (MALDI ToF/ToF)

El analizador 4800 MALDI ToF/ToF<sup>TM</sup> es un espectrómetro de masas con tecnología MALDI ToF/ToF que incluye un analizador reflectrón. El equipo puede ser usado para investigaciones en proteómica de alto rendimiento. El sistema puede identificar proteínas determinando la masa exacta de péptidos formados por digestión enzimática. Adicionalmente, el sistema puede con mayor certeza identificar y caracterizar proteínas por aislamiento y fragmentación de un ion molecular de interés y determina las masas de los iones fragmento. El software 4000 Series Explorer<sup>TM</sup> es la interface de uso para ejecutar tareas y acceder a funciones del analizador 4800 MALDI ToF/ToF<sup>TM</sup>. Antes de adquirir datos, se debe crear un método de adquisición. Este método especifica los ajustes necesarios del instrumento para la captura de los datos. Entre los principales ajustes se encuentran los relacionados a la operación del instrumento, modo de obtención de espectros, controles automáticos y manejo del detector. Después de programar los datos, se debe procesar los espectros

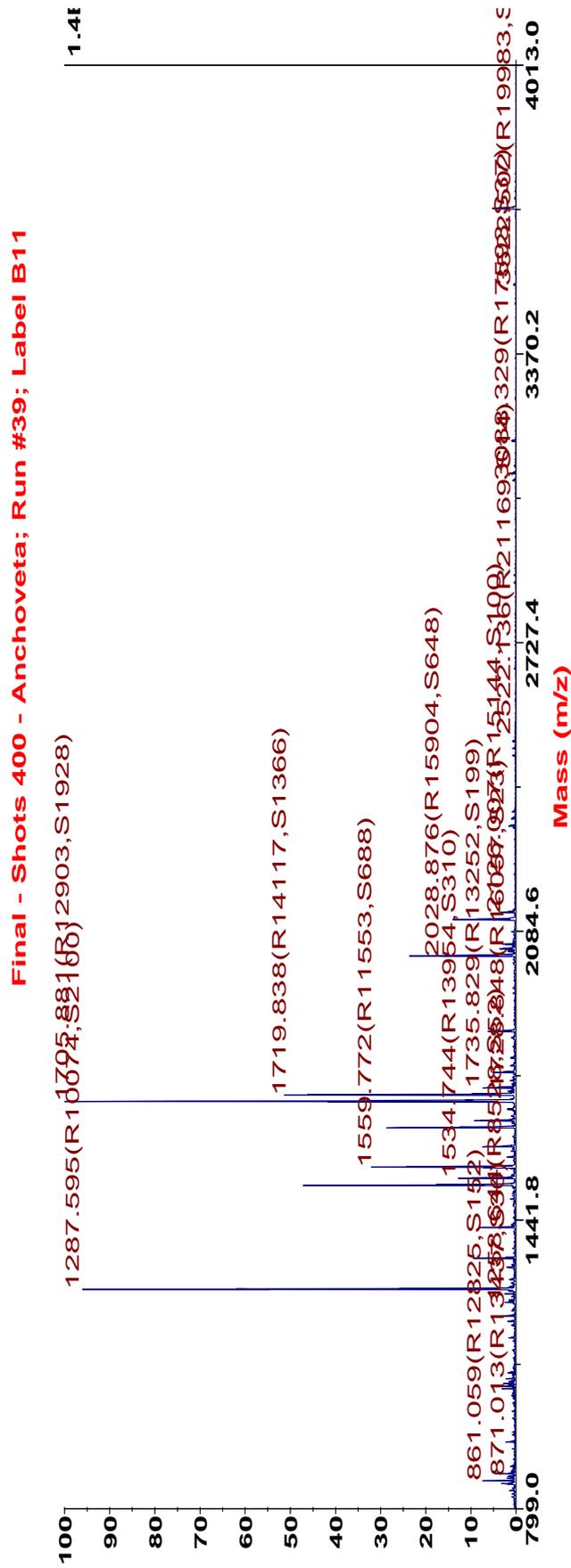
para detección de picos y ejecución de la calibración. Para ello se crea un método de procesamiento y se especifica los parámetros necesarios para suavizar y corregir la línea base del espectro. (Anexo 3).

### 3.1 Análisis de péptidos por espectrometría de masa MALDI ToF/ToF.

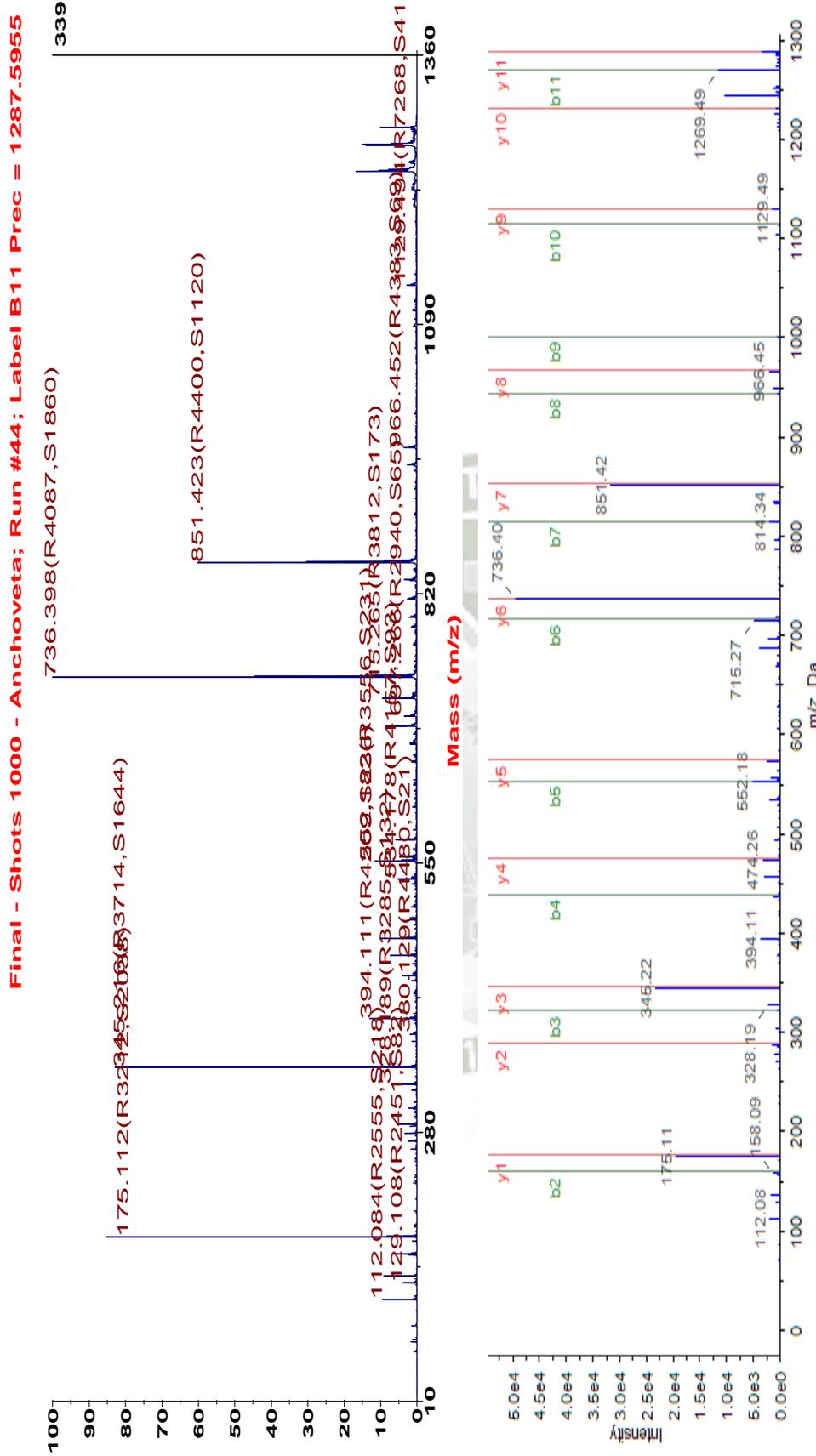
Las proteínas del músculo de *Engraulis ringens*, fueron separadas parcialmente mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 12.5% determinando su peso molecular aparente. Se realizó una escisión y digestión tróptica de una banda (spot) de aproximadamente 16.6 KDa, empleando para ello la enzima tripsina (grado de secuenciamiento), la cual corta en el extremo carboxílico del enlace peptídico de los residuos de arginina y lisina de la cadena de aminoácidos de las proteínas.

Finalmente los péptidos generados durante la digestión de proteínas, fueron co-cristalizados con matriz CHCA ( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid) para ser analizados por espectrometría de masas, MALDI ToF/ToF.

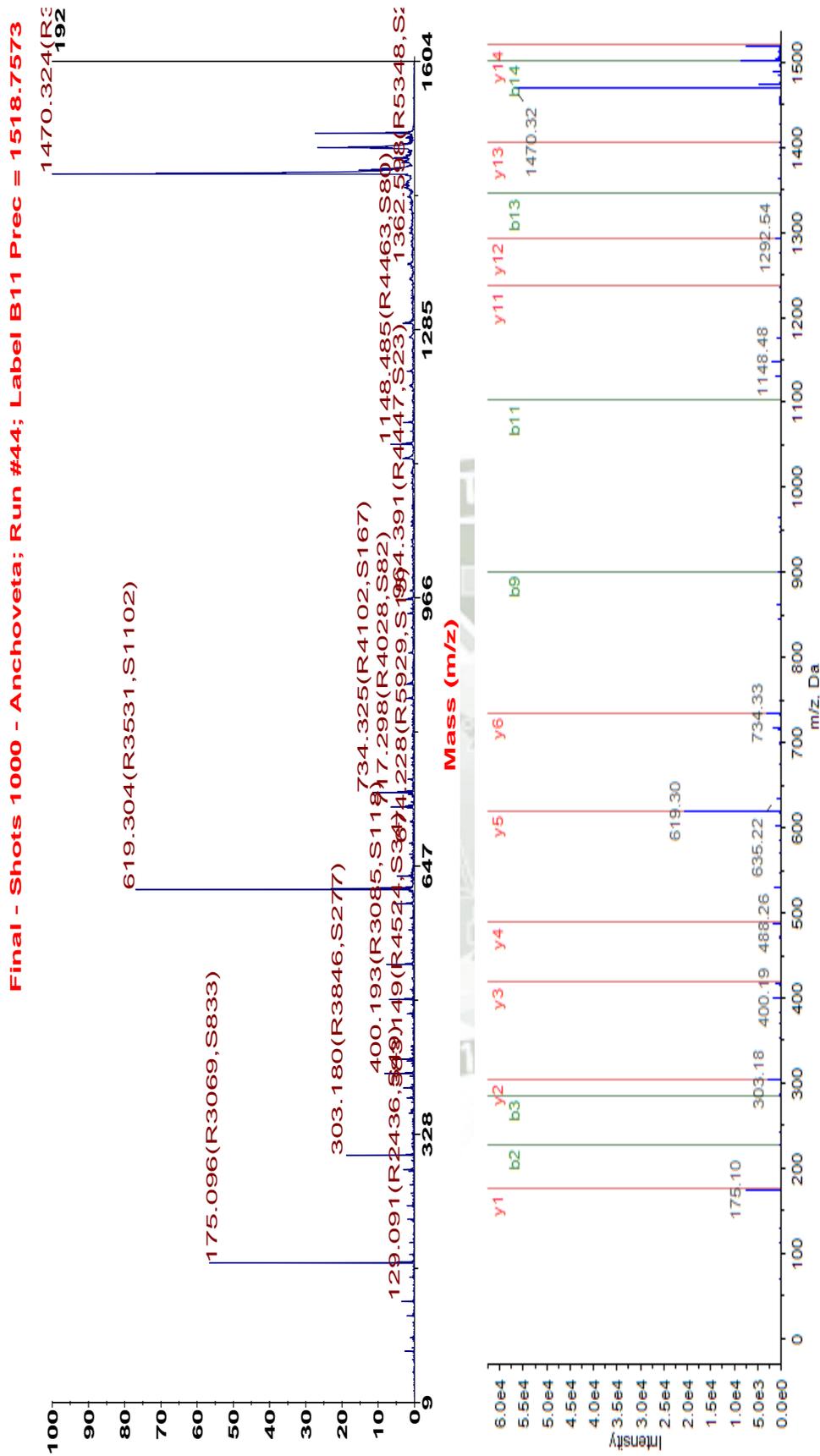
En la Figura N°6 se muestra el espectro de masa de los péptidos hidrolizados correspondientes a una banda del gel de poliacrilamida de aproximadamente 16.6 KDa. Cada señal de péptido observado, se encuentra en rangos de valores de resolución que van desde 1287 a 2028  $m/z$  presentes como  $[M+H]^+$ . Posteriormente se seleccionaron tres picos que presentaron una resolución aceptable, de los espectros reflectrón para análisis de doble masa MS/MS mostrado en la Figura N°7, N°8 y N°9, los espectros correspondientes que denotan la secuencia de aminoácidos GTYDDYVEGLR; ILGNPSADDMANKR y VFDKEGNGTVMGAELR respectivamente.



