

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

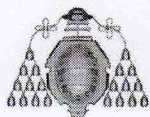
**Estudio de los procesos autofágicos en la
maduración de la carne de cerdo. Búsqueda
de marcadores de bienestar animal y su
efecto sobre la calidad del producto final.**

**TRABAJO FIN DE MASTER
POR**

Yaiza Potes Ochoa

Junio, 2013





Master en Biotecnología Alimentaria
Universidad de Oviedo
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España
Tel. 985106226. Fax 985103434. <http://www.unioviado.es/MBTA>



PROFESOR TUTOR:

Dr. D. Ana Coto Montes.

CERTIFICA:

Que D. **Yaiza Potes Ochoa** ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Master al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, 7ª promoción curso 2012-2013.

Oviedo, de 21 de Junio 2013

D. Ana Coto Montes

VºBº

Mario Díaz Fernández

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo, aunque breve, no podría haberse realizado sin la ayuda de muchas personas. Por eso quiero daros las gracias...

A mi tutora, Ana, por dirigir este trabajo, por haberse preocupado en todo momento de su realización y por todo lo que me ha enseñado, tanto en aspectos científicos como en los personales, a lo largo de estos meses. Gracias.

A mis compañeros del laboratorio, Susana, Marina, Bea y Adri, por hacerme sentir a gusto, por la ayuda, los consejos y contribuir a este trabajo. Gracias a Susana por enseñarme durante los primeros días y dedicarme su tiempo y paciencia; gracias a Marina por su buen humor y sus constantes ánimos; gracias a Adri por los buenos ratos que nos hace pasar; y, finalmente, gracias a Bea, por soportarme tantísimo día a día, por enseñarme un montón de cosas, y no únicamente en el ámbito científico. Ha sido un gusto la estancia en el laboratorio con todos y cada uno de vosotros.

Agradecer también a mis compañeros de máster MBtA, porque este año aunque corto, ha sido muy intenso, y desde luego, no se habría podido sobrellevar sin vuestra compañía. Por toda la ayuda y sobre todo por las risas y los buenos momentos, gracias.

Y como no, a mi familia y a mis amigos más cercanos, por el ánimo, el apoyo y la confianza, porque han estado ahí aguantando mis batallitas y mis momentos de estrés. Sin vosotros para hablar y pasarlo bien no sería lo mismo. Gracias.

Así mismo, quiero agradecer al Departamento de Morfología y Biología Celular de la Universidad de Oviedo y al Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA) del Principado de Asturias por las facilidades prestadas para la realización de este trabajo.

ÍNDICE:

RESUMEN.....	III
ABSTRACT.....	IV
LISTA DE FIGURAS.....	V
LISTA DE TABLAS.....	VII
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y/O EXPERIMENTALES.	7
2.1. TRANSFORMACIÓN DEL MÚSCULO EN CARNE.	7
2.1.1. Mecanismos moleculares y bioquímicos que participan en la transformación del músculo en carne.	8
2.1.2. Principales sistemas proteolíticos implicados en la tenderización.	11
2.2. CALIDAD DE LA CARNE.....	18
2.2.1. Parámetros indicativos de calidad.	19
2.2.2. Factores que afectan a la calidad de la carne.	23
2.3. EL ESTRÉS OXIDATIVO.	24
2.3.1. Daño oxidativo a lípidos.....	26
2.3.2. Daño oxidativo a proteínas.....	27
2.3.3. Daño oxidativo al ADN.....	28
2.3.4. Defensa antioxidante celular.	29
2.3.5. Relación entre el estrés oxidativo y la tenderización.....	31
2.4. AUTOFAGIA.....	32
2.4.1. Relación entre la autofagia y la tenderización.....	35
3. METODOLOGÍA UTILIZADA.....	38
3.1. INSTRUMENTACIÓN Y MATERIALES UTILIZADOS.	38
3.1.1. Instrumentación.	38
3.1.2. Materiales y reactivos químicos.	39
3.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO: ANIMALES. TEST SESGO COGNITIVO Y ESTRÉS INDUCIDO.	40
3.2.1. Población de estudio.....	40
3.2.2. Test cognitivo.	41
3.2.3. Estrés inducido.	41
3.3. DETERMINACIONES DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD.	42
3.3.1. Pérdida de jugo por goteo (Drip loss).....	42

3.3.2. Determinación del pH:.....	43
3.4. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS.	44
3.4.1. Cuantificación proteica.....	44
3.4.2. Actividad antioxidante total (AAT).....	44
3.4.3. Daño de proteínas (PD).	45
3.4.5. Peroxidación lipídica (LPO).....	45
3.4.4. Western Blot (WB).....	45
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:.....	48
4. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN.	50
4.1. ESTUDIO DEL BALANCE OXIDATIVO.	51
4.1.1. Desde el punto de vista del estrés inducido.....	51
4.1.2. Desde el punto de vista de la calidad de la carne (pH y drip loss).	53
4.1.3. Desde el punto de vista del sesgo cognitivo.	56
4.2. BIOMARCADORES AUTOFÁGICOS.	60
5. CONCLUSIONES:.....	69
6. LISTA DE SÍMBOLOS:.....	71
7. BIBLIOGRAFÍA:.....	74

RESUMEN.

Los productos cárnicos y en concreto la carne de cerdo son uno de los principales sustentos alimenticios en los hogares europeos. Sin embargo este sustento se puede ver afectado por la alta mortalidad y/o alteración del producto que provoca el estrés en estos animales.

En este proyecto se utilizaron 12 cerdos macho de cruce comercial (negativos al gen halotano), de los cuales 6 fueron expuestos a situaciones de estrés. Los animales se criaron en una granja experimental desde el destete y hasta alcanzar el peso de sacrificio (100 kg).

La conversión del músculo en carne es un proceso complejo de gran preocupación científica en el sector cárnico debido a su repercusión en la calidad final. La posibilidad de que el estrés psicológico provoque disfunciones celulares es particularmente alta en situaciones asociadas a aumentos en la actividad de los radicales libres, como la tenderización, y por ello se ha estudiado su posible papel en el metabolismo muscular y su evolución *post-mortem*. Para ello, se ha medido el daño de proteína (PD), la lipoperoxidación (LPO) y la actividad antioxidante total (AAT). Teniendo en cuenta la relación que nuestro grupo ha establecido recientemente entre autofagia y tenderización temprana, se amplió el estudio, con la búsqueda de marcadores autofágicos que mostrasen cómo evoluciona este mecanismo ante el estrés psicológico.

ABSTRACT.

Meat products and especially porcine meat are one of the most important food in European households. However, this sustenance can be affected by high mortality and/or alteration of the product that is caused by stress in these animals.

In this project we use 12 crossing commercial male pigs (negative halothane gene), of which six were exposed to stressful conditions. Animals were brought up in an experimental farm from weaning to reach slaughter weight (100 kg).

The conversion of muscle into meat is a complex process of major concern for meat scientists due to its influence on the final meat quality. The possibility that the stress are involved in cellular dysfunction is particularly high in situations associated with increases in free radical activity, like tenderization; therefore its potential role in the muscle post-mortem metabolism is studied. To this end, we have measured the protein damage (PD), lipid peroxidation (LPO), total antioxidant activity (AAT). Considering the role of autophagy in early maturation period that our group has recently described, the study was extended, searching autophagic markers which show their relationship to psychological stress.

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1	Esquema del mecanismo de retroalimentación del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal.....	5
Figura 2	Esquema de la estructura miofibrilar.....	7
Figura 3	Esquema de las etapas de la conversión del músculo en carne.....	9
Figura 4	Esquema de los cambios conformacionales que experimenta la calpaína tras la unión del Ca^{2+}	12
Figura 5	Sistema de degradación proteica ubiquitina-proteosoma (UP).....	17
Figura 6	Interconversión redox de los pigmentos de la carne.....	20
Figura 7	Formación de las principales especies reactivas de oxígeno (EROs).....	25
Figura 8	Proceso de lipoperoxidación (LPO).....	27
Figura 9	Modificación de polipéptidos.....	28
Figura 10	Sistema enzimático de defensa antioxidante.....	29
Figura 11	Tipos de autofagia.....	33
Figura 12	Medida del pH con un pH-metro portátil con electrodo de penetración..	43
Figura 13	Secuencia fotográfica de la técnica de Wertern Blot.....	47
Figura 14	Representación gráfica de los parámetros del balance oxidativo desde el punto de vista del estrés inducido.....	52
Figura 15	Representación gráfica de los parámetros del balance oxidativo desde el punto de vista de la calidad de la carne.....	55
Figura 16	Representación gráfica de los parámetros del balance oxidativo desde el punto de vista del sesgo cognitivo.....	57
Figura 17	Análisis WB representativo de las pruebas realizadas de Beclin 1 (60 kDa) y GAPDH (37 kDa).....	60

Figura 18	Densitometría de los WB Beclin 1 normalizados con la GAPDH para los distintos grupos experimentales (unidades arbitrarias).....	61
Figura 19	Análisis WB representativo de las pruebas realizadas de LC3-I (18 kDa), LC3-II (16 kDa) y GAPDH (37 kDa).....	62
Figura 20	Densitometría de los WB LC3-I normalizados con la GAPDH para los distintos grupos experimentales (unidades arbitrarias).....	62
Figura 21	Densitometría de los WB LC3-II normalizados con la GAPDH para los distintos grupos experimentales (unidades arbitrarias).....	63
Figura 22	Densitometría de los WB LC3-II/LC3-I normalizados con la GAPDH para los distintos grupos experimentales (unidades arbitrarias).....	64

LISTA DE TABLAS.