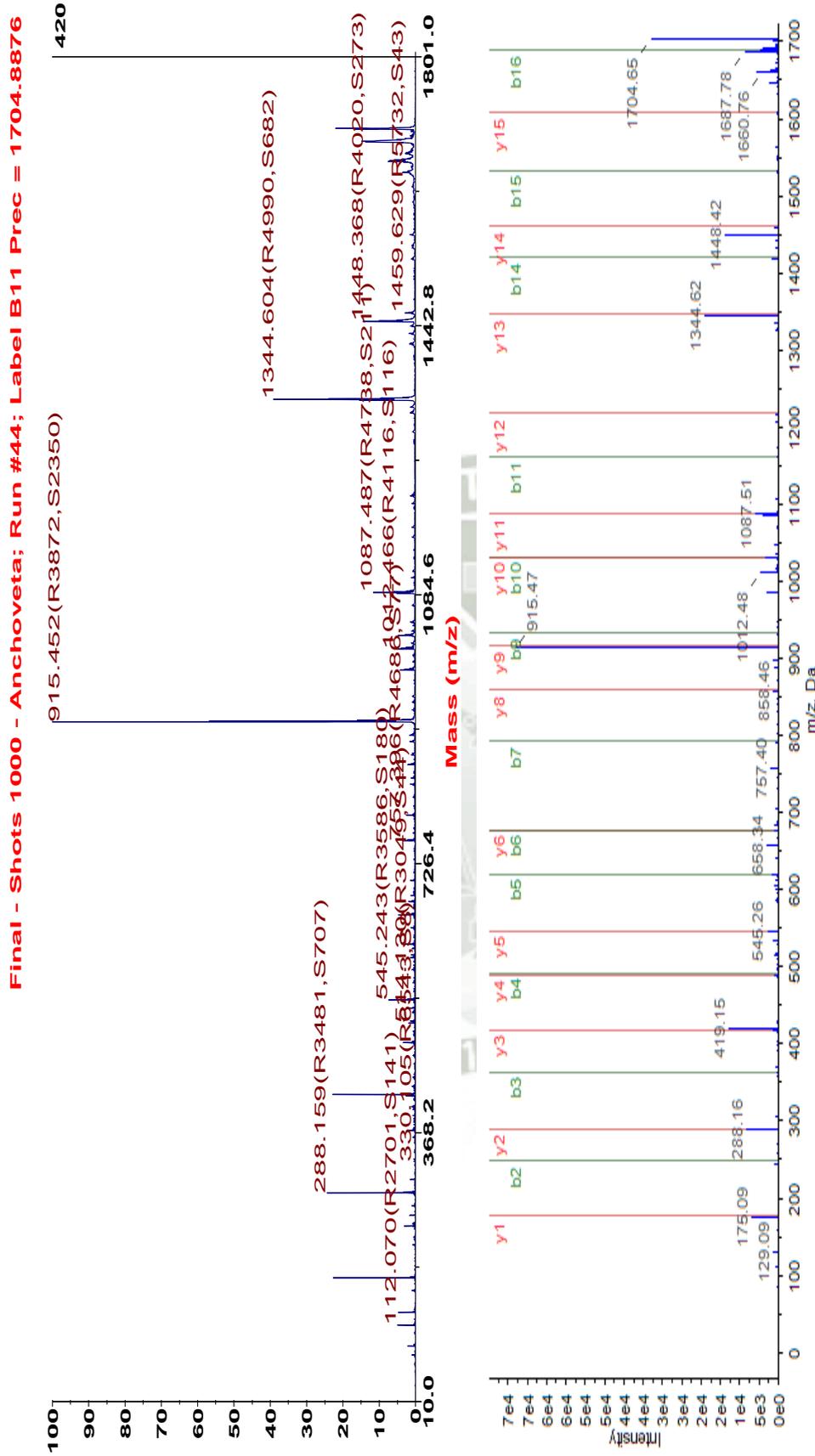
**Figura N° 6.** Espectro de masas MS reflector de péptidos tripticos correspondientes una proteína desconocida obtenida a partir de músculo de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana).



**Figura N°7.** Espectro de masa de fragmentos obtenidos por decaimiento post fuente (MS/MS) de una masa parental de 1287.5955 m/z. La secuencia mostrada GTYDDYVEGLR es reportada por el análisis en el software Protein Pilot.



**Figura N°8:** Espectro de masa de fragmentos obtenidos por decaimiento post fuente (MS/MS) de una masa parental de 1518.7573 m/z. La secuencia mostrada ILGNPSADDMANKR es reportada por el análisis en el software Protein Pilot.



**Figura N°9:** Espectro de masa de fragmentos obtenidos por decaimiento post fuente (MS/MS) de una masa parental de 1719.8876 m/z. La secuencia mostrada VFDKEGNGTVMGAELR es reportada por el análisis en el software Protein Pilot

El análisis informático empleado consiste en comparar datos espectrales experimentales obtenidos en el paso anterior con espectros de masas teóricos originados a partir de digestiones tripticas en sílico de proteínas que se encuentren en la base de datos. Ya que el uso de bases de datos, permitirá no solo la identificación de proteínas de la cual se originó el péptido, sino la secuencia de aminoácidos de los péptidos encontrados en la muestra.

Para la elaboración de la base de datos, se recopiló secuencias proteicas para el orden Clupeiformes de las bases de datos públicas como Uniprot. El análisis se llevó a cabo utilizando el software Protein Pilot (1), el cual emplea el algoritmo Paragon, para la identificación de proteínas posibles a partir de la base de datos y el algoritmo ProGroup, para determinar una lista corta y justificable de proteínas detectadas; de esta forma agiliza la identificación de proteínas, lo que le permite distinguir fácilmente isoformas de proteínas, subconjuntos de proteínas y suprimir los falsos positivos, así como visualizar las asociaciones y relaciones entre proteína-péptido.

El software Protein Pilot (1), además de la opción Paragon/ProGroup tiene la opción Mascot (Según NCBI: Mascot es un software cuyo núcleo o motor de búsqueda utiliza datos de espectrometría de masas para identificar las proteínas a partir de bases de datos de secuencias de péptidos. Mascot utiliza un algoritmo de puntuación probabilístico para la identificación de proteínas que fue adaptado a partir del algoritmo MOWSE (Molecular Weight Search), cuyo núcleo es el sistema de puntuación probabilístico), que permite la identificación y caracterización de proteínas a partir de los datos generados por espectrometría de masa utilizando una selección de secuencias populares de base de datos que están en línea incluyendo el SwissProt, NCBIInr, y las divisiones de EST de EMBL que es ideal para la evaluación y la búsqueda de conjunto de datos.

Empleando la metodología anteriormente expuesta se identificó una de las principales proteínas presentes en el músculo de *Engraulis ringens*. Las más abundantes son las proteínas miofibrilares, de las que se identificó una isoforma de miosina cadena ligera 3, la cual forma parte de la estructura del sarcómero,

correspondiente al músculo esquelético de *Liza ramado*, las secuencias de péptidos encontradas tienen un alto nivel de confianza del 99 % mostrando a continuación la secuencia obtenida por espectrometría MS/MS:

TEFSADQIEDFKEAFGLFDRIGDSQVAFNQVADIMRALGQNPTNKDVTKILG  
NPSADDMANKRLNFDAFLPMLKEVDALPKGTYDDYVEGLRVFDKEGNGTV  
MGAELRIVLSTLGEKMTEPEIDALMAGQEDEGSVHYEAFVKHIMSV

#### 4. Análisis bioinformático:

##### 4.1. Homología y alineamiento para la secuenciación *de novo*:

En la búsqueda de Homólogos con el BLAST (13): <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> - alnHdr\_7994632. En el banco de datos de UniProtKB/Swiss-Prot, RID: GKHCWA8C016, Query ID: lcl|Query\_32891, para la secuencias: ILGNPSADDMANKR, GTYDDYVEGLR, VFDKEGNGTVMGAELR; se encontraron las siguientes secuencias, que presentaron un porcentaje de identidad mayor al 40%, puntuación mayor 50 y un E-value mayor a  $10e^{-10}$ :

##### **P82160.1: Myosin light chain 3, skeletal muscle isoform, [*Liza ramado*]**

**Puntuación de 76.3, Identidad de 69%, E-Value de  $5e^{-18}$**

TEFSADQIEDFKEAFGLFDRIGDSQVAFNQVADIMRALGQNPTNKDVTKILG  
NPSADDMANKRLNFDAFLPMLKEVDALPKGTYDDYVEGLRVFDKEGNGTV  
MGAELRIVLSTLGEKMTEPEIDALMAGQEDEGSVHYEAFVKHIMSV

##### **P82159.1: Myosin light chain 1, skeletal muscle isoform [*Liza ramado*]**

**Puntuación de 65.9, Identidad de 58%, E-Value de  $5e^{-14}$**

MPKAPAKKAEPAPAPAPEPAPAPAAPA VDL SAVKVEFSADQIEDYREAFG  
LFDRVGDNKVAYNQIADIMRALGQNPTNKEVSKLLGNPSADDMTNKRVEFE  
AFLPMLQTIINSPNKAGFEDYVEGLRVFDKEGNGTVMGAELRIVLSTLGEKM  
TEAEIDALMAGQEDENGVVNYEAFVKHIMSV

**P02602.3: Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform [*Oryctolagus cuniculus*]**

**Puntuación de 61.6, Identidad de 53%, E-Value de  $2e^{-12}$**

MAPKKDVKKPAAAAAPAPAPAPAPAPAPAKPKEEKIDLSAIKIEFSKEQQDE  
FKEAFLLYDRTGDSKITLSQVGDVLRALGTNPTNAEVKKVLDGNPSNEEMNA  
KKIEFEQFLPMLQAISNNKDQGTYESDFVEGLRVFDKEGNGTVMGAELRHVL  
ATLGEKMKEEEEVEALMAGQEDSNGCINYEAFVKHIMSI

**P60662.2: Myosin light polypeptide 6 [*Sus scrofa*]**

**Puntuación de 61.2, Identidad de 53%, E-Value de  $2e^{-12}$**

MCDFTEDQTAEFKEAFQLFDRTGDGKILYSQCGDVMRALGQNPTNAEVLKV  
LGNPKSDEMNVKVLDFEHFLPMLQTVAKNKDQGTYESDYVEGLRVFDKEGN  
GTVMGAEIRHVLVTLGEKMTEEEVEMLVAGHEDSNGCINYEAFVRHILSG

**P02604.3: Myosin light chain 1, skeletal muscle isoform [*Gallus gallus*]**

**Puntuación de 61.2, Identidad de 53%, E-Value de  $2e^{-12}$**

MAPKKDVKKPAAAAAPAPAPAPAPAPAPAKPKPAIDLKSIKIEFSKEQQDD  
FKEAFLFDRTGDAKITLSQVGDIVRALGQNPTNAEINKILGNPSKEEMNAK  
KITFEEFLPMLQAAANNKDQGTFFEDFVEGLRVFDKEGNGTVMGAELRHVLA  
TLGEKMTEEEVEELMKGQEDSNGCINYEAFVKHIMSV

**Q64119.3: Myosin light polypeptide 6 [*Rattus norvegicus*]**

**Puntuación de 60.8, Identidad de 53%, E-Value de  $2e^{-12}$**

MCDFTEDQTAEFKEAFQLFDRTGDGKILYSQCGDVMRALGQNPTNAEVLKV  
LGNPKSDEMNVKVLDFEHFLPMLQTVAKNKDQGTYESDYVEGLRVFDKEGN  
GTVMGAEIRHVLVTLGEKMTEEEVEMLVAGHEDSNGCINYEELLRMVLNG

**A0JNJ5.1: Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform [*Bos taurus*]**

**Puntuación de 58.5, Identidad de 53%, E-Value de  $2e^{-11}$**

MAPKKDVKKPAAAAAPAPAPAPAPAPAPAPPKKEEKIDLSAIKIEFSKQQQDEF  
KEAFLFDRTGCKITLSQVGDVLRALGTNPTNAEVKKVLDGNPSNEEMNAK  
KIEFEQFLPMLQAISNNKDQGTYESDFVEGLRVFDKEGNGTVMGAELRHVLA  
TLGEKMKEEEEVEALMAGQEDSNGCINYEAFVKHIMSN



Hablamos de secuencias similares cuando; dos secuencias de proteínas muestran una identidad mayor al 25% (quiere decir más de 25 aminoácidos por cada 100 son homólogos); dentro de esta gama de la identidad, es imposible decir que es verdadera la homología presente en las secuencias encontradas por el BLAST.

La diferencia existente entre Homología, Similitud e Identidad es; que la identidad es una medida hecha en una alineación (cuan idéntica es); similitud es una medida de cuán cerca dos aminoácidos son idénticos; y la homología es una propiedad que existe o no existe, se establece sobre la base de la similitud o identidad medida. Presentar mayor del 40% de identidad, quiere decir que, probablemente tienen la misma estructura

La homología se fundamenta en la presencia de secuencias parecidas, pero el alineamiento utilizando el MegAlign, se fundamenta en la gama de pares y múltiples métodos de alineación, como el Clustal, donde crea fácilmente alineaciones seleccionando rangos más largos para crear bloques ordenados de igual similitud, o para eliminar términos desiguales resultantes de la longitud de los datos de secuencia inconsistente. El MegAlign tiene la propiedad de mostrar una secuencia mayoritaria, o promedio del alineamiento de las secuencias homologas, el cual sirve para realizar la secuenciación *de novo* con interpretación manual.

La secuenciación peptídica *de novo* es la estrategia para identificación de proteínas en organismos que no están secuenciados. Es el proceso por el cual la secuencia de los aminoácidos se deduce sin conocimiento previo de la secuencia de proteínas. Esto difiere de la confirmación de secuencias, donde la secuencia de proteínas ya se conoce y los datos de la secuencia obtenida se usan para confirmar que es correcta.