Tabla 1	Clasificación de los grupos de estudio, estresados y controles según el test del sesgo cognitivo.....	42
Tabla 2	Datos de pH y drip loss clasificados en función de la calidad de la carne; buena o mala.....	54
Tabla 3	Resumen de resultados obtenidos en todos los estudios realizados.....	59
Tabla 4	Resumen de los datos estadísticos obtenidos en Beclin 1 (gráfica B)....	61
Tabla 5	Resumen de los datos estadísticos obtenidos en LC3-I (gráfica B).....	63
Tabla 6	Resumen de los datos estadísticos obtenidos en LC3-II (gráfica B).....	64
Tabla 7	Resumen de los datos estadísticos obtenidos en el flujo autofágico LC3-II/LC3-I (gráfica B).....	65

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

La evaluación del bienestar animal es una de las mayores preocupaciones que acucian al área científica del sector alimentario, fundamentado, por el requerimiento de producir carne de buena calidad. El bienestar animal, así como las condiciones de manejo de los mismos, se ha visto examinado de manera exhaustiva en base a la creencia de que los animales se ven expuestos a situaciones de sufrimiento. En la Unión Europea (UE), la legislación sobre el bienestar animal tiene una larga tradición, que se remonta al siglo XIX, definiéndolo como una cuestión importante y exigiendo que los animales sean tratados lo más humanamente posible. En la actualidad existen una serie de directrices y reglamentos de la UE que especifican los requisitos, condiciones y prácticas que se han de cumplir, en función de la especie, para garantizar el bienestar de los animales como seres sensibles (Ámsterdam., 1997). Éstos cubren áreas tales como el alojamiento y gestión de los animales, el transporte y el sacrificio. El cumplimiento de la legislación está considerablemente limitado, ya que actualmente no existe forma de comprobar su cumplimiento adecuado, de ahí la gran importancia de obtener biomarcadores que confirmen el estado psicológico del animal.

Todos los animales destinados a fines comerciales están expuestos a situaciones adversas causándoles cierto estrés, lo cual, está influyendo en la calidad de la carne. Se ha de tener en cuenta que este tipo de estrés es psicológico, basado en desórdenes emocionales, ante situaciones puntuales, frente a las cuales tienden a generar respuestas adaptativas para recuperar el equilibrio. Los animales tienen la capacidad de tener sensaciones y experimentar sufrimiento y placer, motivo por el cual cobra más importancia la necesidad de “humanizar” el trato de los mismos.

La preocupación científica se encuentra influenciada tanto por la producción de alimentos de buena calidad como por el bienestar animal, con la cual mantiene una relación directa. Los productos cárnicos y en concreto la carne de cerdo constituyen uno de los principales alimentos dentro del patrón de manutención de los hogares europeos. Según la Subdirección General de Productos Ganaderos, Alemania es con diferencia, el mayor productor de carne de cerdo de la UE, comprendiendo 23 de cada 100 toneladas producidas en el continente, con una cuota cercana al 25%. España despunta como el segundo productor con casi 38 millones de cabezas sacrificadas, haciendo que sea uno

de los países más interesados en conseguir carne porcina de buena calidad.

En la actualidad, uno de los principales problemas que alarman a los ganaderos e industrias porcinas es la elevada mortalidad de las reses, hecho que se traduce en elevadas pérdidas económicas anuales. Estudios realizados confirman que existe una correlación entre el bienestar del animal y la composición y calidad final de la canal (Klauke et al., 2013), viniendo determinado por una serie de efectos acumulativos de muchas variables, como son la alimentación, el manejo o el genotipo, que interactúan a lo largo de todo el proceso de crecimiento animal (Averos et al., 2012). Es por ello que se precisa conocer las causas que desencadenan esta muerte súbita para poder ponerle freno.

Por un lado está el componente genético, el trastorno conocido como síndrome de estrés porcino, en inglés llamado “*porcine stress syndrome*” (PSS), produce hipertermia maligna (MH) y se caracteriza por ser una enfermedad monogénica recesiva causada por la mutación del gen Ryr1 (O'Brien et al., 1993) que codifica el receptor de la rianodina o canal liberador de calcio del retículo sarcoplásmico del músculo esquelético estriado (Liang et al., 2009). Este tipo de mutación hereditaria se localiza en el cromosoma 6 y es conocida por causar daños graves tanto en el músculo esquelético como en el corazón. Se asocia con una sintomatología que muestra un rápido incremento de la temperatura corporal y contracciones musculares intensas. Hasta el momento, se formulan hipótesis acerca de los posibles factores que desencadenan la enfermedad, entrando en estudio agentes físicos, psicológicos y farmacológicos, pero convergiendo todos ellos en un punto común, el estrés sufrido por el animal.

No podemos olvidar que el cerdo es una de las especies más sensibles al estrés, debido a que su capacidad de respuesta para combatirlo difiere de otros animales, incluido el hombre. Esto viene determinado fundamentalmente por el hecho de que el cerdo no tiene un buen sistema de termorregulación por poseer una muy baja densidad de glándulas sudoríparas, por ello, ante situaciones de estrés y un consiguiente incremento de temperatura, no es capaz de contrarrestar el efecto ya que su capacidad de perder calor es prácticamente nula. Esto provoca que la inducción de estrés, y la hipertermia subsiguiente, se conviertan en situaciones altamente peligrosas para este animal, causando cambios en la expresión y la activación de diversos factores de

transcripción, produciendo anomalías en las funciones celulares, síntesis de proteínas, metabolismo y proliferación celular (Sonna et al., 2002).

Existen evidencias que indican una relación entre el estrés psicológico sufrido y el estrés oxidativo que vienen determinadas por el estilo de vida, las condiciones ambientales o el trato al que se ha sometido al animal (Burke et al., 2009). En el corazón, las especies reactivas de oxígeno (EROs) actúan localmente activando el receptor de la rianodina, provocando una relajación de los canales liberadores de calcio del retículo sarcoplásmico, y aumentando los niveles de calcio (Prosser et al., 2013), el cual está estrechamente relacionado con el músculo. Esto lleva a que los animales estresados padezcan enormes dificultades para regular la contracción muscular y entren en un estado de rigidez general, lo cual les provoca la muerte por paro cardíaco inducido por la hipercatecolemia y contracción permanente celular.

Aunque el estrés en menor grado no sea responsable de la muerte del animal, sí se sabe que influye en el proceso de tenderización de la carne, causando alteraciones en las características organolépticas de la canal. El ejercicio y el estrés psicológico en el momento previo al sacrificio del animal incrementa la actividad del metabolismo muscular, produciendo un aumento de los niveles de ácido láctico y por consiguiente una disminución brusca del pH. Este fenómeno está bien descrito en la raza porcina, determinando que el estrés agudo no sólo afecta al color, firmeza y capacidad de retención de agua (CRA) del músculo, si no que también reduce la terneza final del producto (Leheska et al., 2002), dando lugar a carnes consideradas de baja calidad.

Se ha de tener en cuenta, como ya se ha mencionado, que este tipo de estrés no es sinónimo de estrés oxidativo, sino que es psicológico, basado en desórdenes emocionales. El sistema nervioso central controla el comportamiento del animal ante situaciones de emoción, miedo, estrés,... El eje hipotalámico pituitario adrenal (HPA) es controlado por el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN). Estas neuronas sintetizan y secretan la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la cual estimula al lóbulo anterior de la glándula pituitaria y libera la hormona adrenocorticotropa o corticotropina (ACTH) al torrente sanguíneo e induce la síntesis de cortisol en la glándula suprarrenal (Zalachoras et al., 2013). Ante situaciones críticas de estrés se producen alteraciones importantes en las regiones cerebrales citadas incrementándose la producción de cortisol (Murani et al., 2011) de forma masiva, liberando glucosa a la

sangre para enviar cantidades masivas de energía a los músculos.

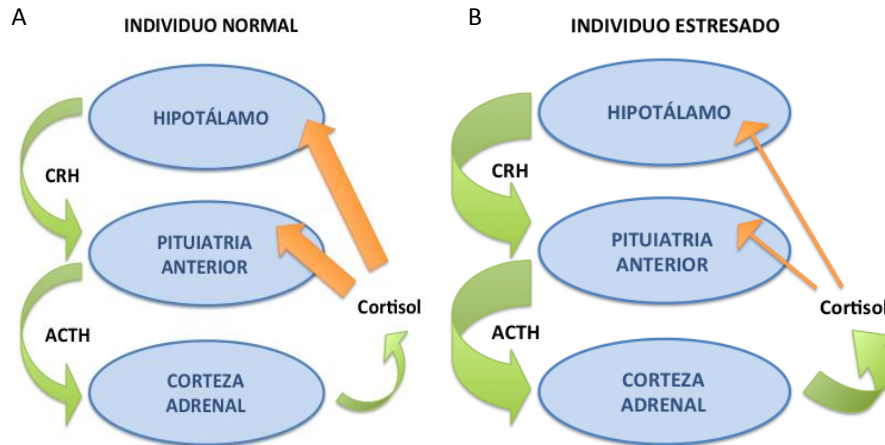


Figura 1. Esquema del mecanismo de retroalimentación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal. (A) Mecanismo de actuación de un individuo normal, con niveles hormonales de CRH, ACTH y cortisol dentro del rango de normalidad. (B) Mecanismo de actuación de un individuo estresado, caracterizado por una producción excesiva de CRH, ACTH y cortisol.

La importancia de la industria porcina, dentro del producto interior bruto tanto de nuestro país en particular como de la UE en general, demanda el conocimiento de los procesos moleculares y celulares que subyacen a la amplia mortalidad ocasionada por el estrés así como a la pérdida de calidad del producto. Por esta razón se ha planteado este proyecto, tratándose del primer estudio realizado en España que engloba aspectos etológicos, psicológicos y bioquímicos del estudio del estrés de la cabaña porcina, con la intención de desarrollar un estrés artificial que permita estudiar los procesos que subyacen al modelo de estrés desarrollado.

Así pues, en el presente trabajo de investigación se han establecido los siguientes objetivos:

- Estudiar la evolución *post-mortem* de parámetros indicativos de calidad en carne porcina de cruce comercial.
- Estudiar el papel cognitivo en la afectación por el estrés en el animal.
- Desarrollar herramientas analíticas que permitan la predicción de la calidad final de los productos.

CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y/O EXPERIMENTALES

2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y/O EXPERIMENTALES.

2.1. TRANSFORMACIÓN DEL MÚSCULO EN CARNE.

El concepto de músculo define al tejido muscular del animal *in vivo*, mientras que la carne es el resultado de una serie de transformaciones estructurales y de reacciones bioquímicas que tienen lugar en el músculo tras la muerte del animal, durante el proceso de maduración *post-mortem*, que produce cambios que afectan a su calidad tecnológica y sensorial.

El tejido muscular tiene diversas funciones mecánicas, encargándose del movimiento del cuerpo, del mantenimiento del equilibrio y la coordinación, pero además el metabolismo de las células musculares está implicado en el mantenimiento del calor corporal y la movilización de sangre y linfa. Pocas células han de generar tanta fuerza y están sometidas a cambios tan dramáticos en su metabolismo como las células musculares. Por todo esto, la organización, estructura y metabolismo del músculo es clave para mantener su función e integridad.

El músculo esquelético está compuesto por múltiples fascículos, estando a su vez cada fascículo formado por un conjunto de fibras musculares (células musculares) que son mantenidas cohesionadas por tejido conjuntivo. El tejido conjuntivo rodea tanto a las fibras individuales (endomisio), como a los fascículos (perimisio) y a los conjuntos de fascículos que forman el músculo (epimisio) y es indispensable para la transducción de fuerzas.

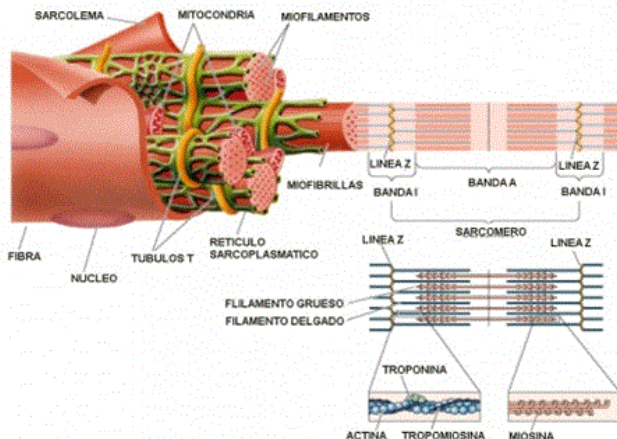


Figura 2. Esquema de la estructura miofibrilar. Conjunto de miofilamentos de actina y miosina distribuidos de manera ordenada vitales para la actividad contráctil muscular. Adaptado de Wordpress (Wordpress, 2007).

La fibra o célula muscular es un sincitio multinucleado rodeado de membrana plasmática, también llamada sarcolema, a la que se adhiere el tejido conjuntivo del exterior. Las fibras musculares (Figura 2) están ocupadas en casi su totalidad por agrupaciones de unidades longitudinales, las miofibrillas, que constituyen la “maquinaria” contráctil de la célula muscular y están compuestas a su vez por haces de miofilamentos, que son polímeros filamentosos individuales de miosina II (filamentos gruesos) y de actina y sus proteínas asociadas (filamentos finos) y son los verdaderos elementos contráctiles del músculo estriado.

La unidad funcional de la miofibrilla es el sarcómero y contenidos en el mismo están todos los elementos estructurales necesarios para desarrollar físicamente la contracción. El alineamiento de los sarcómeros es lo que confiere la apariencia estriada a la célula muscular. Las estriaciones aparecen por la alternancia de zonas proteicas densas (bandas A) y zonas menos densas (bandas I) en las miofibrillas. Tanto las bandas A como las I están divididas en dos mitades por regiones estrechas de densidad diferente. Así las bandas I estarán divididas por una línea oscura conocida como línea o disco Z y las bandas A por una menos densa o clara llamada banda o zona H. Además, a mitad de la zona H hay una fina línea densa llamada línea M. La estructura comprendida entre dos líneas Z es un sarcómero. Las bandas I están compuestas principalmente de filamentos finos mientras que las A están compuestas por filamentos gruesos y algunos finos superpuestos. La actina, la troponina y la tropomiosina de los filamentos finos y la miosina II de los gruesos son las proteínas primarias del aparato contráctil muscular. Además, existen también una serie de proteínas accesorias que mantienen la alineación precisa de los filamentos finos y gruesos como son la desmina, filamina, etc. (Ross, 2007).

2.1.1. Mecanismos moleculares y bioquímicos que participan en la transformación del músculo en carne.

El proceso de conversión del músculo en carne está compuesto por tres fases (Sentandreu, 2002): la fase *pre-rigor* durante la cual el músculo permanece excitable y se correspondería con la fase de supervivencia del sistema nervioso (Chrystall, 1985); el *rigor*, en la que los componentes energéticos (adenosín trifosfato (ATP), fosfocreatinina, glucosa) se agotan; y por último la fase *post-rigor* de maduración o

tenderización de la carne en la que se produce una desestructuración de la arquitectura muscular (Figura 3).

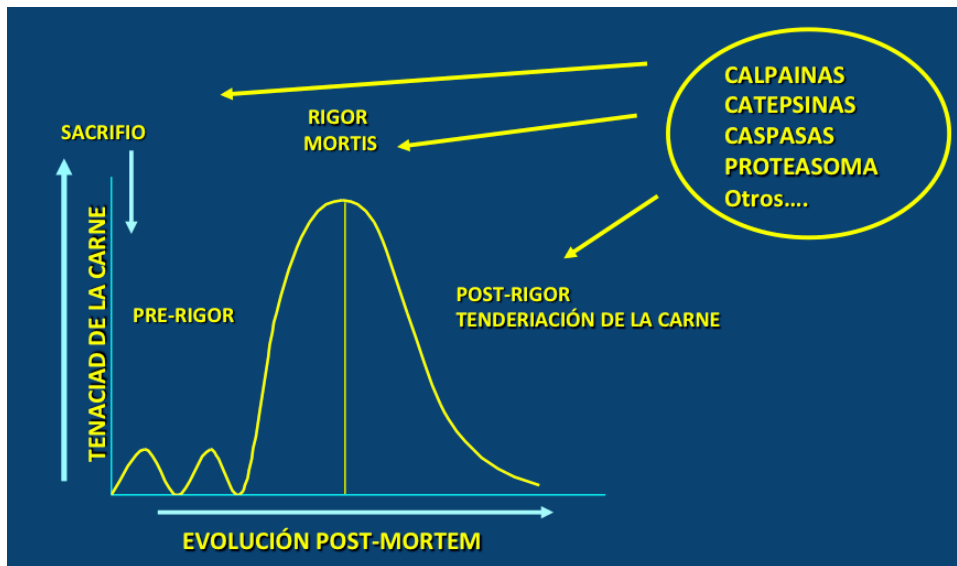


Figura 3. Esquema de las etapas de la conversión del músculo en carne. Fase *pre-rigor* (el músculo permanece excitable), fase *rigor* (agotamiento de los componentes energéticos) y fase *post-rigor* (maduración o tenderización). Todas las etapas se encuentran influenciadas por la actuación de distintas macromoléculas como son las calpaínas, catepsinas, caspasas, proteasoma, etc.

Tras el sacrificio del animal, como consecuencia del desangrado, se produce un descenso abrupto del aporte de oxígeno y nutrientes al músculo, lo que producirá un descenso gradual y progresivo de la energía disponible. En estas circunstancias, el músculo se ve obligado a utilizar las reservas de glucógeno para sintetizar ATP a partir de glucosa, con el fin de mantener su temperatura e integridad estructural, produciéndose gradualmente un cambio del metabolismo aerobio al anaerobio. A medida que se van reduciendo los niveles de ATP, se genera fosfato inorgánico que estimula la degradación de glucosa a piruvato. Esta ruta en ausencia de oxígeno continúa hasta la formación de ácido láctico, cuyo incremento provoca un descenso gradual del pH muscular, que continuará hasta que se agoten las reservas de glucógeno o se inactiven los enzimas que rigen el metabolismo muscular. Cuando se agotan las reservas musculares, la desaparición del ATP que mantiene la integridad estructural del músculo provoca una lenta despolarización de las membranas. Se produce entonces un incremento en la fuerza iónica, en parte debido a la incapacidad de funcionamiento de las bombas de Ca^{+2} , Na^{+} y K^{+} ATP-dependientes, lo que ocasiona la salida de Ca^{+2} del

retículo sarcoplásmico al espacio miofibrilar, además de disminuir la capacidad celular de mantener las condiciones reductoras. Estos iones Ca^{+2} reaccionan con la troponina que, como respuesta, modifica su configuración, desbloqueando los sitios activos de la actina a los que se unía. Al quedar éstos libres, las cabezas de miosina se unen a la actina, dando lugar a una unión irreversible entre ambas, justo en los puntos ocupados antes por la troponina (Paniagua, 1996). De esta forma, los filamentos finos se superponen sobre los gruesos, produciéndose un acortamiento muscular (acortamiento del sarcómero), sin que haya acortamiento de los filamentos finos sino sólo desplazamiento. La formación de actomiosina da lugar a una tensión y rigidez muscular que conduce a la instauración del *rigor mortis* o rigidez cadavérica. Tras el *rigor* comienza la etapa de tenderización, que produce la mejora de la ternura de la carne como consecuencia fundamentalmente de la rotura de la estructura miofibrilar por parte de sistemas proteolíticos endógenos que juegan un papel determinante en este proceso (Huff Lonergan et al., 2010; Ouali, 1992; Sentandreu, 2002; Weaver et al., 2009).

Sin embargo, a pesar del conocimiento acumulado a lo largo de los años sobre los procesos que conducen a la instauración del *rigor mortis* y los que ocurren durante el período de maduración *post-rigor*, no se ha conseguido explicar de forma definitiva la variabilidad en la tenderización de la carne, de forma que en los últimos años están surgiendo hipótesis que abren la puerta a nuevos campos de investigación, a través de una reconsideración del proceso de conversión de músculo en carne. La información obtenida en estudios relacionados con diversas patologías como el cáncer, Alzheimer, enfermedades neuromusculares, etc. (Hengartner, 2000; Majno and Joris, 1995; Tews, 2005), que transcurren en condiciones similares de estrés e isquemia a las que se producen en las primeras horas tras la muerte y desangrado del animal, parece apuntar a que los cambios en la estructura celular y proteica que se observan en el músculo tras la muerte del animal y que aún no han sido explicados, pero que podrían serlo por procesos de muerte celular programada (MCP) (Ouali et al., 2006). Estos procesos se han observado en tejidos vivos sujetos a condiciones de isquemia y se trata de estrategias que inducen el “suicidio” o muerte de algunas de sus células, con el objetivo último de asegurar la supervivencia del tejido y evitar daños mayores.