El objetivo de obtener múltiples secuencias de los péptidos de una proteína mediante MS/MS, al realizar la búsqueda de homología frente a proteínas presentes en bases de datos y deducir por secuenciación *de novo* con interpretación manual, fue; obtener una secuencia de proteína deducida, la cual corresponde a una proteína del músculo esquelético de *Engraulis ringens* siendo una isoforma de miosina de cadena ligera 3:

IEFSADQIEDFKEAFGLFDRTGDGKVALNQVADIMRALGQNPTNKEVLKILG  
NPSADDMANKRLEFEAFPLMLQAVANKPKGTYYDDYVEGLRVFDKEGNGTV  
MGAELRIVLSTLGEKMTEEEIDALMAGQEDEGGVNYEAFVKHIMSV

#### 4.2. Construcción del cDNA en sílico:

A partir de nuestra proteína deducida se construyó su secuencia de cDNA para, hallar su filogenia genética; la traducción inversa de la secuencia de 148 aminoácidos, dio como resultado una secuencia de 444 bases nucleotídicas:

ATTGAATTTAGCGCGGATCAGATTGAAGATTTTAAAGAAGCGTTTGGCCT  
GTTTGATCGCACCGGCGATGGCAAAGTGGCGCTGAACCAGGTGGCGGAT  
ATTATGCGCGCGCTGGGCCAGAACCCGACCAACAAAGAAGTGCTGAAAA  
TTCTGGGCAACCCGAGCGCGGATGATATGGCGAACAAACGCCTGGAATT  
TGAAGCGTTTCTGCCGATGCTGCAGGCGGTGGCGAACAAACCGAAAGGC  
ACCTATGATGATTATGTGGAAGGCCTGCGCGTGTTTGATAAAGAAGGCA  
ACGGCACCGTGATGGGCGCGGAAGTGCATTTGTGCTGAGCACCTGGG  
CGAAAAAATGACCGAAGAAGAAATTGATGCGCTGATGGCGGGCCAGGA  
AGATGAAGGCGGCGTGAAGTGAAGCGTTTGTGAAACATATTATGAGC  
GTG

La búsqueda de homólogos de la secuencia de DNA, con la herramienta bioinformática del BLAST, para hallar su filogenia genética se muestra en la Tabla N°6. (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/ncbiblast/nucleotide.html>)

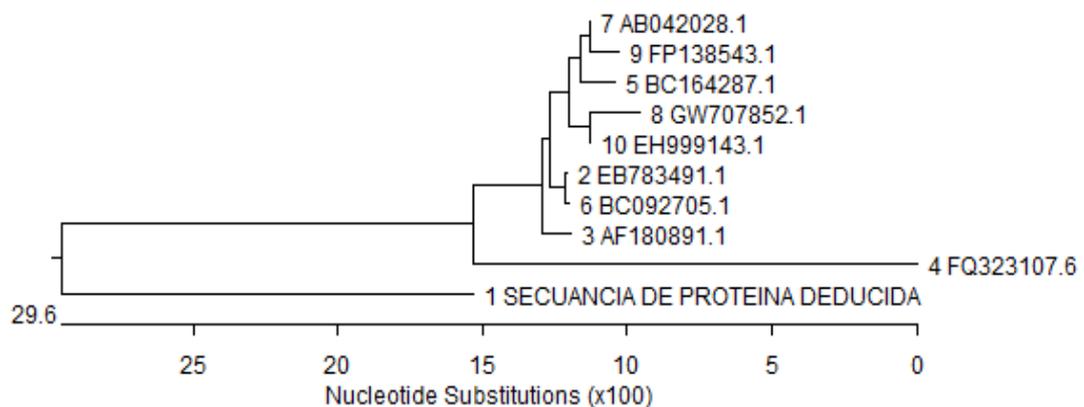
Como podemos observar en la Tabla N°4, la búsqueda de homólogos resultantes, utilizando la herramienta bioinformática BLAST del cDNA, construido a partir de la proteína deducida de *Engraulis ringens*, brinda una lista donde muestra un gran porcentaje de identidad a la secuencia de un cDNA clon de *Danio rerio* (87.2% de identidad), seguido de otra secuencia que pertenece también a *Danio rerio*, siendo esta un polipeptido de miosina de la cadena ligera 3 de movimiento rápido del músculo esquelético (87.1% de identidad), siendo estos dos los más representativos según porcentaje de identidad.

**Tabla N°4:** Homologías de la secuencia de cDNA construido a partir de la proteína deducida de *Engraulis ringens*

DB:ID	Fuente	% Identidad
EB783491	6929293 KZ69 <i>Danio rerio</i> cDNA clone 2688249, mRNA sequence.	87.2
AF180891	<i>Danio rerio</i> fast skeletal muscle myosin light polypeptide 3 (mylz3) mRNA, complete cds.	87.1
FQ323107	Zebrafish DNA sequence from clone CH1073-150G23 in linkage group 1	86.2
BC164287	<i>Danio rerio</i> myosin, light polypeptide 3, skeletal muscle, mRNA (cDNA clone MGC:191462 IMAGE:100059771), complete cds.	86.2
BC092705	<i>Danio rerio</i> myosin, light polypeptide 3, skeletal muscle, mRNA (cDNA clone MGC:109832 IMAGE:7293848), complete cds.	86.2
AB042028	<i>Danio rerio</i> mRNA for fast skeletal myosin light chain 3, partial cds.	86.2
GW707852	dr001_2_F14 Zebrafish 24h stage embryos and adult liver, RZPD609 <i>Danio rerio</i> cDNA, mRNA sequence.	86.2
FP138543	<i>Danio rerio</i> EST, clone ZF_invB65i01 5'	86.2
EH999143	AGENCOURT_97638547 NIH_ZGC_7 <i>Danio rerio</i> cDNA clone IMAGE: 9003538 5', mRNA sequence.	86.2

Dada la homología expresa en *Danio rerio* (Pez Cebra o ZebraFish), pez de uso frecuente para investigación científica por presentar gran homología genética con el hombre (>80% del genoma). (16) Por esta razón casi todo su genoma está presente

en los bancos de Datos, lo que nos permite encontrar una homología con nuestro cDNA, específico con el polipeptido de miosina de cadena ligera 3, de movimiento rápido del músculo esquelético de *Danio rerio*, muy importante en la contracción muscular en la movilización de esta especie. En la Figura N°11, se muestra la filogenia genética, representada en un árbol filogenético de las secuencias homologas a nuestro cDNA construido de la proteína de *Engraulis ringens*.

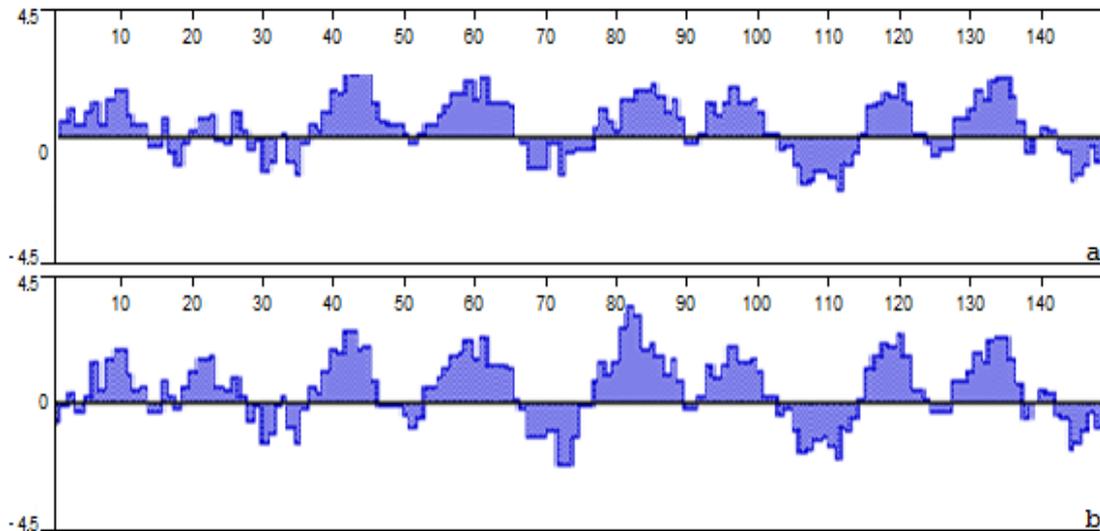


**Figura N°11:** Árbol filogenético de las homologías secuenciales a la secuencia de cDNA construido de la proteína deducida. Donde muestra la filogenia de nuestra secuencia nucleotídica del músculo de *Engraulis ringens* (1), con el polipeptido de miosina de cadena ligera 3 (AF180891), de movimiento rápido del músculo esquelético de *Danio rerio*.

### 4.3. Características estructurales:

#### 4.3.1. Perfil hidropático:

La estructura primaria de una proteína, es la propia secuencia de aminoácidos a lo largo de la cadena polipeptídica, siendo específica para cada proteína. La importancia del perfil hidropático brinda la hidrofobicidad de una secuencia proteica; indicando las posibilidades en la que quedan orientados los residuos hidrofóbicos de los aminoácidos de dicha secuencia, en su plegamiento hacia el interior en contacto con sus semejantes y alejados del agua.



**Figura N°12:** Perfil hidropático según Kyte-Doolittle de la secuencia de aminoácidos. **a.** Proteína homóloga con alto índice de identidad (isoforma de la cadena ligera 3 de la miosina de *Liza ramado*). **b.** Proteína deducida (isoforma de la cadena ligera 3 de la miosina de *Engraulis ringens*),

El perfil hidropático resultante mostrado en la Figura N°12, brinda el análisis del grado de hidrofobicidad de la secuencia de aminoácidos de nuestra proteína deducida, con ella podemos caracterizar o identificar la posible estructura. Los resultados son mostrados en forma de gráficas donde el eje de las abcisas designa la posición de los aminoácidos y el de las ordenadas la puntuación (Score) asignada para cada tipo de aminoácido, reflejando en este caso su carácter hidrofóbico basadas en la escala de Kyte-Doolittle indicando aminoácidos hidrófobos (en la figura orientados  $\uparrow$ ) dando la posibilidad de la formación  $\alpha$ -hélice de la estructura tridimensional de la proteína. (46)

#### 4.4. Estructura tridimensional deducida:

La estructura secundaria de una proteína describe la estructura tridimensional formada por segmentos de la cadena polipeptídica. Dentro de esta, dos conformaciones son particularmente estables; el enrollamiento de la cadena alrededor de un eje y la interacción lateral de segmentos de una cadena polipeptídica o de cadenas diferentes.

Estas conformaciones son denominadas, respectivamente  $\alpha$ -hélice y la forma  $\beta$ -plegada, porque fueron descubiertas en este orden. La extensión de trecho de la cadena polipeptídica que se organiza en esas dos configuraciones, puede variar de algunas a decenas de aminoácidos, de acuerdo a la proteína. La  $\alpha$ -hélice y la forma  $\beta$ -plegada se estabilizan por puentes de hidrogeno entre un nitrógeno y un oxígeno de los grupos  $-\text{NH}$  y  $-\text{C}=\text{O}$ , constituyentes de las unidades peptídicas, aunque el puente de hidrogeno sea una ligación débil, un elevado número de estas ligaciones confiere gran estabilidad a esas estructuras.

El uso de la herramienta bioinformática Swiss-Model, es la que nos permite obtener y construir modelos 3-D de una determinada proteína por homología, basados en estructuras ya conocidas de otras proteínas. (82) Donde se buscó el diseño 3-D de la proteína homóloga con alto porcentaje de identidad a la isoforma de miosina, de cadena ligera 3 del músculo esquelético de *Liza ramado*, proveniente de un grupo de miosinas que pertenecen al conjunto de proteínas intrínsecas en la contracción isométrica en el vuelo de insectos (2W4G.1). Siendo sus componentes:

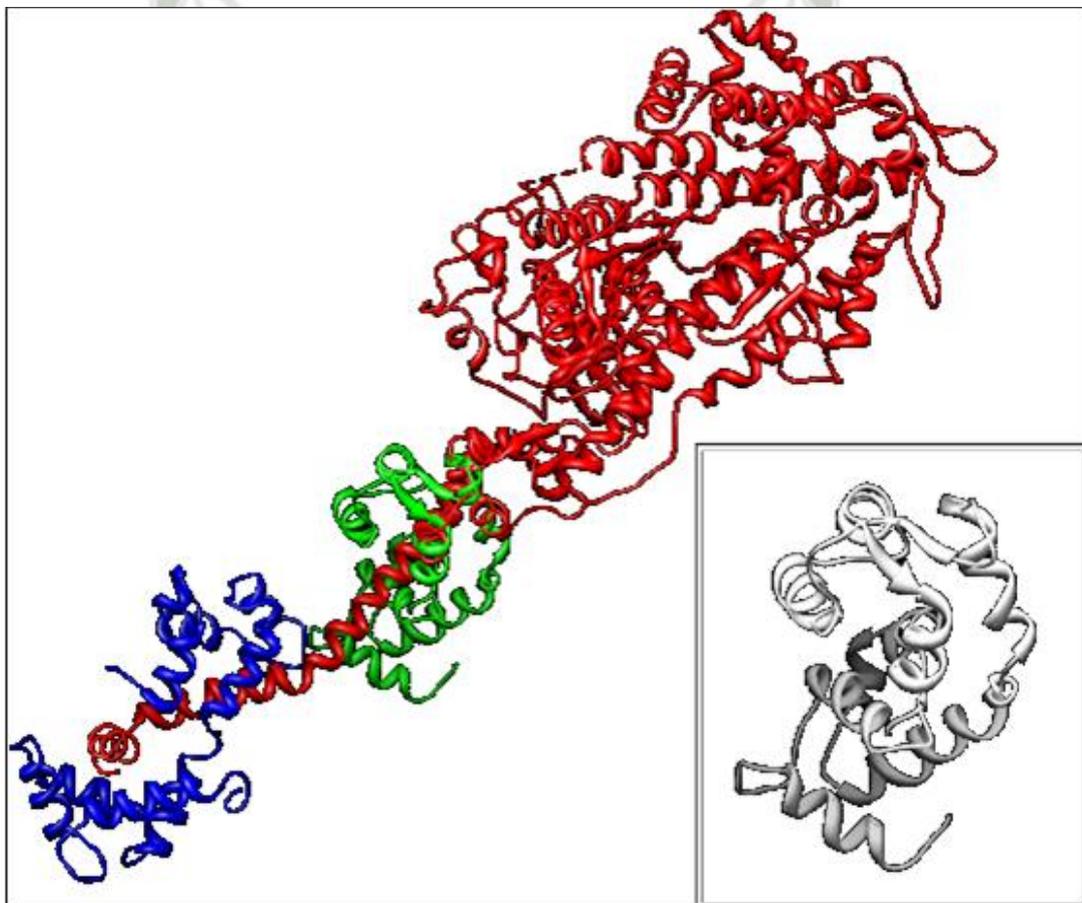
- Isoforma de miosina reguladora, de cadena ligera 2, del músculo esquelético: Cadena A (2w4g.1.A)
- Isoforma de miosina, de cadena ligera 3, del músculo esquelético: Cadena B (2w4g.1.B)
- Miosina de cadena pesada del músculo esquelético de adultos: Cadena C (2w4g.1.C)

En la Figura N°13 se muestra al conjunto de proteínas intrínsecas en la contracción isométrica en el vuelo de insectos, proyectada en formato PDB (archivo Protein Data Bank) en el software Chimera, que nos permite separar las distintas cadenas que forman parte de este grupo de proteínas, y se resalta la proteína homóloga.

Swiss-Model es un servidor web bioinformático de estructuras, dedicado al modelado de estructuras 3D de proteínas, basado en una homología de estructura para generar modelos tridimensionales fiables de la proteína. Los métodos de

homología comparativa del modelado, hacen uso de estructuras de proteínas conocida y modelado 3-D, presentes en los bancos de datos para construir modelos de proteínas por homología.

Swiss-Model consta de tres componentes estrechamente integrados: el conducto Swiss-Model; es un conjunto de herramientas de software y bases de datos para el modelado automatizado de estructuras proteicas, el espacio de trabajo Swiss-Model; basado en la web de trabajo gráfico del usuario y, el repositorio Swiss-Model una base de datos continuamente actualizada de modelos de homología para un conjunto de proteoma, modelo de gran interés biomédico.



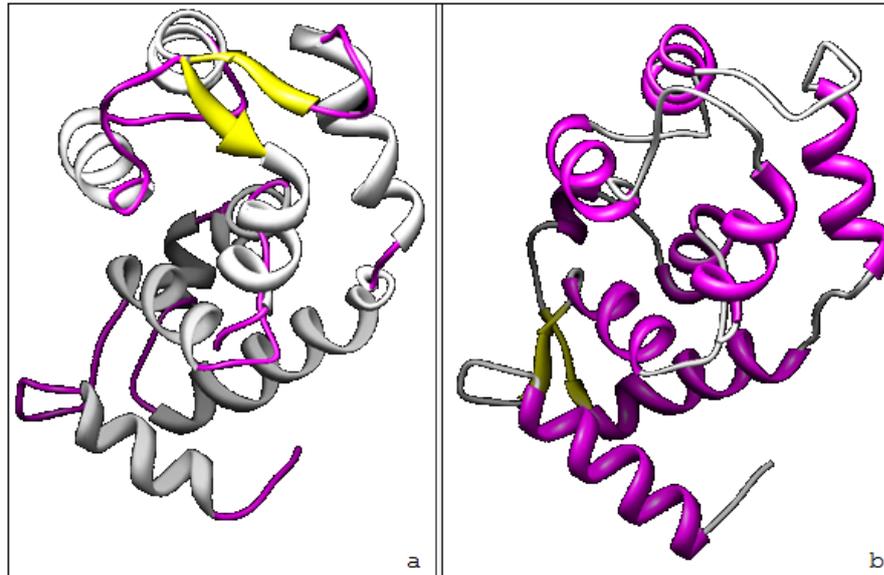
**Figura N°13:** Grupo de miosinas que pertenecen al conjunto de proteínas intrínsecas en la contracción isométrica en el vuelo de insectos. En azul (Cadena A) se muestra la isoforma de miosina reguladora, de cadena ligera 2 del músculo esquelético; en rojo (Cadena C) la miosina de cadena pesada del músculo esquelético de adultos y en verde (Cadena B) la isoforma de miosina de cadena ligera 3 del músculo esquelético, el cual se proyectó para una mejor visualización.

El conducto Swiss-Model para la deducción de la estructura 3-D de nuestra proteína deducida de *Engraulis ringens*, comprendió cuatro pasos principales que están implicados en la construcción de un modelo proteico de homología de una estructura determinada:

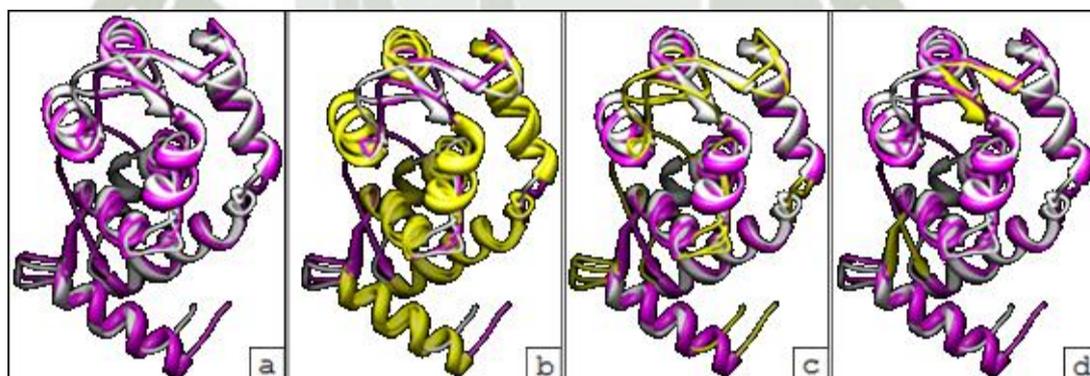
- Primero la identificación de la plantilla estructural; el BLAST fue usado para obtener secuencias homólogas, como no se encontró una plantilla adecuada, HHsearch fue utilizado para la detección de secuencias relacionadas de forma remota.
- Segundo, una alineación de la secuencia diana y la proteína deducida de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana).
- Tercero, la construcción de los diferentes modelos.
- Y por último la evaluación de la calidad del modelo mediante tres métodos independientes (QMEAN4, ANOLEA, GROMOS).

El uso de Swiss-Model, permitió obtener y construir un modelo 3-D de nuestra proteína deducida, brindando tres modelos, de los cuales se escogió el que obtiene mayor QMEAN, donde el diseño se basó en una isoforma de miosina de cadena ligera 1, de contracción lenta del músculo (1W7I.1.B), con el valor de QMEAN4 aceptable de -2.84 (mayor a los otros modelos), que permite evaluar nuestro modelo según su calidad de diseño, una cobertura alta y un porcentaje de identidad de 61.9%.

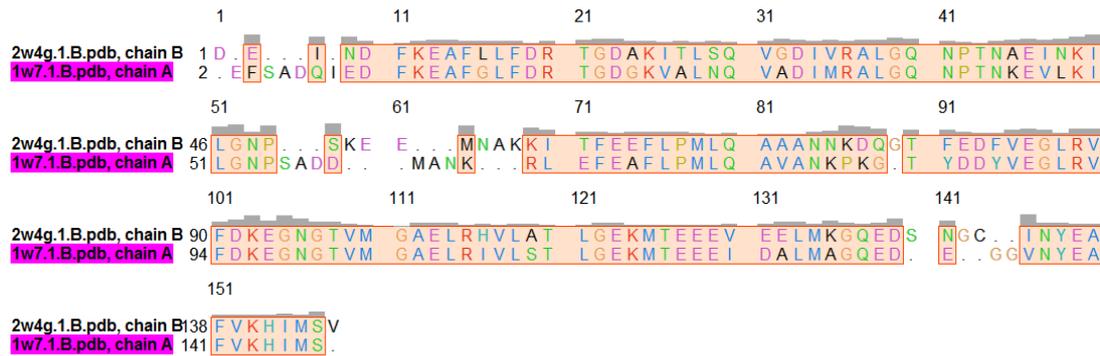
En la Figura N°14 se muestra la construcción y diseño de la proteína homóloga, secuencia perteneciente a la isoforma de miosina de cadena ligera 3 del músculo esquelético de *Liza ramado* y nuestra proteína de secuencia deducida de perteneciente a la isoforma de miosina de cadena ligera 3 del músculo esquelético de *Engraulis ringens*. La figura N°15 ilustra la sobreposición de estructuras y alineamientos estructurales. Según UCSF Chimera y la figura N°16 muestra el alineamiento estructural de la sobreposición de estructuras, de la proteína muscular de *Engraulis ringens* con la proteína homóloga del músculo de *Liza ramado*.



**Figura N°14:** **a.** Proteína homóloga, secuencia perteneciente a la isoforma de miosina de cadena ligera 3 del músculo esquelético de *Liza ramado*, basada en la isoforma de miosina de cadena ligera 3 del músculo esquelético en la contracción rápida; **b.** Proteína de secuencia deducida perteneciente a la isoforma de miosina de cadena ligera 3 del músculo esquelético de *Engraulis ringens* basada en isoforma de miosina de cadena ligera 1, de contracción lenta de músculo.



**Figura N°15:** Sobreposición de estructuras, según UCSF Chimera para la proteína deducida y la proteína con mayor homología. **a.** Sobreposición de estructuras; **b.** Sobreposición de estructuras resaltando los modelos estructurales  $\alpha$ -hélice; **c.** Sobreposición de estructuras resaltando los modelos de desdoblamiento estructurales; **d.** Sobreposición de estructuras resaltando los modelos estructurales  $\beta$ -plegado.



**Figura N°16:** Muestra el alineamiento estructural de la sobreposición de estructuras. Según UCSF Chimera para la proteína homóloga, perteneciente a la isoforma de miosina de cadena ligera 3 del músculo esquelético de *Liza ramado* basada en la isoforma de miosina de cadena ligera 3 del músculo esquelético de contracción rápida (2W4G.1.B) y la proteína deducida perteneciente a la isoforma de miosina de cadena ligera 3 del músculo esquelético de *Engraulis ringens* basada en isoforma de miosina de cadena ligera 1, de contracción lenta de músculo (1W7.1.B).

Con la ayuda del software de la UCSF Chimera, se detectó relaciones estructurales entre las proteínas y permitió establecer estas relaciones para la clasificación de la proteína deducida del músculo de *Engraulis ringens*. La superposición estructural resultante de proteínas mostró la no correspondencia entre las estructuras  $\beta$ -plegadas de la secuencia, comparada con la proteína homóloga de *Liza ramado*, en el no alineamiento de las de las proteínas sobre posicionadas.

Esta metodología puede ser utilizada para detectar los elementos claves de interacción de las proteínas, localizando las zonas que muestren diferencia estructural. Este software puede ser utilizado para detectar la diferencia de posibles funciones de distintas regiones de las proteínas; los análisis secuenciales empleados para tal fin pueden ser complementarios y no son capaces de establecer ninguna relación entre dominios cuando la homología secuencial es baja. A partir de la detección de regiones con equivalencia estructural entre proteínas, se puede inferir sobre las diferentes funciones de las mismas. También es posible detectar regiones en proteínas que presenten la misma estructura que muestra ese péptido, desde el punto de vista estructural, de una proteína.

La capacidad de autoenfoco del software permite el análisis completo de la proteína, detectándose fácilmente las regiones con similitudes estructurales comunes a las dos proteínas, como son los modelos estructurales  $\alpha$ -hélice, que en ambas proteínas son muy similares, en cambio las estructuras  $\beta$ -plegadas se encuentran en diferente posición, el mismo resultado nos brinda el alineamiento ya que en esas zonas, este no coincide. Ambas proteínas por índice de identidad, son isoformas de la miosina de cadena ligera 3, la proteína homóloga de *Liza ramado* es de contracción rápida y la proteína deducida de *Engraulis ringens* es de contracción lenta, por la pequeña diferencia en la posición de las estructuras  $\beta$ -plegadas.

#### **4.5. Análisis de la proteína deducida del músculo de *Engraulis ringens* en el contenido de aminoácidos y búsqueda de péptidos encriptados con actividad biológica.**

Los aminoácidos conocidos (20 aminoácidos) tienen igual importancia, pero desde el punto de vista nutricional, por la velocidad con que se sintetizan o no en el organismo, por la cantidad de ellos que se necesita para el cumplimiento de las funciones fundamentales en la formación de tejidos y de sustancia básicas; se les clasifica como esenciales y no esenciales. Los aminoácidos esenciales son los que deben ser provistos por la dieta diaria, porque el organismo no los sintetiza, o la velocidad de su síntesis es muy lenta, si se le compara con la velocidad con que este lo necesita. Y los no esenciales como ya conocemos son sintetizados por el organismo.

La proteína deducida y la proteína homóloga fueron utilizadas para el análisis del contenido de aminoácidos, por lo que en la tabla N° 7 se muestra la composición de aminoácidos de las isoformas de miosina de Cadena Ligera 3 del músculo.

Los resultados mostrados en la tabla N°7, muestran la comparación en el contenido de aminoácidos de las proteínas pertenecientes a la isoforma de miosina de cadena ligera 3, donde, los aminoácidos esenciales que se encuentran en mayor cantidad para la proteína de *Engraulis ringens* son lisina y leucina; para *Liza ramado* son

fenilalanina, histidina y treonina; siendo isoleucina, metionina, arginina y valina las que se encuentran en similares proporciones. Con los resultados expresados podríamos deducir que *Liza ramado* es una buena alternativa para consumir, pero cabe resaltar que solo se está comparando un isoforma de miosina de cadena ligera 3 y no todas las proteínas presentes en el musculo de dicho individuo.

Cuando un alimento contiene proteínas con todos los aminoácidos esenciales, se dice que son de alta o de buena calidad. (28) En la tabla N°8 se muestra las cantidades de aminoácidos esenciales presentes en distintas variedades de peces. Por ejemplo en esta tabla *Pampus punctatissimus* sería un pez óptimo para el consumo ya que contiene todos los aminoácidos esenciales y en contraste de las otras proteínas contiene en mayor cantidad isoleucina, lisina, valina y triptófano.