Se han descrito diferentes tipos de MCP (MCP tipo I y MCP tipo II) o no programada (necrosis). Su prevalencia en el tejido muscular dependerá de las condiciones pre- y post-sacrificio y puede afectar enormemente al proceso de

conversión del músculo en carne y por tanto, a la adquisición final de un grado de ternura y calidad óptimo. Se desconoce el mecanismo de señalización que lleva a esos procesos de MCP tras el desangrado del animal, pero este primer paso puede ser de crucial importancia, puesto que todas las modificaciones posteriores que contribuyen a la transformación de músculo en carne dependerán de estos eventos tempranos. Por tanto, se hace muy importante el estudio del *pre-rigor* y, más concretamente, de los procesos que ocurren en momentos muy tempranos tras la muerte, ya que en apoptosis desde que ocurren los primeros cambios mitocondriales hasta la activación de las caspasas (principal sistema proteolítico efector de apoptosis) sólo transcurren 10 minutos, aunque el proceso completo hasta la total destrucción celular puede durar horas o incluso días, pero una vez que ésta ha comenzado, la muerte celular es inevitable (Green, 2005).

2.1.2. Principales sistemas proteolíticos implicados en la tenderización.

A pesar de conocerse que la degradación proteolítica es responsable de la mejora de la ternura o tenderización de la carne a lo largo de la maduración, existe sin embargo, un importante debate sobre el papel y la relevancia de los principales sistemas proteolíticos implicados en este proceso. Hasta el momento, la mayor parte de los estudios se han centrado en analizar la contribución relativa de tres sistemas proteolíticos celulares: 1) las calpaínas (dependientes de calcio) y sus inhibidores endógenos las calpastatinas, consideradas por muchos como el sistema proteolítico de mayor influencia en el proceso, especialmente en el *post-mortem* temprano, ya que su actividad declina con la acidificación sucesiva del pH del músculo; 2) las catepsinas (enzimas lisosomales) activas a pHs más ácidos que las anteriores y por tanto más importantes en fases más tardías de la maduración *post-mortem*, así como sus inhibidores endógenos, las cistatinas; y 3) el sistema ubiquitina-proteosoma (dependiente de ATP). Recientemente, se han propuesto otros sistemas proteolíticos como caspasas y metaloproteinasas (Sentandreu, 2002) tanto por su capacidad proteolítica sobre el músculo esquelético, como por sus posibles implicaciones en los procesos de muerte celular. Lo más probable es que, al igual que la integridad y funcionalidad de las células musculares no depende de una única proteína, sino de una interacción coordinada de varias, el debilitamiento estructural de las células musculares

durante la maduración *post-mortem* no va a depender únicamente de un sistema enzimático sino de la interacción de varios (Sentandreu, 2002).

2.1.2.1. Calpaínas

La familia de las calpaínas está compuesta por 14 miembros de cisteín-proteasas no lisosomales activadas por calcio (Goll et al., 2003), además de por los inhibidores endógenos de las mismas, las calpastatinas. Las dos isoformas mejor caracterizadas de las calpaínas son μ - y m- calpaínas, cuyos nombres hacen referencia a sus requerimientos de calcio tienen para activarse.

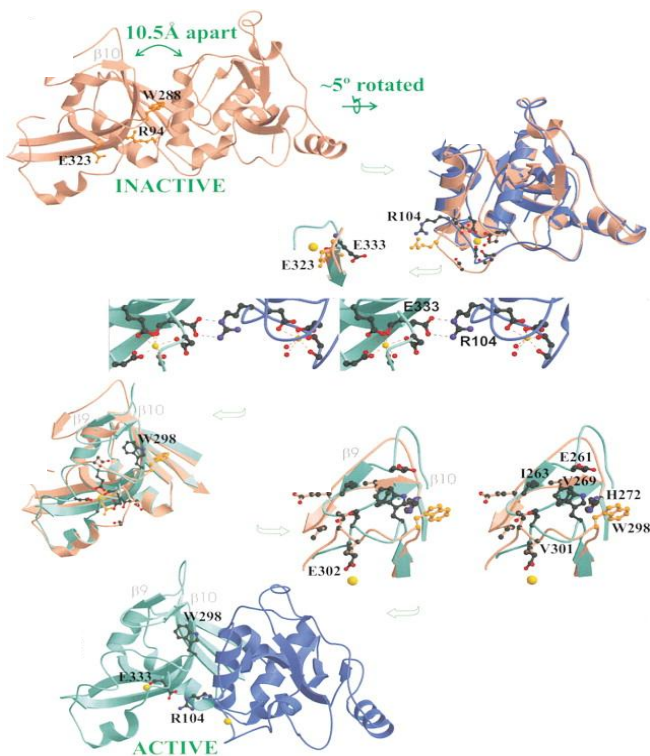


Figura 4. Esquema de los cambios conformacionales que experimenta la calpaína tras la unión del Ca^{2+} . Adaptado de Moldoveanu (Moldoveanu et al., 2002).

En general, en condiciones *in vitro*, la μ -calpaína requiere concentraciones de entre $5 \cdot 10^{-3}$ y $6,5 \cdot 10^{-2}$ mM de Ca^{+2} mientras que la m-calpaína requiere entre 0,25 y 1 mM de Ca^{+2} (Goll et al., 1992). Estas calpaínas son heterodímeros formados por dos subunidades, una subunidad catalítica de 80 kDa, responsable de su actividad proteolítica, y una subunidad reguladora de 28 kDa. La subunidad pequeña es idéntica en ambas, mientras que la catalítica es similar pero está codificada por distintos genes (Suzuki et al., 1981). Como sus actividades proteolíticas son potencialmente deletéreas para la célula, las calpaínas están estrechamente reguladas y se suponen inactivas la

mayor parte del tiempo (Goll et al., 2003). En ausencia de calcio, los residuos que forman la unidad catalítica están muy apartados entre sí para evitar la formación del sitio activo, debido a la presencia de puentes salinos con otras partes de la molécula. Cuando el calcio se une, estos puentes salinos se rompen permitiendo la unión de los residuos que forman el centro activo. Posteriores uniones de calcio a ambos lados de la hendidura catalítica, completan el proceso, apareciendo un centro activo completo (Figura 4) (Moldoveanu et al., 2002). Aunque requieren calcio para activarse, las calpaínas sufren auto-proteólisis en presencia de éste (Cong et al., 1989). La forma autolisada de la subunidad grande de 76 kDa, que se forma a través de un intermediario de 78 kDa es activa y muestra requerimientos de calcio menores que la forma nativa, aunque la autólisis también hace que el enzima sea menos estable y finalmente produce una pérdida de actividad (Goll et al., 2003).

En la célula, el sistema calpaínico cubre un amplio rango de funciones fisiológicas, que incluyen proteólisis de proteínas envueltas en el ciclo celular, apoptosis, organización del citoesqueleto y señales de transducción. Además, están envueltas en numerosos procesos durante la diferenciación, vida y muerte celular (Goll et al., 2003). Así, las calpaínas están activas en todos los estadios que se suceden como respuesta al estrés celular, conduciendo a resultados diferentes dependiendo del momento específico, del compartimento donde el enzima es activado y las funciones específicas de las células.

En el tejido muscular se expresan fundamentalmente tres tipos distintos de calpaínas: las ubicuas (μ - y m - calpaína) y la calpaína 3/p94 que está activamente expresada en este tejido. Con respecto a la tenderización de la carne, durante décadas las calpaínas han centrado el interés de la mayoría de las investigaciones, debido a que estos enzimas citosólicos tienen acceso a las miofibrillas, no requieren ATP para su activación y reproducen *in vitro* los cambios observados en las miofibrillas, siendo capaces de alterar la densidad de la línea-Z, proceso que se observa normalmente durante la desestructuración *post-mortem* del músculo (Koochmaraie et al., 1987); (Huff-Lonergan, 1996; Koochmaraie, 1988). Además, el hecho de que en músculo bovino y ovino se produzca un descenso significativo de la actividad de μ -calpaína en el *post-mortem*, permaneciendo la m -calpaína más o menos estable, llevó a Koochmaraie y cols. (Koochmaraie et al., 1987) a concluir que es la μ -calpaína y no la m -calpaína la principal responsable de la tenderización. Dicha asunción ha sido apoyada por estudios

posteriores (Geesink et al., 2006) realizados con ratones knock-out para μ -calpaína, donde apenas se encontró proteólisis *post-mortem*.

Debido a su baja especificidad, las calpaínas no degradan proteínas hasta sus aminoácidos constituyentes y tampoco degradan las proteínas miofibrilares mayoritarias (actina y miosina). Sin embargo, se ha hipotetizado que su papel en el músculo es iniciar la proteólisis específica de determinadas proteínas miofibrilares como titina y nebulina y también de los filamentos intermedios (desmina) durante las primeras 24 h *post-mortem* (Koohmaraie, 1992). Incluso algunos autores apuntan que éstas contribuyen al 95% de la tenderización *post-mortem* inducida por proteasas (Delgado et al., 2001). Uno de los modelos propuestos (Goll et al., 2003; Neti et al., 2009) sugiere que las calpaínas catalizan la liberación de los miofilamentos de las miofibrillas y los hacen disponibles al proteosoma y a los enzimas lisosomales para la completa degradación hasta sus aminoácidos constituyentes. De hecho, existen algunos trabajos que muestran evidencias de que, en el tejido muscular vivo, las calpaínas actúan en colaboración con el proteosoma y las proteasas lisosomales en la degradación de proteínas sarcoméricas y del citoesqueleto (Purintrapiban et al., 2003).

2.1.2.2. Catepsinas.

Las catepsinas son una familia de endo y exo-peptidasas localizadas en los lisosomas y activas a pHs ácidos (desde 3,5 hasta 6,5) que comprenden cisteín- (catepsinas B, H, L, X, etc.), aspartil- (catepsina D y E) y serin- (catepsina G) peptidasas. Éstas son sintetizadas como pro-enzimas que mediante una serie de cortes específicos en sus extremos amino, bien por autoproteolisis o bien por la acción de otras proteasas, son transformadas en enzimas activos (Turk et al., 2000). Las catepsinas poseen un alto poder hidrolítico, pudiendo alcanzar concentraciones celulares de más de 1 mM. Su actividad es controlada por numerosos factores tales como el pH, el potencial redox, la activación de determinados precursores, o la concentración de sus inhibidores endógenos, las cistatinas. Durante mucho tiempo se pensó que eran responsables únicamente de la degradación inespecífica intra-lisosomal, debido a su bajo pH óptimo, y a que están confinadas en dicho compartimento. Sin embargo, su alto potencial hidrolítico, junto con su capacidad para actuar fuera de los lisosomas, las implican en

numerosas funciones celulares en la mayoría de tejidos y tipos celulares, tales como la iniciación de procesos de MCP, activación y procesamiento de hormonas y otros enzimas, la remodelación del hueso, etc. (Brix et al., 2008). Su desregulación bajo condiciones anormales para la célula, conduce a la aparición de muchas enfermedades como cáncer, aterosclerosis, Alzheimer, esclerosis múltiple o desórdenes musculares (Kirschke et al., 1995) de un modo directo, por la degradación de la matriz extracelular, o de un modo indirecto, activando a otras proteasas (Kos and Lah, 1998). También están implicadas en miopatías inflamatorias donde, junto con la acción de otras peptidasas, constituyen un importante mecanismo de degeneración de fibras musculares (Kumamoto et al., 1997).