Con la independencia del papel de los aminoácidos como elementos estructurales de las proteínas y péptidos, algunos aminoácidos regulan vías metabólicas claves, necesarias para el crecimiento, el desarrollo, la reproducción y la inmunidad. A estos aminoácidos se los denomina funcionales. La suplementación dietética con uno o más de estos aminoácidos puede ser beneficiosa para mejorar determinados problemas de salud en varios estadios de la vida. (30)

Especialistas en nutrición humana, ciencia y tecnología de alimentos, entre otros, investigan activamente esta nueva área y se encuentran formulando nuevos productos que permitan un futuro más saludable para la humanidad. Los alimentos funcionales, los productos alimentarios y los suplementos, representan una gran oportunidad para el desarrollo de nuevos productos que proveen un posible beneficio fisiológico en el control o la prevención de ciertas enfermedades. Por esta razón, el estudio del contenido de aminoácidos esenciales en diferentes alimentos y las investigaciones realizadas para el incrementos de dichos aminoácidos, está siendo una tendencia mundial y se ha dirigido hacia la introducción de los llamados productos Nutraceuticos, los cuales se definen como sustancias químicas o biológicas que pueden encontrarse como componentes naturales de los alimentos o adicionarse a los

mismos y que resultan especialmente beneficiosas, tanto en la prevención de ciertas enfermedades como en la mejora de las funciones fisiológicas del organismo. (61)

**Tabla N° 5:** Análisis de la composición de aminoácidos de las isoformas de miosina de cadena ligera 3 de *Engraulis ringens* y *Liza ramado*

Aminoácido	<i>Engraulis ringens</i>		<i>Liza ramado</i>	
	Cantidad	% por Frecuencia	Cantida d	% por Frecuencia
Alanina, Ala, A	14	9.46	13	8.78
Cisteína, Cys, C	0	0.00	0	0.00
Ácido Aspártico, Asp, D	12	8.11	15	10.14
Ácido Glutámico, Glu, E	16	10.81	13	8.78
<b>Fenilalanina, Phe, F*</b>	8	<b>5.41</b>	9	<b>6.08</b>
Glicina, Gly, G	14	9.46	12	8.11
<b>Histidina, His, H*</b>	1	<b>0.68</b>	2	<b>1.35</b>
<b>Isoleucina, Ile, I*</b>	7	<b>4.73</b>	7	<b>4.73</b>
<b>Lisina, Lys, K*</b>	10	<b>6.76</b>	9	<b>6.08</b>
<b>Leucina, Leu, L*</b>	13	<b>8.78</b>	12	<b>8.11</b>
<b>Metionina, Met, M*</b>	7	<b>4.73</b>	7	<b>4.73</b>
Asparagina, Asn, N	8	5.41	7	4.73
Prolina, Pro, P	4	2.70	5	3.38
Glutamina, Gln, Q	5	3.38	5	3.38
<b>Arginina, Arg, R*</b>	5	<b>3.38</b>	5	<b>3.38</b>
Serina, Ser, S	4	2.70	6	4.05
<b>Treonina, Thr, T*</b>	6	<b>4.05</b>	7	<b>4.73</b>
<b>Valina, Val, V*</b>	11	<b>7.43</b>	11	<b>7.43</b>
<b>Triptófano, Trp, W*</b>	0	<b>0.00</b>	0	<b>0.00</b>
Tirosina, Tyr, Y	3	2.03	3	2.03

\*aminoácidos esenciales

La inclusión del pescado en las dietas, durante muchos años, ha sido considerada como una fuente de proteína de alta calidad, que se utiliza como estándar de oro en la evaluación de las fuentes de proteínas alternativas. (57) Por esta razón, el tratamiento de proteínas de pescado con ácidos y enzimas, cambiará el contenido

debido a la hidrólisis a fragmentos más pequeños, como péptidos y aminoácidos libres. La digestión y absorción de la proporción de péptidos cortos y aminoácidos libres pueden afectar la digestión global del producto, debido a que los péptidos se digieren y se absorben más rápidamente en comparación con la proteína intacta. (31) Los hidrolizados de proteína se componen de aminoácidos libres y péptidos de cadena corta que presentan muchas ventajas como nutraceúticos o alimentos funcionales, debido a su perfil de aminoácidos. La composición de aminoácidos de cualquiera de las proteínas de los alimentos, tiene un papel importante en diversas actividades fisiológicas del cuerpo humano y afecta directa o indirectamente en el mantenimiento de una buena salud. (17)

Los aminoácidos son esenciales para la síntesis de una amplia variedad de proteínas con funciones importantes, incluyendo portadores de oxígeno, vitaminas, CO<sub>2</sub>, enzimas y proteínas estructurales. La composición de aminoácidos de los hidrolizados de proteínas de pescado es importante porque el valor nutritivo influye en las propiedades funcionales. (73) El interés del consumidor y de la población en general, por obtener dietas óptimas para mantener una buena salud y prolongar los años de vida, ha propiciado el aumento del mercado de los alimentos naturales, en el que este tipo de productos tiene prioridad. El propósito de esta revisión es destacar la oportunidad y necesidad que representa el desarrollo de nuevos productos naturales, para mejorar el valor nutritivo de los alimentos, lograr dietas balanceadas y proveer beneficios fisiológicos para el control o la prevención de ciertas enfermedades.

Es por esta razón que los hidrolizados proteicos y la búsqueda de optimizar las propiedades nutraceúticas en este tipo de alimentos se basa exclusivamente en el enriquecimiento de aminoácidos esenciales y la búsqueda de péptidos con actividad biológica. Por lo que, adicionalmente al contenido de aminoácidos presentes en nuestra proteína, se realizó la búsqueda de péptidos encriptados con actividad biológica en la secuencia. Para ello se empleó el sitio web BioPep, donde en la tabla N°9 se muestra el reporte del análisis de algunos péptidos con actividad biológica encriptados en la proteína deducida del músculo de *Engraulis ringens*.

**Tabla N°6:** Composición porcentual de Aminoácidos en diferentes especies de Pescado

Aminoácidos Esenciales	% de Aminoácidos			
	<i>Selaroides leptolepis</i> <sup>a</sup>	<i>Stolephorus sp</i> <sup>b</sup>	<i>Coryphaena hippurus</i> <sup>c</sup>	<i>Pampus punctatissimus</i> <sup>d</sup>
<b>Fenilalanina, Phe, F*</b>	3.08	<b>5.69</b>	4.62	5.10
<b>Histidina, His, H*</b>	<b>5.49</b>	3.00	4.31	2.39
<b>Isoleucina, Ile, I*</b>	4.31	4.98	5.23	<b>5.29</b>
<b>Lisina, Lys, K*</b>	8.45	8.88	7.55	<b>9.89</b>
<b>Leucina, Leu, L*</b>	6.72	7.92	7.18	9.16
<b>Metionina, Met, M*</b>	1.76	<b>3.56</b>	3.36	2.79
<b>Arginina, Arg, R*</b>	2.64	6.25	<b>8.08</b>	6.65
<b>Treonina, Thr, T*</b>	2.92	4.98	<b>5.19</b>	4.81
<b>Valina, Val, V*</b>	2.77	5.79	5.45	<b>6.16</b>
<b>Triptófano, Trp, W*</b>	0.00	0.00	0.80	<b>1.99</b>

<sup>a</sup>*Selaroides leptolepis* (Yellow Stripe Trevally- Jurel de Raya Amarilla, encontrado en Oceanía y las costas de la India) (44)

<sup>b</sup>*Stolephorus sp* (Anchovy- Anchoveta India, Pez encontrado en las costas de la india)( 3)

<sup>c</sup>*Coryphaena hippurus* (Dolphin Fish - Mahi-mahi, pez encontrado cerca y en casi toda la línea ecuatorial, con mayores proporciones en Centro America, Australia y este de Africa ) (58)

<sup>d</sup>*Pampus punctatissimus*(Palometa o Jajuta; pez del Atlántico o de la India muy pocas veces en el Pacífico (90)

**Tabla N°7:** Péptidos encriptados con actividad biológica de la Secuencia deducida de la proteína de *Engraulis ringens*:

<b>Nombre del Péptido</b>	<b>Actividad</b>	<b>Secuencia</b>
Péptido Antioxidante	Antioxidante	EL, LK, KP, TY
Estimulante de la Liberación de Sustancias Vaso activa	Estimulante	EEE, EE
Péptido estimulante de la Captación de Glucosa	Estimulante	VL, IV, IL
Inhibidor de la Renina	Hipotensor	EF
Inhibidor Neuropeptido	Inhibidor	GQ
Inhibidor de CaMPDE	Inhibidor	EF
Beta-Lactokinin	Inhibidor de ACE	RL,
Inhibidor de ACE	Inhibidor de ACE	RL, VF, KR, RA, GA, AG, KG, FG, DA, GV, MG, GK, GE, GG, GD, TG, NG, EI, EV, EV, TE, LQ, LN, PT, EK, AF, LG, EG, EA, KE, GL, GQ, GT, IE
Inhibidor de ACE (Bovino beta-Lg)	Inhibidor de ACE	LF
Inhibidor de ACE (Alforfón)	Inhibidor de ACE	VK
Inhibidor de ACE (Soja)	Inhibidor de ACE	DG
Inhibidor de ACE (Ajo)	Inhibidor de ACE	NY
Inhibidor de ACE (Wakame)	Inhibidor de ACE	NK
Inhibidor de ACE (Anchoveta y Bonito)	Inhibidor de ACE	KP
Inhibidor de ACE (Haba de Soja)	Inhibidor de ACE	LEF

Inhibidor de la Dipeptidil Peptidasa IV (Inhibidor de DPP IV)	Inhibidor de la Dipeptidil Peptidasa IV	VA, AL, MA, GQ, NP, GL, LP, KP, GA, RA, FL, EK
Alpha-lactorphin	Opioide	GLF
Péptido Regulador del Mecanismo Fosfoinositol	Regulación	GLF
Péptido Regulador del Flujo de Iones	Regulación	DY

En el estudio, según el reporte, observamos que la actividad biológica encriptada en la proteína deducida proveniente del músculo *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana), existen péptidos con funciones o propiedades antioxidantes, estimulante, hipotensor, ACE inhibidor, opioide y regulador. Estas moléculas bioactivas de *Engraulis ringens* son péptidos de dos a tres aminoácidos encriptados en su totalidad. Es decir, es posible explorar las secuencias de las proteínas estructurales de *Engraulis ringens* que podrían darnos valiosas informaciones que sirvan de plataforma biotecnológica para el establecimiento de un banco de datos de péptidos con actividad biológica presentes en el músculo esquelético.

Por otra parte, la hidrólisis realizada al consumir alimentos de diferentes fuentes proteicas, específicamente de *Engraulis ringens*, genera la aparición de péptidos y aminoácidos libres; algunos péptidos con actividad biológica, definidos como, fragmentos proteicos que tienen un impacto en la regulación metabólica, en las funciones o en las condiciones corporales, promoviendo la salud y reduciendo así el riesgo de enfermarse. (42,76)

Entre los efectos reportados que pueden tener estos péptidos bioactivos en el humano se encuentran: la actividad antihipertensiva, antioxidante, antitrombótica e hipercolesterolémica en el sistema cardiovascular; la actividad antagonista o agonista opioide en el sistema nervioso; antimicrobiano en el sistema gastrointestinal; inmunomodulatorio y antimicrobiano, en el sistema inmunológico (45). Estas

características hacen por demás interesante la generación y estudio de este tipo de péptidos. Los péptidos bioactivos pueden estar presentes en alimentos como componentes naturales o ser producidos después de la hidrólisis enzimática. (69)

Recientemente, hay mucha atención por los consumidores a los compuestos bioactivos naturales como ingredientes funcionales. Por tanto, se puede sugerir que las proteínas y péptidos con actividad biológica de los alimentos de origen marino, son fuente alternativa de ingredientes que pueden contribuir al bienestar de los consumidores, como parte de los alimentos funcionales, productos farmacéuticos y/o cosméticos. Además nos da una visión general del desarrollo de estos sobre efectos en la salud, perspectivas industriales y tendencias comerciales de proteínas y péptidos con actividad biológica de origen marino. (70)

Estudios muestran que un heptapéptido, péptido eliminador de radicales derivado del mejillón marino azul (*Mytilus edulis*), con un peso molecular de 962 KDa. Es altamente efectivo en la eliminación de radicales, este péptido podría eliminar radicales superóxido, hidroxilo y 1,1-difenil-2-picrilhidracilo (DPPH) hasta un 98% en una concentración de 200 µg/mL. Adicionalmente, este péptido exhibe una fuerte inhibición de la peroxidación de lípidos, también exhibe una elevada actividad quelante a Fe<sup>2+</sup>. Estos resultados lo identifican como un potente antioxidante natural, que realiza su actividad vía diferentes mecanismos de acción. (66)

Recientemente se han reportado péptidos antioxidantes, aislados de pepinos de mar (*Penaeus japonicus*) (81). También se ha reportado actividad antioxidante en péptidos de gelatina de pescado. Los péptidos derivados del hidrolizado trípico de la gelatina de piel de corvina (*Johnius belengerii*) exhiben significativa actividad eliminadora de radicales superóxido (DPPH). Se encontró que la secuencia péptidica HGPLGPL (797 Da) actúa como fuerte eliminador de radicales. (52). En otro estudio, la gelatina del Abadejo de Alaska, que fue hidrolizada con pronasa estaba compuesto de péptidos de 1.5 a 4.5 KDa y mostró alta actividad antioxidante. (40)

La enzima convertidora de angiotensina I (ACE, siglas en inglés) es una exopeptidasa, que juega un papel fundamental en la homeostasis de la presión sanguínea, así como en el balance de fluidos y sales en los mamíferos. ACE, rompe los dipéptidos del C-terminal de varios sustratos péptidos, divide a la angiotensina I en un potente octapéptido vasoconstrictor. Los inhibidores de ACE son por lo tanto compuestos hipotensores, ampliamente utilizados para el tratamiento de la presión arterial elevada.

Los péptidos inhibidores de ACE han sido ampliamente estudiados y son reconocidos como nutracéuticos hipotensores. Los péptidos inhibidores de ACE están raramente presentes como tales en los alimentos; deben ser liberados de la proteína madre, de preferencia por hidrólisis enzimática controlada. Se han encontrado varios inhibidores de ACE en los hidrolizados enzimáticos de las proteínas alimenticias. Péptidos en el rango de los 2 a 30 aminoácidos, que inhiben a la ACE, han sido producidos por la hidrólisis enzimática. (65)

La bibliografía cita que la protamina, proteína extraída del líquido seminal de pescado, ha mostrado actividad antimicrobiana contra un rango de bacterias Gram negativo y Gram positivo, levaduras y hongos. (36,39) Se cree que este péptido de 30 aminoácidos interrumpe la membrana citoplásmica; en estudios recientes, este péptido fue evaluado por su eficacia contra *L. monocytogenes* y *Escherichia coli*, mostrando mejor actividad contra bacterias Gram negativas, particularmente a valores de pH alcalino. También se ha reportado la actividad antimicrobiana de histonas de los hemocitos del camarón blanco del pacífico (*Litopenaeus vannamei*) (60), así como proteínas antibacterianas presentes en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (79) y el pez roca (*Sebastes schlegeli*) (56).

Con todo lo reportado y hasta aquí abordado el empleo de la plataforma proteómica; en los estudios bioinformáticos, siendo un estudio inicial, la obtención de secuencias por espectrometría de masa por MALDI ToF/ToF, nos muestra la secuencia de tres péptidos que al usar el motor de búsqueda del software Protein Pilot, brinda la

identidad de las tres secuencias analizadas, deduciendo que estas secuencias forman parte de una isoforma de miosina del músculo esquelético, de cadena ligera 3.

Esta información, por si sola ya es valiosa, en razón de que nos permiten establecer la identidad de la familia de proteínas a la que pertenece; no obstante, el trabajo de la homología secuencial por el análisis bioinformático utilizando la herramienta BLAST, permitió deducir la secuencia total de la proteína de *Engraulis ringens* al someterlo a un secuenciamiento *de novo*; a esta proteína deducida se hizo el análisis de su perfil hidropático, que permitió ver la posible distribución y la contribución de cada uno de los aminoácidos a lo largo de la cadena polipeptídica para el modelamiento de su estructura; su respectiva identificación y comparación con la proteína homóloga que tubo alto porcentaje de identidad. El estudio de las secuencias completas, de su estructura 3-D contribuyo enormemente en el análisis estructural para determinar la diferencia en la sobreposición y una posible función intrínseca de la proteína. Por último se realizó un análisis en la composición de aminoácidos esenciales y la búsqueda de péptidos con actividad biológica encriptados a lo largo de la secuencia de la proteína deducida de *Engraulis ringens*.

Podemos finalmente dar a conocer que resulta de vital importancia centrar estudios de los aminoácidos libres y secuencias encriptadas; que nos mostrarán valiosa información con proyecciones de uso biotecnológico para la industria nutraceútica, farmacéutica, entre otras. Hasta aquí una pequeña contribución en el estudio proteómico del músculo de *Engraulis ringens*. Para una mayor información, se requiere investigación adicional en el área de aminoácidos esenciales y los péptidos marinos, exclusivamente en *Engraulis ringens*, incluyendo la detección de actividades biológicas potenciales, el desarrollo de nuevas técnicas para su aislamiento y purificación (como es la hidrolisis enzimática de esta proteína), adicionalmente estudios en su interacción con otros componentes del alimento y evaluación de su seguridad y biodisponibilidad. En el futuro, esta comparación contribuirá enormemente en la búsqueda de secuencias inéditas con posibles funciones biológicas de valiosa importancia.

## CAPITULO IV CONCLUSIONES

- I. El estudio realizado por espectrometría de masas, identifica que, la proteína estudiada es una isoforma de miosina de cadena ligera 3 del músculo esquelético de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana).
- II. El análisis de la secuencia deducida a través de herramientas bioinformáticas nos dieron a conocer que esta proteína forma parte de la contracción lenta del músculo. Encontrando en mayor proporción, Lisina y Leucina como aminoácidos esenciales. Así también péptidos encriptados con actividad biológica presentaron funciones antioxidantes, estimulantes, hipotensoras, ACE inhibitoras, opioides y reguladoras.
- III. El análisis bioinformático de una proteína del músculo de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana), en el contenido de aminoácidos esenciales y la presencia de péptidos con actividad biológica encriptados, posee valiosa información con proyecciones de uso biotecnológico con grandes alcances para la industria Nutraceútica.

## RECOMENDACIONES

- I. Continuar con el estudio bioinformático de todas las proteínas presentes en el músculo, con la finalidad de obtener un catálogo proteómico de péptidos con actividad biológica, que permita dar información con proyecciones de uso biotecnológico para la industria Nutraceutica.
  
- II. Fomentar el desarrollo y plan de proyectos de investigación, para que ingresen a concurso financiados por el estado del CONCyTEC, los que servirán en la implementación y mejoramiento de equipos y materiales en los laboratorios, estos proyectos concursables serán la iniciativa para incrementar la base de datos en la redacción de artículos científicos.



## CAPÍTULO V REFERENCIAS

1. ABSciex, Protein Pilot™, Software. Getting Started Guide D1000085732B, September 2010
2. Aebersold, R. & Mann, M. Mass spectrometry-based proteomics. Nature 2003, 422, pp.198–207.
3. Anggo A.D., Ma'ruf W.F., Swastawati F., Rianingsih L., Changes Of Amino And Fatty Acids In Anchovy (*Stolephorus Sp*) Fermented Fish Paste With Different Fermentation Periods. Procedia Environmental Sciences 23, 2015 58 – 63
4. Amershan Biosciences, Protein Electrophoresis, Technical Manual; 80-6013-88/Rev. B0/12-99, 1999
5. Applied Biosystems./MDS SCIEX 4800 MALDI TOF/TOF™ Analyzer. Getting Started Guide. Version 3.0 Series Software. 2004
6. Applied Biosystems. MALDI TOF/TOF™ Systems Sample and Matrix Preparation Guide. 2004
7. Belén C.D; Moreno A.M; Medina C. y Sidovorras A. Caracterización de un hidrolizado proteico enzimático obtenido del pez Caribe Colorado (*Pygocentrus cariba* Humbolt, 1821). Reladyc, Asociacion INTERCIENCIA, Vol. 32, num.3, Marzo 2007 pp.188-194; 189
8. Belitz H.-D., Grosch Werner, Schieberle P., Food Chemistry 4th revised and extended ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2009, Cap 12 Muscle Tissue: Composition and Function, pp 563 - 614
9. Bertrand S., Díaz E., Lengaigne, M. Patterns in the spatial distribution of Peruvian anchovy (*Engraulis ringens*) revealed by spatially explicit fishing data. Progress in Oceanography 79. 2008, pp. 379–389.
10. Benavente Mas, José Manuel; Comparación computacional de estructuras de proteínas. Aplicación al estudio de un inhibidor de Carboxipeptidasa como agente Multi-tumoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Capítulo V, Comparación Tridimensional de la cadena polipeptídica de Proteínas. 2000

11. Biblioteca Digital de la Universidad de Chile, BDI, Sistema de servicios de información y bibliotecas, SISIB, Proteínas de pescado y Marisco, Marzo 2015  
Disponible en:  
[http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias\\_quimicas\\_y\\_farmaceuticas/penacchiottii01/capitulo03/02.html](http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/penacchiottii01/capitulo03/02.html)
12. BIOPEP: Herramienta de búsqueda que realiza el cálculo del perfil de actividad biológica potencial de péptidos encriptados. Marzo 2015  
Disponible en: <http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>
13. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) Marzo, 2105  
BLAST NCBI: Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI)  
Disponible en:  
[http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BLAST\\_SEARCH&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BLAST_SEARCH&LINK_LOC=blasthome).  
BLAST EBI: Instituto Biotecnológico Europeo (EBI)  
Disponible en: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/ncbiblast/>
14. Bradford, Marion M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding Analytical Biochemistry 72, 1976 pp.248-254
15. Buschmann Alejandro. Impacto ambiental de la acuicultura. El estado de la investigación en Chile y el mundo. Departamento de Acuicultura. Universidad de Los Lagos, Osorno, Chile. Terram Publicaciones. Diciembre. 2001.
16. Burton Edward A., Movement Disorders, Second Edition, Zebrafish, Chapter 7, Department of Microbiology and Molecular Genetics, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA. 2015 pp.117-135.
17. Chalamaiah M., Dinesh kumar B., Hemalatha R., Jyothirmayi T., Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. Food Chemistry 135. 2012. 3020–3038
18. Christensen V., de la Puente S., Sueiro J.C., Steenbeek J., Majluf P. Valuing seafood: The Peruvian fisheries sector. Marine Policy 44. 2014. pp. 302–311.
19. Corporación Pesquera Inca – COPEINCA S.A.C. Marzo 2015.  
Disponible en: <http://www.copeinca.com/>

20. CSA - Centro de Sostenibilidad Ambiental; de la Universidad Peruana Cayetano Heredia UPCH CSA-UPCH, Marzo 2015  
Disponible en:  
[http://www.anchoveta.info/index.php?option=com\\_content&task=view&id=50&Itemid=76](http://www.anchoveta.info/index.php?option=com_content&task=view&id=50&Itemid=76)
21. De Hoffmann, E; Stroobant V. Mass Spectrometry Principles and Applications. Third Edition. Jhon Wiley & Sons, Ltd. 2004.
22. de Vries, D. J. and Beart, P. M. Fishing for drugs from the sea: Status and strategies. Trends Pharmacol. Sci. 16, 1995. pp. 275–279.
23. DNASTar. Software que proporciona lo necesario para la información genómica, y proteómica de la biología estructural, Marzo 2015. Tutorial: Ponce Soto Luis.  
Disponible en: <http://www.dnastar.com/>
24. EOL – Encyclopedia of Life, Marzo 2015  
Disponible en: <http://eol.org/pages/206650/names>
25. Espe, M., Lied E. & Torrissen K. R. Changes in plasma and muscle amino acids in Atlantic salmon (Salmon salar) during absorption of diets containing different amounts of hydrolysed cod muscle protein. Comp Biochem Physiol A, 1993. 105: pp. 555-562.
26. Espinoza P, Bertrand A, Van Der Lingen CD, Garrido S, Rojas de Mendiola B. Diet of sardine (Sardinops sagax) in the northern Humboldt Current system and comparison with the diets of clupeoids in this and other eastern boundary upwelling systems. Progress in Oceanography 83. 2009, pp. 242-250.
27. FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Examen mundial de la pesca y la acuicultura. Informe de Pesca y Acuicultura. pp. 144.; 2012.
28. García Blandón, Pedro Aristides, Fundamentos de Nutrición; Primera Edición; Editorial Universidad Estatal a Distancia San José, Costa Rica, EUNED, 148 p. 1983.
29. GEF – ONUDI – IMARPE – IFOP (GEF - Global Environment Facility; ONUDI - Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial, IMARPE - Instituto del mar del Peru, IFOP - Instituto de Fomento pesquero)

Manejo Integrado, Gran Ecosistema Marino de la Corriente de Humboldt, Recursos y Pesquerías, informe de Avance, Octubre 2002

30. Gil Hernández, Angel; Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición, Sociedad española de nutrición Parental y Enteral, SENPE. Segunda Edición, Madrid; Medica Panamericana D.L. 2010. Marzo 2015

Disponible en:

[https://books.google.com.pe/books?id=64x-](https://books.google.com.pe/books?id=64x-gRS5520C&pg=PA347&dq=Bases+fisiol%C3%B3gicas+y+bioqu%C3%ADmicas+de+la+nutrici%C3%B3n+aminoacidos+esenciales&hl=en&sa=X&ei=F1s6VYGFDsGoNtDmgegH&ved=0CBsQ6AEwAA#v=onepage&q=Bases%20fisiol%C3%B3gicas%20y%20bioqu%C3%ADmicas%20de%20la%20nutrici%C3%B3n%20aminoacidos%20esenciales&f=false)

[gRS5520C&pg=PA347&dq=Bases+fisiol%C3%B3gicas+y+bioqu%C3%ADmicas+de+la+nutrici%C3%B3n+aminoacidos+esenciales&hl=en&sa=X&ei=F1s6VYGFDsGoNtDmgegH&ved=0CBsQ6AEwAA#v=onepage&q=Bases%20fisiol%C3%B3gicas%20y%20bioqu%C3%ADmicas%20de%20la%20nutrici%C3%B3n%20aminoacidos%20esenciales&f=false](https://books.google.com.pe/books?id=64x-gRS5520C&pg=PA347&dq=Bases+fisiol%C3%B3gicas+y+bioqu%C3%ADmicas+de+la+nutrici%C3%B3n+aminoacidos+esenciales&hl=en&sa=X&ei=F1s6VYGFDsGoNtDmgegH&ved=0CBsQ6AEwAA#v=onepage&q=Bases%20fisiol%C3%B3gicas%20y%20bioqu%C3%ADmicas%20de%20la%20nutrici%C3%B3n%20aminoacidos%20esenciales&f=false)

31. Gilbert, E.R., Wong, E.A., Webb Jr., K.E., Board-invited review: Peptide absorption and utilization: implications for animal nutrition and health. *J. Anim.Sci.* 2008, 86, 2135–2155.
32. Graves P.R., Haystead T.A. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev Mar*; 66(1) 2002. pp. 39-63.
33. Guadix, A., E. Guadix, M. P. Páez-Dueñas, P. González-Tello y F. Camacho. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*, 2000, 41: pp.79-89.
34. Gutiérrez-Coronado L., García-Rico L., Vázquez-Ortiz F., Preciado-Huguez K., Figueroa-García R. y López-Franco Y. Lisina total, digestible y reactiva digestible en harina de pescado. *Revista científica, FCV-LUZ.* 2008.
35. IMARPE: Instituto del mar del Perú; Marzo 2015

Bouchon M., Ayón P., Mori J, Peñal C., Espinoza P., Hutchings L., Buitron B., Perea A., Goicochea C., Messié M. Biología de la anchoveta peruana, *Engraulis ringens* Jenyns, *Bol. Inst. Mar Perú*, 25 / Nos. 1 y 2 / Enero - Diciembre 2010

Disponible en:

[http://www.imarpe.pe/imarpe/archivos/articulos/imarpe/recursos\\_pesquerias/adj\\_pelagi\\_adj\\_pelagi\\_anch\\_mar07.pdf](http://www.imarpe.pe/imarpe/archivos/articulos/imarpe/recursos_pesquerias/adj_pelagi_adj_pelagi_anch_mar07.pdf)

36. Islam, N. M. D., Itakura, T., Motohiro, T. Antibacterial spectra and minimum inhibition concentration of clupeine and salmine. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 50, 1984 pp. 1705–1708
37. ITIS - Integrated Taxonomic Information System; Marzo 2015  
Disponble en:  
[http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=551340](http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=551340)
38. Iwaniak, A., & Minkiewicz, P. Proteins as the source of physiologically and functionally active peptides. *Acta Scientiarum. Polonorum Technologia Alimentaria*, 6 (3), 2007. pp.5-15.
39. Kamal, K., Motohiro, T. Effect of pH and metal ions on the fungicidal action of salmine sulfate. *Nippon Suisan Gakkaishi* 52, 1986. pp. 1843–1846.
40. Kim S.K., Kim Y.T., Byun H.G., Nam K.S., Joo D.S., Shahidi F. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. *J Agric Food Chem.* Apr;49(4): 1984-9. 2001.
41. Kim, S. K., Mendis, E. Bioactive compounds from marine processing byproducts - A review. *Food Research International*, 39, 2006. pp. 383–393.
42. Kitts, D. D. y K. Weiler. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9: 2003. pp. 1309–1323.
43. Klompong V, Benjakul S, Kantachote D, Shahidi F. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chem.* 2007.102:1317–27.
44. Klompong, V., Benjakul, S., Yachai, M., Visessanguan, W., Shahidi, F., & Hayes, K.D. Amino acid composition and antioxidative peptides from protein hydrolysates of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*). *Journal of Food Science*, 74, 2009, C126–C133.
45. Korhonen H. and Pihlanto A. Bioactive peptides: novel applications for milk proteins. *Applied Biotechnology, Food Science and Policy*.1 (3), 2006 pp.133-144.