En el músculo, se expresan distintas catepsinas: seis cisteín peptidasas (catepsina B, L, H, S, F y K) y una aspartil proteasa (catepsina D). Existe una gran controversia sobre la posible implicación de ellos en los procesos de tenderización *post-mortem*. Las principales objeciones son que son enzimas confinados en los lisosomas, y por tanto, no tienen acceso a las miofibrillas (Hopkins and Thompson, 2002), que durante la maduración *post-mortem* no se observa degradación de actina y miosina (sus principales sustratos) (Koohmaraie et al., 1991) y por último, que no se han observado relación entre la actividad de catepsinas y la variabilidad en la terneza de la carne (Whipple et al., 1990). Sin embargo, diversos estudios las han implicado en el proceso de tenderización *post-mortem*. Así, se encontró que la actividad de catepsinas, especialmente de B, H, y L se correlaciona con la terneza desde las 24 horas *post-mortem* hasta el final del período de maduración de la carne (Johnson et al., 1990; O'Halloran et al., 1997; Thomas et al., 2004). Por otro lado, estudios histoquímicos han demostrado que con la maduración *post-mortem* se produce una rotura lisosomal, que es casi completa a los 14 días (Zeece, 1992), observándose además un cambio considerable en la actividad de estos enzimas de la fracción lisosomal a la fracción citosólica (O'Halloran et al., 1997). Una posible explicación de esta rotura lisosomal puede ser el descenso de pH cuando la temperatura de la canal es todavía alta o como consecuencia de la alteración de las bombas iónicas de la membrana lisosomal durante el *rigor* (Sentandreu, 2002).

2.1.2.3. Proteosoma.

El proteosoma (26S) es un complejo proteico multicatalítico que se encarga de destruir proteínas dañadas y controlar la concentración de determinadas proteínas necesarias para los procesos celulares. Para la destrucción de las proteínas seleccionadas, éstas deben ser previamente marcadas con una cadena de ubiquitina que permite al proteosoma identificarlas, requiriendo este paso ATP (Taillandier et al., 2004). Una vez que una molécula de ubiquitina se añade a una proteína a eliminar, gracias a la enzima ubiquitina ligasa, se empiezan a agregar más ubiquitinas, dando como resultado la formación de una cadena poliubiquitínica que permite al proteosoma identificar y degradar dicha proteína.

Estructuralmente, un proteosoma es un complejo con forma de barril (Figura 5) que contiene un "núcleo" compuesto de cuatro anillos apilados alrededor de un poro central que es la estructura catalítica (20S). Cada uno de estos anillos está compuesto por siete proteínas individuales. Los dos anillos internos contienen subunidades proteicas β , conformando los sitios activos de las proteasas. Estos sitios se encuentran en las caras internas de los anillos, de manera que la proteína a degradar tenga que entrar por el poro antes de ser procesada. Los dos anillos exteriores contienen subunidades α , cuya función es mantener una "puerta" por la cual las proteínas puedan entrar al barril. Las subunidades α son controladas por partículas reguladoras (19S), a veces llamadas "pestañas", que reconocen los compuestos poliubiquitínicos en los sustratos de las proteínas e inician el proceso de degradación. El proceso de ubiquitinación más el proceso de degradación proteosómica recibe el nombre de sistema ubiquitin-proteosoma.

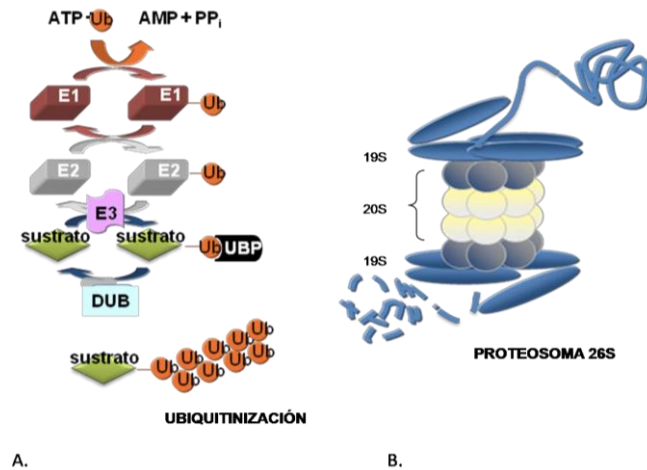


Figura 5. Sistema de degradación proteica ubiquitina-proteosoma (UP). El sistema ubiquitina- proteosoma degrada la mayor parte de las proteínas celulares de vida media corta, las cuales tienen funciones celulares claves, consecuencia de un mal plegamiento, modificación anormal en su estructura o daño de forma dependiente de energía. La ubiquitina (Ub) es añadida a las proteínas diana por un mecanismo de tres pasos que implica la acción secuencial de los enzimas E1, E2 y E3 (A). Representación de la estructura básica del proteosoma de 26S (B); la estructura catalítica de 20S se localiza entre dos estructuras reguladoras de 19S. Adaptado de Ohsumi (Ohsumi, 2001).

En las células eucariotas, este sistema juega un papel determinante en la proteólisis no lisosomal (Attaix et al., 2001; Coux et al., 1996). La degradación proteosómica es un mecanismo esencial para varios procesos celulares como el procesamiento antigénico (Stoltze et al., 2000), la diferenciación celular (Baz et al., 1997) y la apoptosis (Anderson, 2000; Pasquini et al., 2000). También está implicada en la degradación muscular acelerada asociada a ciertas enfermedades (Lecker et al., 1999). Se sabe que el proteosoma tiene un papel muy importante *in vivo* en la degradación del tejido muscular (Goll et al., 2008), aunque no está aún muy claro su papel en la proteólisis *post-mortem*, si bien es cierto que el proteosoma tiene la capacidad de mantenerse activo en condiciones de pH, temperatura y fuerza iónica similares a las condiciones presentes en la carne. Sekikawa (Sekikawa, 2001) mostraron que, en músculo bovino, inmediatamente después del sacrificio hay ubiquitina y complejos ubiquitina-proteína que son degradados por el proteosoma. Además, una vez que se produce la depleción de ATP se produce la disociación reversible del complejo proteosoma 26S en los dominios de 20S y de 19S. La subunidad 20S no requiere ni ATP ni ubiquitina (Peters et al., 1994), lo que junto con sus altos niveles de expresión en el músculo esquelético ha llevado a varios grupos a hipotetizar que podría contribuir a la proteólisis *post-mortem* postulando que al igual que las calpaínas, podría estar

implicado en la degradación de las líneas Z y M de las miofibrillas (Taylor et al., 1995).

En condiciones *in vitro*, se ha visto que las proteínas miofibrilares y las miofibrillas en sí mismas son degradadas tras tratarlas con proteosoma 20S purificado. Además otros autores (Robert et al., 1999; Taylor et al., 1995) encontraron que los proteosomas bovinos podían degradar proteínas miofibrilares como nebulina, miosina, actina y tropomiosina. Un estudio realizado en carne de avestruz (Thomas et al., 2004) demostró una actividad importante del proteosoma en el tejido, después de 12 días de maduración, así como de las catepsinas D, B, L y H. Otros estudios en carne de bovino encontraron alta actividad del proteosoma 20S a pHs por debajo de 6 a los 7 días *post-mortem* (Lamare et al., 2002). Sin embargo Jia y cols. (Jia et al., 2006) encontraron que, a las 24 horas *post-mortem*, ya había comenzado la degradación de varias de las subunidades del proteosoma. Houback y cols. (Houbak et al., 2008) demostraron, utilizando un inhibidor del proteosoma, que en ausencia de éste no se observaba degradación *post-mortem* de troponina T o nebulina, aunque Koohmaraie y Geesink (Koohmaraie and Geesink, 2006) afirmaron que el patrón de degradación de las proteínas miofibrilares incubadas con proteosoma 20S no es el mismo que el que se observa en el músculo. Por tanto, la capacidad de este sistema de degradar las mismas proteínas y del mismo modo que la degradación *post-mortem* aún está en duda, al igual que la relación de esos cambios con la calidad final de la carne.

2.2. CALIDAD DE LA CARNE.

La calidad es un término complejo de definir. El concepto de calidad más extendido es el que la define como “la adecuación al uso”, es decir, la capacidad de un producto para satisfacer las expectativas de los consumidores.

En el caso de un alimento, la calidad engloba diferentes conceptos:

- *Calidad higiénico-sanitaria*: que no presente contaminación microbiana ni sustancias tóxicas.

- *Calidad nutritiva*: que aporte los nutrientes necesarios para satisfacer las necesidades del organismo.

- *Calidad organoléptica*: que ofrezca durante su consumo cierta cantidad de sensaciones satisfactorias de carácter sensorial.

- *Calidad tecnológica*: que mantenga las características necesarias para el desarrollo de determinados procesos de transformación en la industria y de manejo y conservación.

- *Calidad de servicio*: que tenga ciertas cualidades culinarias o cierto formato de presentación que permita que sea fácil de preparar y/o consumir.

- *Calidad simbólica*: que posea ciertas características que el consumidor asocie con una mayor calidad como por ejemplo, crianza en campo frente a cebadero, producto fresco frente a congelado, imagen de una determinada marca, etc.

2.2.1. Parámetros indicativos de calidad.

Atendiendo a las distintas definiciones de calidad, existen diversos parámetros y atributos indicativos de la calidad de la carne, como son, el pH, el color, el contenido en pigmentos, la flora bacteriana, la CRA, la composición química y energética, los niveles de oxidación lipídica, propiedades de textura, atributos sensoriales como olor, gusto, aromas percibidos durante la masticación, etc. Dichos atributos de calidad no pueden considerarse independientes, ya que están muy relacionados entre sí y su interacción proporciona las características globales de calidad de carne.