46. Kyte J. & Doolittle R. F., A Simple Method for Displaying the Hydrophobic Character of a Protein, *J. Mol. Biol.* 1982. 157, 105-132
47. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-5.
48. Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C.A., Krieger M., Scott M.P., Zipursky L., and Darnell J. *Molecular Cell Biology*. Buenos Aires: (5ªed.) Médica Panamericana. Cap 3 Protein Structure and Function. 2005.
49. López Laura B. *Química De Alimentos, Estabilidad conformacional y adaptabilidad. Desnaturalización de las proteínas. Cátedra de Bromatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica.* 2013.
50. Marzloff M., Shin Y-J., Jorge Tam J., Travers M., Bertrand A. Trophic structure of the Peruvian marine ecosystem in 2000-2006: Insights on the effects of management scenarios for the hake fishery using the IBM trophic model Osmose. *Journal of Marine Systems* 75. 2009 pp. 290-304
51. Mathews, C. K.; Van Holde, K.E et Ahern, K.G. *Bioquímica (3ªedición)*. pp. 204 y ss. 2003
52. Mendis E., Rajapakse N., Kim S.K. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *J Agric Food Chem.* Feb 9; 2005. 53(3):581-7.
53. Ministerio de la producción – Dame Anchoveta; Marzo 2015  
Disponible en: <http://www.dameanchoveta.gob.pe/nutricion-2.php>
54. Mulero Cánovas J., Zafrilla Rentero P., Martínez-Cachá Martínez A., Leal Hernández M., Abellán Alemán J. Péptidos bioactivos. *Clin Invest Arterioscl.* 2011;23(5):219-227
55. Murray, J., Burt, J. R. The composition of fish. (Torry Advisory Note No. 38). Aberdeen. Torry Research Station. 2001; Marzo 2015.  
Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/v7180e/v7180e05.htm>
56. Nagashima Y, Kikuchi N, Shimakura K, Shiomi K. Purification and characterization of an antibacterial protein in the skin secretion of rockfish *Sebastes schlegeli*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* Sep;136(1). 2003 :pp.63-71.

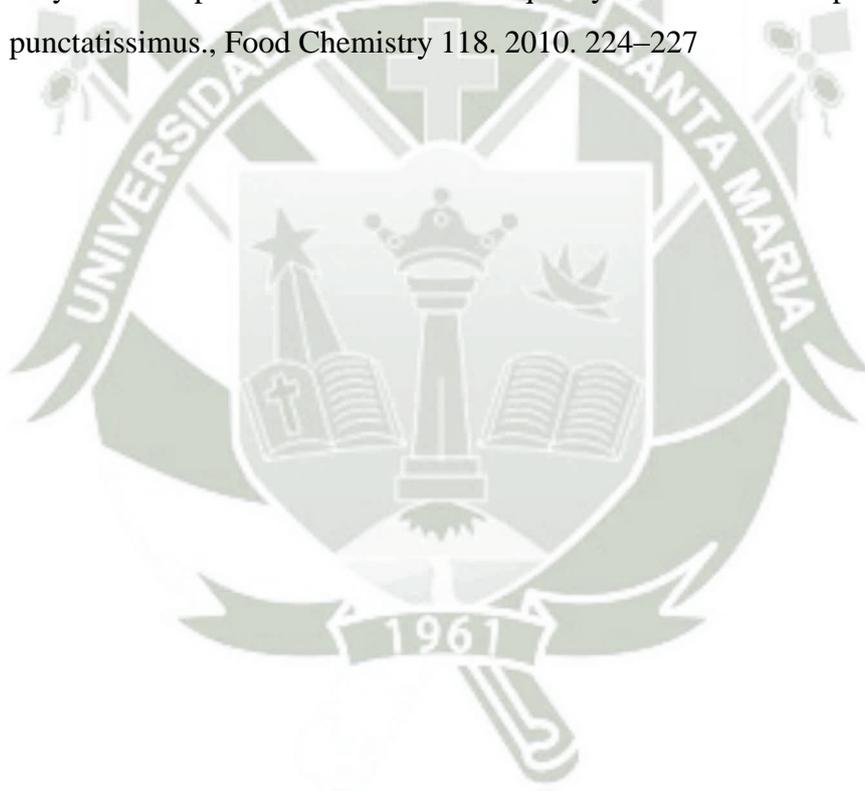
57. Nørgaard, J.V., Pertersen J.K., Tørring D.B., Jørgensen H., Chemical composition and standardized ileal digestibility of protein and amino acids from blue mussel, starfish, and fish silage in pigs. *Anim. Feed Sci. Tech.* 2015.
58. Ostrowski A. & Divakaran S., The Amino Acid and Fatty Acid Compositions of Selected Tissues of the Dolphin Fish (*Coryphaena hippurus*) and their Nutritional Implications. *Aquaculture*, 80. 1989. 285-299
59. Otani, H., Y. Kihara y M. Park. The immunoenhancing property of dietary casein phosphopeptide preparation in mice. *Food and Agricultural Immunology*, 12: 2000. pp.165–173.
60. Patat S.A., Carnegie R.B., Kingsbury C, Gross P.S., Chapman R, Schey K.L. Antimicrobial activity of histones from hemocytes of the Pacific white shrimp. *Eur J Biochem. Dec*; 271(23-24):4825-33. 2001.
61. Perez Leonard, Heidy. Nutraceuticos: componente emergente para el beneficio de la salud. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, vol. XL, núm. 3, septiembre-diciembre, 2006, pp. 20-28.
62. Pickett S.D., Sternberg M.J. Empirical scale of side-chain conformational entropy in protein folding. *J Mol Biol.* Jun 5;231(3): 1993, 825-39.
63. Pitarch A , Sánchez M, Nombela C, Gil C. Analysis of the *Candida albicans* proteome. I. Strategies and applications. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* Apr 5;787(1): 2003, 101-28.
64. Rabilloud T., Jean-Marc Strub J-M., Luche S., Dorsselaer A., Lunardi J. A. Comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics*, 1, 2001. 699–704
65. Raghavan, S., & Kristinsson, H. G. ACE-inhibitory activity of tilapia protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 117, 2009. pp. 582–588.
66. Rajapakse N. , Mendis E., Jung W-K., Je J-Y., Kim S-K. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. Volume 38, Issue 2, March, 2005. pp.175–182
67. Randall D., Burggren W., French K. *Fisiología Animal. Mecanismos y Adaptaciones.* Cuarta Edición. Cap. 10 Músculos y Movimiento. 2002. 381-387

68. Randall I. Krohn, Pierce Chemical. Basic Protocol4 B1.1.13 The Coomassie Dye–Binding (Bradford) Assay For Determining Total Protein. Unit B1.1 The Colorimetric Detection and Quantitation of Total Protein. Chapter B1 measurement of Protein Content. Section B Proteins Current Protocols in Food Analytical Chemistry B1.3.1-B1.3.7 (Rockford, Illinois) 2002.
69. Ren, J., Zhao, M., Shi, J., Wang, J., Jiang, Y., Cui, C., Kakuda, Y., & Xue, S. J. Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 108, 2008. pp. 727–736.
70. Rustad, T. Utilization of marine by-products. *Electric Journal of Environmental, Agriculture and Food Chemistry*, 2: 2003. pp. 458-463.
71. Santana Rodríguez, Werner Paul. Incremento de la producción de Harina y Aceite de pescado para abastecer el mercado local, nacional e internacional. Tesis de Grado. Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí. Facultad de Ciencias Económicas. Manta – Manabí – Ecuador. 2004.
72. Santos, Javier. Las proteínas; dirigido por Juan Manuel Kirschenbaum.- 1a ed. - Buenos Aires: Ministerio de Educación de la Nación. Instituto Nacional de Educación Tecnológica. 2009.
73. Santos, S. A., Martins, V. G., Salas-Mellado, M., Prentice, C. Evaluation of functional properties in protein hydrolysates from Bluewing Searobin (*Prionotus punctatus*) obtained with different microbial enzymes. *Food and Bioprocess Technology*, 2011, 4, 1399–1406
74. Segura Campos M., Chel Guerrero L., Betancur Ancona D. (2013) Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias. Barcelona: Omnia Publisher SL; Marzo 2013  
Disponibile en: <http://dx.doi.org/10.3926/oms.136>
75. Se-Kwon Kim and Isuru Wijesekara. Marine Proteins and Peptides Biological Activities and Applications. Cap.1 John Wiley & Sons, Publication. 2013.
76. Shahidi, F. y Y. Zhong, Bioactive peptides. *J. AOAC Int*, 91: 2008. pp.914–931.
77. Shevchenko, A., Loboda, A., Ens, W., Schraven, B. & Standing, K.G. Archived polyacrylamide gels as a resource for proteome characterization by mass spectrometry. *Electrophoresis* 22, 2001. pp. 1194–1203

78. Simpson RJ. Proteins and proteomics. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2003.
79. Smith V.J., Fernandes J.M., Jones S.J., Kemp G.D., Tatner M.F., Antibacterial proteins in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Shellfish Immunol.* Apr;10(3); 2000. 243-60.
80. SMS . Sequence Manipulation Suite, Reverse Translate, Marzo 2013. Disponible en: [http://www.bioinformatics.org/sms2/rev\\_trans.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html)
81. Suetsuna K., Antioxidant Peptides from the Protease Digest of Prawn (*Penaeus japonicus*) Muscle. *Mar Biotechnol (NY)*. Jan;2(1): 2000. 5-10.
82. SWISS-MODEL: Servidor de homología proteica estructural de modelado totalmente automatizado, accesible a través del servidor web ExpASy. Marzo 2013  
Disponible en: <http://swissmodel.expasy.org/> y  
[http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=special\\_help](http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=special_help)
83. UCSF Chimera, Programa altamente extensible para la visualización y el análisis de las estructuras moleculares y los datos relacionados; Abril 2015.  
Soporte disponible en: <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>
84. Vareltzis, K. Fish proteins from unexploited and underdeveloped sources. In: Doxastakis, G., Kiosseoglou, V., eds. *Novel Macromolecules in Food Systems*. Amsterdam: Elsevier, 2000 pp. 133–159.
85. Venugopal, V. Seafood proteins: functional properties and protein supplements. In: *Marine Products for Healthcare: Functional and Bioactive Nutraceutical Compounds from the Ocean*. Boca Raton: CRC Press, 2009. pp. 51–102.
86. Vioque J., Pedroche J., Yust M.M., Lqari H., Megías C., Girón-Calle J., Alaiz M., Millan F. Peptídeos Bioativos em Proteínas Vegetais de Reserva. *Braz. J. Food Technol.*, III JIPCA, janeiro, 2006.
87. Voet D., Voet J.G., Charlotte W.P. *Fundamentos de Bioquímica, La Vida a Nivel Molecular*; Segunda Edición; Capítulo 20, Metabolismo de Aminoácidos; Biosíntesis de Aminoácidos; 2006. pp.714. Marzo 2015  
Disponible en:

<https://books.google.com.pe/books?id=FXDiiqLK6GmAC&pg=PA714&dq=aminoacidos+esenciales&hl=en&sa=X&ei=Coc5VczLJMfZsASxpoCYDA&ved=0CCEQ6AEwAQ#v=onepage&q=aminoacidos%20esenciales&f=false>

88. Westermeier R, Naven T. Proteomics in Practice. WILEY-VCH, Weinheim. 2002.
89. Whitehead J.P. FAO - Species Catalogue, Vol 7 Clupeoid Fishes Of The World (Suborder CLUPEOIDEI) An Annotated and Illustrated Catalogue of the Herrings, Sardines, Pilchards, Sprats, Shads, Anchovies and Wolf-herrings Part 2: Engraulididae. United Nations Development Programme. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. 1988.
90. Zhao F., Zhuang P., Song C., Shi Zhao-hong, Zhang Long-zhen. Amino acid and fatty acid compositions and nutritional quality of muscle in the pomfret, *Pampus punctatissimus*., Food Chemistry 118. 2010. 224–227



**CAPITULO VI****ANEXOS****ANEXO 1: DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES POR  
BRADFORD.**

Metodología de la determinación colorimétrica de Proteínas modificada. Detección colorimétrica y cuantificación de proteínas totales (Bradford M. y Randall I.) (14, 68)

**PREPARACIÓN DE SOLUCIONES****BSA 1 mg/mL (w/v)**

1. Disolver 10 mg. de BSA cristalizado o liofilizado en 10 mL de agua desionizada. Almacenar a -20°C

**Reactivo Bradford (1 L)**

1. Disolver 100 mg. de Coomassie Brilliant Blue G-250 en 50 mL etanol al 95 %.
2. Vierta la solución en 800 mL de agua desionizada.
3. Adicione lentamente 100 mL de ácido fosfórico al 85 % y ajuste a un volumen final de 1000 mL con agua desionizada.
4. Filtrar la solución con papel filtro N°1
5. Almacenar hasta un mes a 4 °C en frasco ámbar.

**DETERMINACIÓN DE LA CURVA ESTÁNDAR DE PROTEÍNAS.**

1. Preparar una serie de diluciones (200, 400, 600, 800 1000 µg BSA/mL) desde la solución patrón de BSA, según tabla

**Tabla N°8: Diluciones de BSA para Curva Estándar**

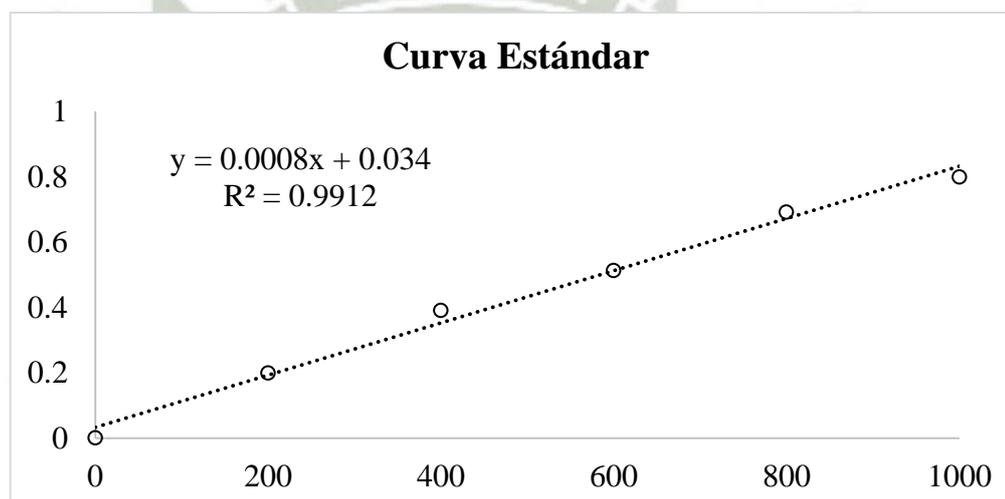
<b>Volumen (µL)</b>	<b>Blanco</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>BSA patrón</b>	0	20	40	60	80	100
<b>Agua desionizada</b>	100	80	60	40	20	0

2. Adicionar 5 mL de Reactivo Bradford a cada tubo. Agitar inmediatamente.
3. Incubar 10 min a temperatura ambiente.
4. Medir la absorbancia a 595 nm.