De todos ellos, los principales indicadores de la calidad tecnológica y organoléptica de la carne que vamos a considerar son:

- El *pH*, que se define como el logaritmo negativo de la concentración de protones de un producto. Su valor se expresa en una escala de 0 (ácido) a 14 (básico). Es un atributo determinante de la calidad de la carne, ya que afecta a los procesos bioquímicos que tienen lugar durante la transformación del músculo en carne, influyendo directamente sobre la estabilidad y propiedades de las proteínas y sobre las características físico-químicas de la carne. Tras la muerte del animal, una vez que se corta el flujo sanguíneo, se genera ATP mediante la glucólisis anaeróbica a partir de la glucosa almacenada en el músculo en forma de glucógeno. La acumulación de metabolitos intermedios de esta vía, en particular ácido láctico y otros ácidos orgánicos,

provoca un descenso del pH muscular. La evolución del pH tras el sacrificio puede tener un profundo efecto sobre las propiedades sensoriales y tecnológicas de la carne, afectando al color, la textura y el grado de exudación, así como a la degradación proteolítica de la carne.

- El *Color*, es una de las cualidades más importantes de la carne, ya que es el primer atributo que el consumidor puede apreciar y por lo tanto motivará su aceptación y opción de compra. El color de la carne dependerá de la estructura y tipo de músculo, de la concentración de pigmentos hemínicos (principalmente mioglobina) que contenga el músculo y del estado de oxidación de los mismos. El contenido de mioglobina en el músculo depende de diversos factores productivos, tales como especie, raza, edad, músculo, tipo de alimentación, etc., mientras que su estado de oxidación o desnaturalización dependerá de procesos *post-mortem* que se ven afectados por la disminución de la temperatura y la tasa de descenso de pH, así como de los tiempos de almacenamiento y las condiciones de comercialización. Dependiendo del estado de oxidación del átomo de hierro del grupo hemo podemos diferenciar tres formas diferentes del pigmento que proporcionarán distinta tonalidad a la carne (Figura 6).

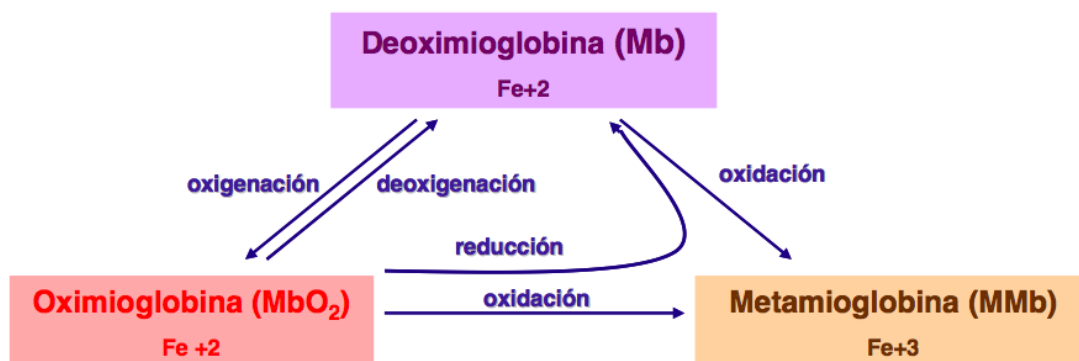


Figura 6. Interconversión redox de los pigmentos de la carne. En ausencia de oxígeno, el pigmento estará en la forma deoximioglobina o mioglobina reducida (Mb) que tiene un color rojo-púrpura. En contacto con el aire el pigmento se oxigena y se transforma en oximioglobina (MbO₂), que confiere al músculo una coloración rojo brillante, más atractiva para los consumidores. Tanto la deoximioglobina como la oximioglobina pueden reaccionar con el oxígeno, de modo que se produce la forma oxidada del pigmento llamada metamioglobina (MMb) de color parduzco y apagado, que los consumidores asocian con una pérdida de calidad (Mancini and Hunt, 2005).

- La *CRA*, se define como la habilidad de la carne para retener su contenido acuoso durante la aplicación de fuerzas externas como pueden ser gravedad, corte, calentamiento, picado o presión (Zhang et al., 2005). La parte muscular de los mamíferos contiene alrededor de un 75% de agua, que disminuye como consecuencia de fenómenos de evaporación, pérdidas por gravedad, presión, cocinado, descongelado, etc. Offer y Tricnick (Offer and Trinick, 1983) presentaron evidencias de que la mayor parte del agua en el músculo es retenida por fuerzas capilares entre los filamentos finos y gruesos de las miofibrillas. La *CRA* en carne está en su mínimo cuando se alcanza el punto isoeléctrico de las proteínas (pH entre 5,0-5,5), que es el pH último de la carne tras sufrir el *rigor mortis*. Hamm (Hamm, 1986) propuso cuatro maneras diferentes de medir este atributo: pérdidas por goteo, determinadas por la formación de exudado sobre la carne sin aplicación de fuerzas externas, pérdidas por descongelación, pérdidas por cocinado y jugo exprimible, resultante de la aplicación de fuerzas externas como pueden ser la compresión, centrifugación o succión. Posteriormente, Honikel (Honikel, 1998) describió los métodos de referencia para determinar las pérdidas de jugo por goteo (*drip loss*) en carne cruda y las pérdidas de agua en carne cocinada.

- La *Composición química*, tiene gran relevancia sobre la calidad, ya que la carne es un componente importante de la dieta humana, que aporta un amplio rango de nutrientes: proteínas, grasas, agua, minerales y vitaminas. Además la composición de la carne afecta a su calidad tecnológica, higiénica, sensorial y de servicio. En general, se puede decir que la carne contiene entre 71 y 75% de agua, de un 20 a un 23% de proteínas, de 1 a 6% de grasa, un 1% de sustancias minerales y menos de un 1% de hidratos de carbono. Sin embargo, hay muchos factores que influyen sobre la composición química de la carne, sobre todo en el contenido graso, como la especie, raza, genotipo, estado fisiológico, dieta, sistema de manejo, tipo de músculo, etc. Estos factores no sólo afectan al contenido total de grasa intramuscular, sino también al perfil lipídico de la misma, que tiene gran interés desde el punto de vista de la salud humana, pudiendo además tener efectos sobre determinados atributos sensoriales como el flavor, la textura y el color, y afectará a la estabilidad oxidativa de la carne durante la maduración *post-mortem* (Farmer, 1994);(Wood, 2003).

- *Calidad Sensorial*. El análisis sensorial se basa en un conjunto de técnicas que permiten valorar las propiedades sensoriales de un alimento, es decir, los atributos de ese alimento que se pueden detectar por medio de los sentidos. A pesar de que existen

numerosos métodos analíticos de laboratorio que permiten medir, con precisión, diversos parámetros que definen la calidad de los alimentos, cada vez se tiene más en cuenta que sólo los catadores humanos pueden integrar todas las sensaciones sensoriales que va a percibir el consumidor, de modo que el análisis sensorial es una herramienta útil, necesaria y complementaria de otros análisis instrumentales o químicos. En todo estudio de análisis sensorial, al ser los instrumentos de medida los seres humanos, es necesario cumplir escrupulosamente determinadas pautas de actuación, evitando al máximo las fuentes de variación o error, por lo que la obtención de medidas objetivas que aporten una información precisa y reproducible exige un control riguroso de los métodos y condiciones de las pruebas y la aplicación de un diseño experimental correcto (Guerrero, 1998). Los principales componentes de la palatabilidad de la carne que se suelen evaluar son terneza, jugosidad, calidad e intensidad de olor y flavor, masticabilidad y apreciación global (Monson et al., 2005; Serra et al., 2008). En los estudios de consumidores se realizan valoraciones hedónicas de atributos básicos como son flavor, jugosidad, terneza y aceptabilidad global (Font I Furnols, 2009; Monson et al., 2005).

- El *Estado oxidativo*. Las modificaciones que se van produciendo a lo largo de la maduración *post-mortem* en las biomoléculas musculares incluyen un descenso de la defensa antioxidante y un incremento del grado de oxidación de lípidos y proteínas por la acción de radicales libres (Renerre et al., 1999), con consecuencias sobre la calidad sensorial y la textura final de la carne. En el músculo, la oxidación lipídica se inicia a nivel de las fracciones de fosfolípidos de membrana, debido principalmente a sistemas autocatalíticos de radicales libres en cadena. Se sabe, además, que la oxidación de las proteínas altera su estructura secundaria y terciaria y puede conducir a la formación de agregados (Grune et al., 2004) y en ocasiones inactivación de enzimas, lo que puede afectar negativamente a la tenderización de la carne. Para tratar de contrarrestar los efectos de la oxidación, existen en las células una serie de enzimas antioxidantes como son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y el tándem glutatión peroxidasa/reductasa (GSH-Px/GSH), que son capaces de neutralizar la energía de las EROs metabolizando los radicales libres o sus intermediarios reactivos, transformándolos en productos sin efectos nocivos para los tejidos.

2.2.2. Factores que afectan a la calidad de la carne.

La calidad de la carne depende de diversos factores intrínsecos propios del animal (raza, genotipo, sexo y edad) y extrínsecos o ligados al proceso productivo (alimentación y castración), además de otros relacionados con el manejo del animal y la canal en los momentos previos y posteriores al sacrificio (transporte, tiempo de espera, ayuno, estrés, método de aturdimiento, sangrado, enfriamiento de la canal, tiempo de maduración, envasado, etc.).

Todos los animales destinados a la producción de carne van a sufrir ciertos niveles de estrés en el transporte, el manejo y en el sacrificio, y esto puede tener efectos negativos sobre la calidad del producto.

Desde que los animales salen de la granja hasta que son sacrificados están expuestos a numerosos estímulos que perturban su homeostasis y generan respuestas adaptativas para restaurar el equilibrio. Dicha respuesta es muy variable entre individuos, que no sólo no perciben el estrés de igual modo, sino que coordinan de diferente modo su respuesta al mismo (Moberg, 2001). Esto se encuentra modulado por distintos factores intrínsecos del animal como genética, sexo, edad, estado fisiológico y además, por experiencias anteriores y aprendizaje adquirido (Boissy, 1995; Moberg, 2001).

El estrés que sufren los animales antes del sacrificio provoca cambios en la composición de metabolitos (fosfocreatina, glucógeno), cambios en la temperatura y pH al sacrificio (Warner, 2000; Warner, 2005) y también cambios en la actividad del retículo sarcoplásmico afectando especialmente al transporte de calcio, lo que puede alterar la glucólisis produciendo un consumo excesivo de glucógeno muscular (Mach et al., 2008). El nivel de depleción de glucógeno puede depender de infinidad de factores de manejo, tales como el cansancio físico y el estrés al que se someta el animal (Immonen and Puolanne, 2000; Nockels et al., 1996), el tiempo que dure el transporte, el manejo aplicado durante el transporte de los animales desde la granja al matadero (Arthington et al., 2003; Schaefer et al., 1997), las condiciones de carga y descarga de los animales, el tiempo de espera en el matadero (Warriss, 2003), las temperaturas extremas (Kreikemeier et al., 1998; Silva et al., 1999), la ruptura de grupos sociales establecidos o reagrupación de animales de distinta procedencia (Apple et al., 2005), la

exposición a un ambiente nuevo (Hambrech et al., 2005; Mounier et al., 2006) y la privación de agua y alimento. La concentración de glucógeno también varía notablemente en el momento del sacrificio, dependiendo de la tasa de alimentación (Bee et al., 2006; Gardner and Thompson, 2003; Schaefer et al., 1997), peso vivo (Smith and Dobson, 1990), estado nutricional, tipo de músculo y fibras musculares (Hambrech et al., 2005), capacidad tamponadora del músculo (Immonen and Puolanne, 2000; Silva et al., 1999), sexo (Hoffman et al., 1998; Shackelford et al., 1994), raza (Gardner and Thompson, 2003) y temperamento propio de los animales (Gardner and Thompson, 2003; King et al., 2006).

Todos estos factores pueden tener un gran efecto sobre diferentes atributos de calidad como son cambios en pH, (Warner, 2005), en terneza, color, CRA y también sobre la maduración de la carne (Gregory; Gregory, 2003) y pueden determinar la aparición de carnes oscuras, duras y secas conocidas como DFD en inglés “Dark, Firm, Dry”, con un pH elevado y unas características de color, CRA o textura que no son las deseables (Ahn et al., 2001; Viljoen et al., 2002).

2.3. EL ESTRÉS OXIDATIVO.

La incuestionable ventaja evolutiva que supone, desde el punto de vista energético, la utilización del oxígeno molecular como último aceptor de electrones en la cadena de respiración mitocondrial para la síntesis del ATP, se contrapone a su alta potencialidad citotóxica, pues de su reducción univalente se generan radicales libres, como son las EROs.

Los radicales libres son átomos o moléculas extremadamente reactivas debido a que tienen en el orbital más externo de su estructura uno o más electrones desapareados lo cual les lleva a interactuar ávidamente con otras moléculas. De esta forma las EROs pueden establecer reacciones en cadena por medio de varios transportadores que se oxidan y se reducen secuencialmente. Los radicales libres, por lo tanto, son resultado de procesos fisiológicos propios del organismo, pero también pueden ser generados por factores ambientales, tales como la contaminación industrial, el tabaco, la radiación, los medicamentos, los aditivos químicos en alimentos procesados y los pesticidas. Entre los orgánulos celulares de generación de radicales libres se incluyen principalmente las

mitocondrias, los lisosomas, así como las membranas nucleares, citoplasmática y la del retículo endoplásmico (Turrens, 2003). El sistema antioxidante es esencial en el mantenimiento de la homeostasis celular ya que es capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas, (Kregel and Zhang, 2007), mediante la eliminación de EROs.

Cuando el equilibrio entre los radicales libres y las sustancias antioxidantes, denominado “balance oxidativo”, se pierde a favor de los primeros, se desencadenan procesos dañinos que se asocian al desarrollo de numerosas enfermedades. Este proceso define el concepto de “estrés oxidativo”. La destrucción de las moléculas celulares debido a un exceso de EROs, que no han sido neutralizados por la defensa antioxidante del organismo, es lo que se conoce como “daño oxidativo” (Pierrefiche and Laborit, 1995).

Entre las principales EROs se encuentran los radicales superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) e hidroxilo ($\cdot OH$) (Figura 7).

El O_2^- se produce *in vivo* por varias vías. Su principal fuente de producción es la cadena de transporte de electrones de la mitocondria. Una vez formado, dismuta rápidamente a H_2O_2 , el cual no es especialmente tóxico por sí mismo y está en altas concentraciones dentro de las células. El H_2O_2 difunde rápidamente a través de las membranas celulares, de forma que puede llegar fácilmente a sitios distantes de los que fue generado. Sin embargo, en presencia de metales de transición, como pueden ser el Fe^{2+} y el Cu^{2+} , el H_2O_2 se reduce a $\cdot OH$ a través de la reacción de Fenton (Figura 7).

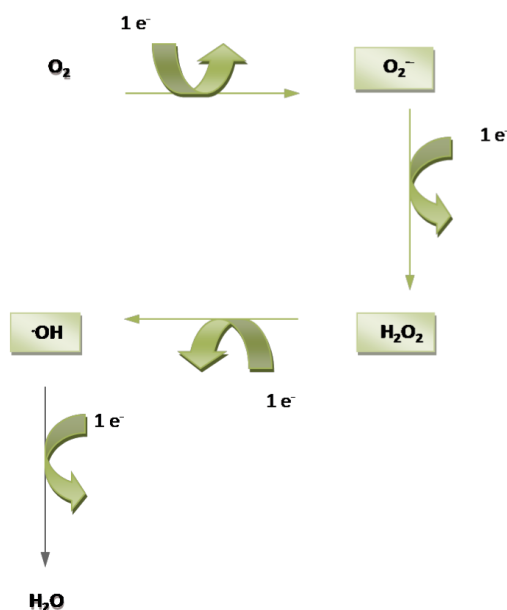


Figura 7. Formación de las principales EROs. Durante la transferencia de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial, el oxígeno molecular recibe 4 electrones de la citocromo C oxidasa y se reduce a agua. Pero una pequeña proporción de oxígeno puede captar un número menor de electrones, formando radicales libres, como el radical superóxido (O_2^-) cuando capta solo un electrón; o el radical hidroxilo ($\cdot OH$) cuando capta solo 3 electrones.

El radical $\cdot\text{OH}$ es la especie reactiva de oxígeno más activa y la mejor estudiada. Podría decirse que una vez formado reacciona rápidamente con cualquier molécula que se encuentre en las cercanías del lugar donde se ha producido. Este radical produce daño en el ácido dextrorribonucleico (ADN), tanto mitocondrial como nuclear, y daña lípidos de membrana y proteínas.

Por otro lado, hay que tener en cuenta que los radicales libres no son sólo moléculas perjudiciales, también juegan un papel fisiológico clave en la homeostasis, como es el caso del óxido nítrico (NO), que participa en la relajación muscular, el control del tono vascular y otras funciones; o el anión O_2^- , que controla la producción de eritropoyetina, participa en el control de la ventilación, en la relajación del músculo liso y en la transducción de señales de varios receptores de membrana que activan funciones inmunes. Los radicales libres también son generados y utilizados por células de defensa como los neutrófilos, monocitos, macrófagos y eosinófilos para eliminar organismos extraños como bacterias y virus (Turrens, 2003).

2.3.1. Daño oxidativo a lípidos.

La oxidación de lípidos se conoce con el nombre de lipoperoxidación (LPO) y representa un fenómeno degradativo consecuencia de la producción y propagación en la cadena de las reacciones mediadas por EROs, afectando mayoritariamente a ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) (Figura 8). Hay cada vez más evidencias de que los aldehídos generados endógenamente durante el proceso de LPO están implicados en la mayoría de los efectos patofisiológicos asociados con el estrés oxidativo en células y tejidos (Esterbauer et al., 1991).

Entre los aldehídos derivados de la LPO, el 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) puede ser producido por el ácido araquidónico, ácido linoleico o sus hidroperóxidos (Esterbauer et al., 1991). 4-HNE presenta un amplio rango de actividades biológicas, incluyendo la inhibición de la síntesis de proteínas y ADN, inactivación de enzimas, estimulación de la fosfolipasa C, expresión de varios genes, etc. Incluso puede reaccionar con proteínas y ADN para generar varios tipos de aductos (Esterbauer et al.,

1991).

Los aldehídos generados a partir de la LPO (Figura 8) son generalmente estables y pueden difundir dentro e incluso escapar de la célula y atacar en dianas lejos del sitio donde se inició el proceso. Esto sugiere que no son sólo productos finales que mantienen los procesos de LPO, sino que también, pueden actuar como mediadores para los radicales libres primarios que inician a LPO.



Figura 8. Proceso de LPO. La LPO se inicia cuando un radical libre abstrae un protón (H^+) de un ácido graso (LH), principalmente poliinsaturado (PUFA), formándose un radical alcoxilo (L^\bullet), cuya reacción con el O_2 forma rápidamente un radical peroxilo (LOO^\bullet). Este último vuelve a atacar a otro LH y formar un hidroperóxido lipídico ($LOOH$) y más radicales alquilo y alcoxilo (LO^\bullet) en la fase de propagación del proceso que funciona en cascada. Cuando dos radicales lipídicos se encuentran sus radicales libres se neutralizan y el proceso de LPO se terminaría.

Cabe destacar la implicación de la LPO en la patogénesis de numerosas enfermedades, incluyendo arterioesclerosis, diabetes, cáncer y artritis reumatoide, así como en la toxicidad asociada a drogas y en el proceso de envejecimiento (Uchida et al., 1999).

2.3.2. Daño oxidativo a proteínas.

Los radicales libres producidos durante el estrés oxidativo pueden dañar el esqueleto peptídico llevando, entre otras modificaciones, a la generación de proteínas carboniladas.

Este proceso es iniciado por la sustracción de un hidrógeno del carbono α en una cadena polipeptídica. Alternativamente, el oxígeno molecular puede atacar al radical del carbono α para formar intermediarios peróxidos llevando finalmente a la formación de péptidos que contienen carbonilos (Dean et al., 1997) (Figura 9).