- Plotear curva estándar graficando los valores de Absorbancia a 595nm versus su concentración de proteínas (diluciones patrón) en microgramos por mililitro.

**Tabla N°9:** Valores de ABS para curva estándar de BSA (1000 µg/ml)

ug/ml	ABS
0	0.002
200	0.200
400	0.391
600	0.513
800	0.692
1000	0.799



**Figura N17°:** Curva estándar de BSA (1000 µg/mL.)

### MEDICION DE LA MUESTRA

- Para cada muestra, considerar las siguientes diluciones si las requiere:

Volumen (µL)	Directa	1/2
Muestra	100	50
Agua desionizada	0	50

- Adicionar 5 mL de Reactivo Bradford a cada tubo. Agitar inmediatamente.
- Incubar 10 min. a temperatura ambiente.
- Medir la absorbancia a 595 nm.
- Determinar la concentración de la muestra, por interpolación desde la curva estándar según absorbancia observada a 595 nm.

Para la lectura de la muestra se hizo por cinco veces, el ensayo se realizó para descartar error del actuador y así mejorar la precisión de este resultado, y así saber el contenido proteico del extracto líquido rico en proteínas del Músculo de *Engraulis Ringens*.

La regresión lineal de la curva estándar presento un R2 de 0.9912, eso quiere decir que la linealidad de la recta es confiable y la ecuación es la siguiente:

$$y = 0.0008 x + 0.034$$

Remplazando los valores para determinar la concentración en  $\mu\text{g/mL}$ :

$$\text{ABS} = 0.008(\text{Concentracion}\mu\text{mg/ml}) + 0.034$$

$$\text{Concentracion} \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{ABS} - 0.034}{0.0008}$$

Los resultados de las Concentraciones de proteínas en el extracto líquido de E. ringens según la etapa de Lavado y al mesclar las etapas se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla N°10:** Concentración de proteína en el extracto líquido, presentando factor de dilución (fx) de 2:

Muestra	ABS	$\mu\text{g/mL}$ .	$\mu\text{g/mL}$ .	Media	Desv.Est.
E1	0.439	506.25	1012.50		
E2	0.451	520.63	1041.25		
E3	0.430	495.00	990.00	1014.75	18.1874
E4	0.441	508.13	1016.25		
E5	0.440	506.88	1013.75		

## ANEXO 2: DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR APARENTE POR ELECTROFORESIS 1D SDS-PAGE

### Preparación del Gel de Electroforesis SDS-PAGE

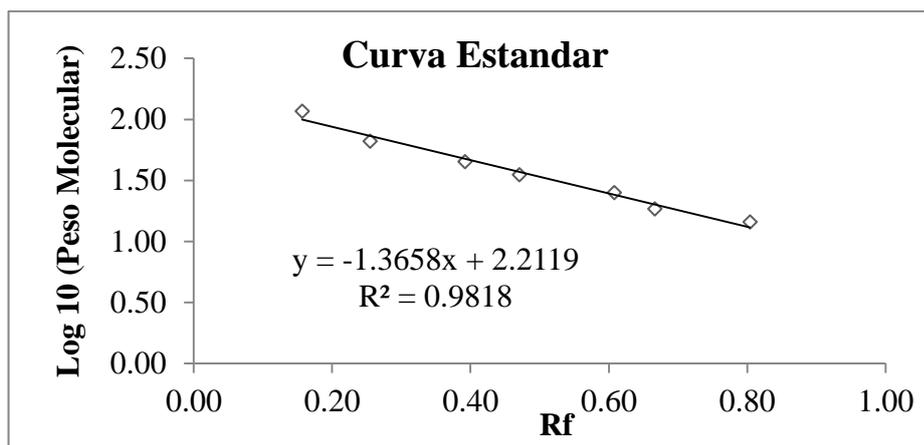
**Tabla N°11:** Soluciones para preparación del Gel de Electroforesis SDS-PAGE  
(Para 2 Geles de 0.8 mm., 10x10 cm.) (4)

<b>Reactivos</b>	<b>Resolving Gel</b> (12.5 %) (20 mL.)	<b>Staking Gel</b> (5.0 %) (10 mL.)
Acrilamida/Bisacrilamida (30 % / 0.8 %)	8.3 mL.	1.67 mL.
Resolving Gel Buffer(Tris-HCl 1.0 M, pH 8.8)	5 mL.	-
Staking Gel Buffer (Tris-HCl 1.0 M, pH 6.8)	-	2.5 mL.
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 10 %	0.4 mL.	0.2 mL.
Agua Milli-Q	6.2 mL.	5.53 mL.
Persulfato amónico (PSA) 10 %	100 µL	75 µL.
N-N-N-N-Tetrametiletilenediamina (TEMED)	20 µL.	15 µL.

Curva generada trazando el logaritmo en base 10 del peso molecular de la amplia gama de estándares vs. La movilidad relativa (Rf). Sabiendo que Rf es la distancia migrada por la proteína sobre la distancia migrada por el colorante. Esta curva se puede utilizar para determinar pesos moleculares de proteínas de desconocidos.

**Tabla N°12:** Distribución de la masa molecular del marcador molecular

<b>Distancia Recorrida</b> (mm.)	<b>Rf</b>	<b>Log<sub>10</sub></b> (Peso Molecular)	<b>Peso Molecular</b>
8	0.1569	2.0645	116.0
13	0.2549	1.8209	66.2
20	0.3922	1.6532	45.0
24	0.4706	1.5441	35.0
31	0.6078	1.3979	25.0
34	0.6667	1.2648	18.4
41	0.8039	1.1584	14.4



**Figura N°18:** Curva estándar de Marcadores Moleculares

La regresión lineal de la curva estándar presento un R2 de 0.9818, eso quiere decir que la linealidad de la recta es confiable y la ecuación es la siguiente:

$$y = -1.3658x + 2.22119 \rightarrow \text{Log}_{10}(\text{PM}) = -1.3658(\text{Rf}) + 2.2119$$

Los resultados de las Masas Moleculares de las diferentes proteínas expresas en el Músculo de *Engraulis ringens*. se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla N°13:** Distribución de la masa molecular aparente de las proteínas expresas del músculo de *Engraulis ringens*

Distancia Recorrida (mm)	Rf	Log 10 (Peso Molecular)	Peso Molecular
5	0.0980	2.0780	119.7
7	0.1373	2.0244	105.8
10	0.1961	1.9441	87.9
17	0.3333	1.7566	57.1
20	0.3922	1.6763	47.5
22	0.4314	1.6227	41.9
24	0.4706	1.5692	37.1
25	0.4902	1.5424	34.9
29	0.5686	1.4353	27.2
31	0.6078	1.3817	24.1
33	0.6471	1.3281	21.3
37	0.7255	1.2210	16.6
47	0.9216	0.9532	9.0

### ANEXO 3: MÉTODOS DE ADQUISICIÓN DE UN ESPECTROMETRO DE MASAS MALDI ToF/ToF ABsciex 4800 PLUS, PARA UNA PROTEÍNA EXPRESA EN EL MÚSCULO DE *Engraulis ringens*

#### Acquisition Method – MS Reflector Positive

##### Instrument

Operating Mode	:	MS Reflector Positive
Analysis Mass	:	800 Da To 4000 Da
MALDI Matrix	:	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid

##### Spectrum

Acquisition Mode	:	Accumulate every n-shot sub-spectrum that passes
Shots per sub-spectrum	:	25
Sub-spectra To Accumulate	:	16

##### Automatic Control

Sample Stage Mode	:	Move before every sub-spectrum (pass or fail)
Search Pattern Source	:	Random
Laser Intensity	:	4000

##### Digitizer

Digitizer Bin Size	:	0.5 ns
Detector Voltage Multiplier	:	0.85

#### Processing Method – MS Reflector Positive

##### Raw Spectrum Filtering / Peak Detection

Subtract Baseline	:	Disabled
Smooth	:	Disabled
S/N Threshold	:	3
Flag Monoisotopic Peaks	:	Enabled
Adduct	:	H
Generic Formula	:	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO
Calibration Type	:	Default

**Acquisition Method – MS/MS Positive****Instrument**

Operating Mode	:	MS-MS 2KV Positive
Acquisition Control	:	Automatic
CID	:	Off
Precursor Mass	:	-----
Metastable Suppressor	:	On
MALDI Matrix	:	a-Cyano-4-hydroxycinnamic acid

**Spectrum**

Acquisition Mode	:	Accumulate every n-shot sub-spectrum that passes
Shots per sub-spectrum	:	25
Sub-spectra To Accumulate	:	40

**Automatic Control**

Sample Stage Mode	:	Move before every sub-spectrum (pass or fail)
Search Pattern Source	:	Random
Laser Intensity	:	5000

**Digitizer**

Digitizer Bin Size	:	0.5 ns
Detector Voltage Multiplier	:	0.85

**Processing Method – MS/MS Positive****Raw Spectrum Filtering / Peak Detection**

Subtract Baseline	:	Disabled
Smooth	:	Disabled
S/N Threshold	:	3
Flag Monoisotopic Peaks	:	Enabled
Adduct	:	H
Generic Formula	:	C6H5NO

**Calibration Type** : Default

**ANEXO 4: REGISTRO GRAFICO DEL ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO EN LA ERA POST-GENÓMICA DE UNA PROTEÍNA EXPRESA EN MÚSCULO DE *Engraulis ringens* “ANCHOVETA PERUANA”. UNA PERSPECTIVA NUTRICIONAL.**

**1. Muestreo de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana)**



**Figura N°19:** Desembarque de la carga *Engraulis ringens*(anchoveta Peruana)  
a)Embarcación pesquera (Bolichera) Maria Maximina; b)Desembarque de *Engraulis ringens* en el muelle CRIANI.

**2. Extracción de Masa Muscular de *Engraulis ringens***

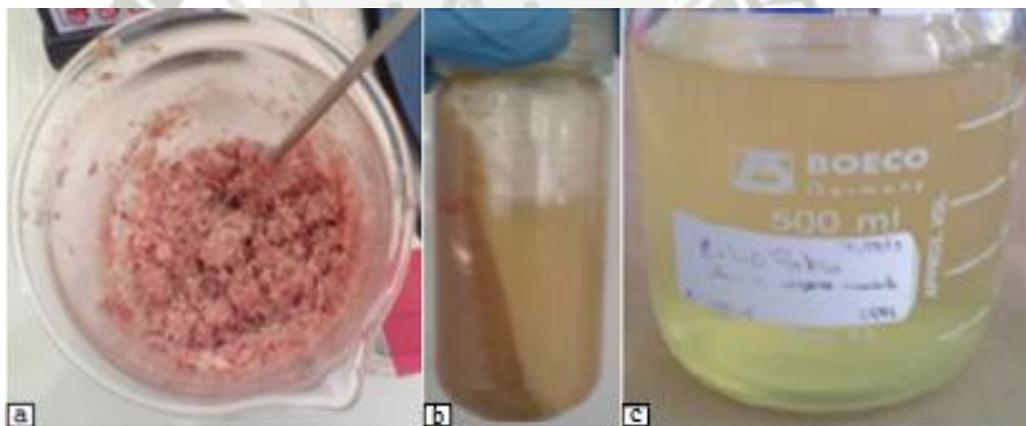


**Figura N°20:** Extracción de la masa muscular de *Engraulis ringens*  
a) *Engraulis ringens* sin músculo b)*Engraulis ringens* c) y d) Músculo extraído de *Engraulis ringens*

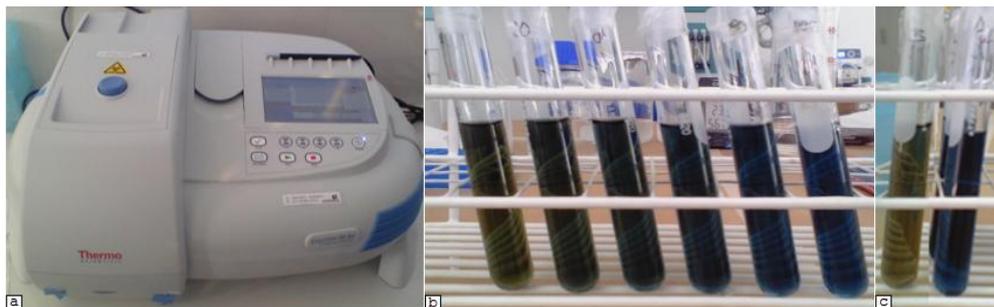
### 3. Acondicionamiento de la Masa Muscular para la Obtención de Extractos Proteicos del Músculo de *Engraulis Ringens*



**Figura N°21.** Proceso de Pulverizado de la Masa Muscular de *Engraulis ringens*  
a) Triturado del músculo congelado b) Pulverizado del músculo con nitrógeno líquido



**Figura N°22.** Obtención de extractos proteicos del Músculo de *Engraulis ringens*  
a) Muestra Pulverizada b) Centrifugado del Homogenizado Sedimentado después de la Filtración c) Extracto de Proteínas del Músculo de *Engraulis ringens*



**Figura N°23:** Determinación Colorimétrica de Proteínas

a) Espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 260, b) Curva de Calibración del Reactivo Bradford, c) Reacción de las muestras con el reactivo Bradford



**Figura N°24:** Electroforesis en Geles de Poliacrilamida

a) Muestras en colocadas en los posos del Gel, b) Fuente de Poder Thermo Scientific, c) Sistema doble de placas OwlTM Dual

#### 4. Caracterización de péptidos por Espectrometría de Masa (MALDI TOF/TOF ABSciex 4800)



**Figura N°25:** Espectrometro de masa MALDI TOF/TOF 4800 Plus

a) Espectrometro de Masas, b) Modelo de espectrometro, c) Carrier