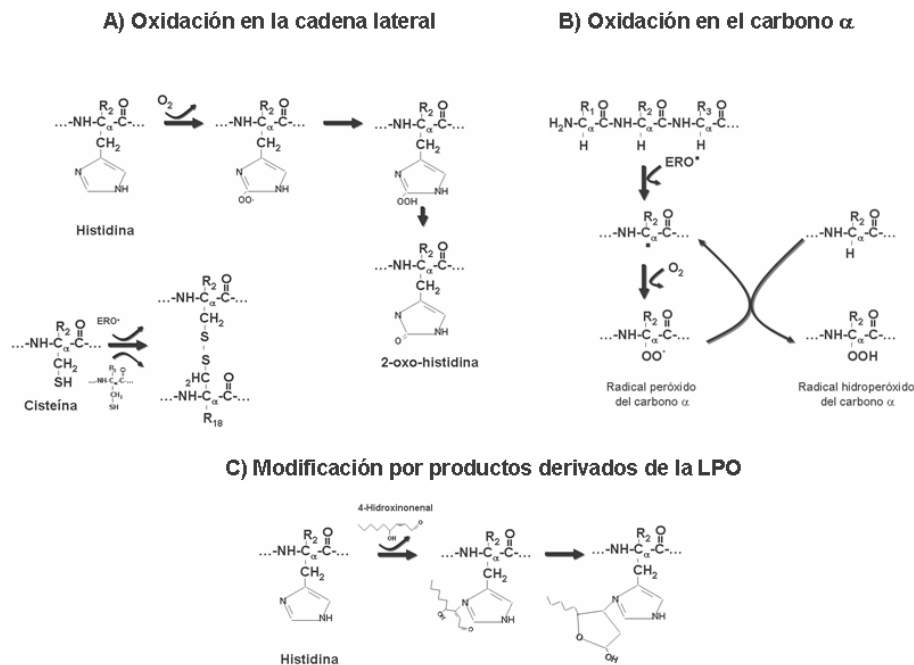


Figura 9. Modificación de polipéptidos. La oxidación de la cadena lateral (A) y del carbono α (B) forma parte de los primeros pasos hacia la formación de proteínas carboniladas que puede iniciarse a partir de la oxidación catalizada por metales, como por ejemplo en el caso de la histidina, o por un ambiente con un alto contenido en EROs, como en el de la cisteína. Los derivados de la LPO también pueden interaccionar con las cadenas laterales de los aminoácidos, formando aductos que pueden llegar a inactivar la función de la proteína (C). Adaptado de Dean et cols. (Dean et al., 1997) y Uchida (Uchida, 2003).

2.3.3. Daño oxidativo al ADN.

El daño oxidativo al ADN puede resultar de reacciones con las bases de los ácidos nucleicos, los residuos de desoxirribosa o con el esqueleto fosfodiéster. El radical $\cdot\text{OH}$ puede añadir dobles enlaces a las bases nitrogenadas o sustraer átomos de hidrógeno tanto de los grupos metilo como de los residuos de desoxirribosa (Chatgialloglu and O'Neill, 2001).

Las reacciones del radical $\cdot\text{OH}$ con las purinas y las pirimidinas pueden llegar a ser mutagénicas. Además, el daño oxidativo por LPO puede afectar también al ADN, ya que los productos de la LPO, malondialdehído (MDA) y 4-HNE, pueden reaccionar con

los grupos amino exocíclicos de la guanosina, adenosina y citidina, dando lugar a radicales epóxido que son muy reactivos con el ADN, incluso más que los radicales lipídicos parentales (Luczaj and Skrzydlewska, 2003).

2.3.4. Defensa antioxidante celular.

Se define como antioxidante a aquella sustancia que se encuentra en pequeñas concentraciones, comparada con el sustrato oxidable, que inhibe o retarda significativamente la oxidación de dicho sustrato sin perder su propia estabilidad electroquímica.

Debido a que la producción de EROs es un proceso que ocurre de forma natural en las células, éstas presentan una gran variedad de mecanismos antioxidantes, tanto enzimáticos como no enzimáticos, para protegerse de ellos. Los principales enzimas involucrados en la eliminación de EROs son la SOD, la CAT y la GSH-Px (Figura 10).

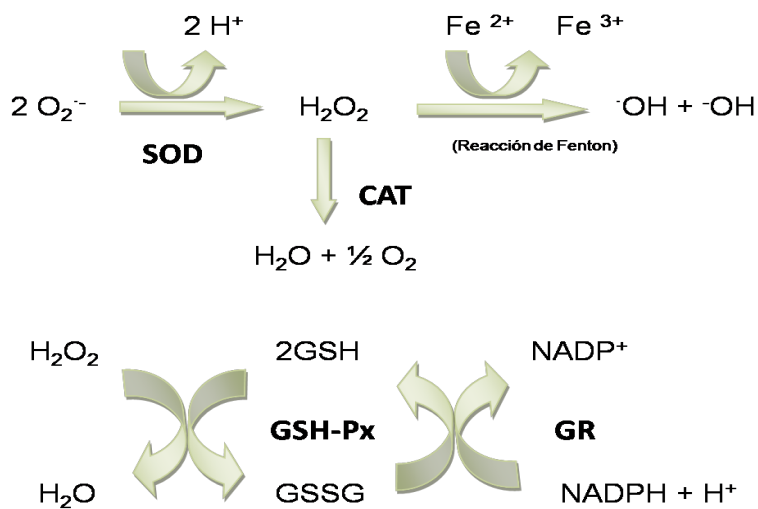


Figura 10. Sistema enzimático de defensa antioxidante. El enzima SOD permite la dismutación rápida del anión superóxido (O_2^-) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), cuya acumulación es evitada por la actividad de dos enzimas: la CAT, que lo transforma en agua y oxígeno molecular, y el tándem GSH-Px/GR. En la reacción de Fenton, catalizada por metales, el H_2O_2 formaría los radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), lo cuales son altamente tóxicos.

Las SODs catalizan la conversión del O_2^- en H_2O_2 y oxígeno molecular (O_2) (Figura 10). En mamíferos, hay muchos tipos de SODs, las cuales difieren en cuanto a su localización celular y a los iones metálicos que necesitan para su función. Por ejemplo, la Cu/Zn SOD está presente en el citosol y en el espacio intermembrana de la mitocondria, y la Mn SOD en la matriz mitocondrial. Ambas enzimas son críticas para la prevención de la toxicidad inducida por EROs (Fridovich, 1997). Por último, no debemos olvidar la existencia de Cu/Zn SODs extracelulares.

Sin embargo, el papel de estas enzimas como antioxidantes pasa siempre por un acoplamiento perfecto con los enzimas encargados de neutralizar el peróxido de hidrógeno producto de la reacción. Si este balance no se produce, por exceso en la actividad de SOD, descenso en la actividad de los enzimas antioxidantes acoplados (GSH-Px y/o CAT) u otros múltiples factores, el enzima SOD destruirá radicales O_2^- , dando lugar a H_2O_2 que por la “reacción de Fenton” darán lugar a los $-OH$, mucho más tóxicos que el primero, y convirtiéndose, por tanto, en un peligroso oxidante.

La CAT y el sistema GSH-Px/GR ayudan a eliminar el H_2O_2 junto con otras moléculas similares (Figura 10). La CAT se encuentra principalmente dentro de compartimentos celulares con membranas, como por ejemplo los peroxisomas y actúa con una baja afinidad por su sustrato, de manera que es mucho más eficiente cuando las concentraciones de H_2O_2 son elevadas. Además, la CAT puede promover interacciones del H_2O_2 con otros compuestos que actúan como donantes de hidrógeno de tal forma que el H_2O_2 se transforma en H_2O y el donante se oxida. En esta ocasión la actividad de CAT se denomina actividad peroxidativa.

En algunas especies, la CAT contiene moléculas de nicotinamida adenosina dinucleótido fosfato (NADPH) ligadas estrechamente al enzima (por ejemplo, en la especie humana una molécula ligada a cada subunidad). El NADPH unido al enzima no está involucrado en su actividad catalítica o peroxidativa, pero esta molécula puede intervenir en la prevención y reversión parcial de la inactivación de la CAT por su propio sustrato tóxico y estabiliza al enzima por tener un efecto alostérico sobre su conformación. Además, la CAT constituye un reservorio de NADPH, lo cual juega un papel importante sobre las reacciones celulares oxido-reductoras (Kirkman and Gaetani, 1984; Kirkman et al., 1987).

El sistema glutatión peroxidasa consiste en varios componentes, incluyendo los enzimas GSH-Px y glutatión reductasa (GR) y los cofactores glutatión y NADPH (Figura 10). La GSH-Px es un flavoenzima dependiente de NADPH, que cataliza la reducción de glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH), el cual será utilizado por la GSH-Px, con alta afinidad de sustrato, para la reducción del H₂O₂.

Las concentraciones de GSH en la célula, no sólo serán utilizadas por la GSH-Px en la eliminación del H₂O₂, pues éste es también de utilidad en la recuperación de las vitaminas C (ácido ascórbico) y E (α -tocoferol) después de participar en la eliminación de radicales libres. El GSH interviene además en la detoxificación de compuestos xenobióticos, el metabolismo de leucotrienos y prostaglandinas, la síntesis de desoxiribonucleótidos, la defensa inmunológica y la proliferación celular, e incluso puede funcionar como segundo mensajero.

Por último, cabe destacar también la existencia de una serie de antioxidantes naturales capaces de eliminar los radicales libres debido a su capacidad para donar un electrón, neutralizando así la toxicidad potencial de estos. Para que una molécula de estas características sea considerada un depurador de radicales, al donar un electrón tiene que formar un radical que no sea tóxico, ya que si no el sistema no serviría. En esta categoría se incluyen antioxidantes obtenidos a partir de la dieta como son; la vitamina E, la vitamina C y el γ -glutamyl-cisteinil-glicina o glutatión reducido (GSH) y la melatonina.

2.3.5. Relación entre el estrés oxidativo y la tenderización.

El proceso de maduración se encuentra fuertemente influenciado por la especie, las condiciones de sacrificio y el tipo de músculo, y está relacionado con el contenido en compuestos ricos en energía (ATP, creatinina fosfato y glucógeno) y la actividad de enzimas glucolíticos en el músculo. A su vez, la oxidación de los productos cárnicos es un factor que está relacionado con el proceso de conversión del músculo en carne y juega un papel fundamental en la pérdida de calidad.

La actividad antioxidante se ha observado disminuida en los tejidos de animales estresados, alterándose gradualmente el balance redox entre moléculas oxidantes y

antioxidantes, y favoreciendo así el daño oxidativo. Los estudios llevados a cabo hasta el momento relacionan un incremento en la formación de EROs como consecuencia de la abrupta caída de oxígeno tras el sacrificio del animal que promueve la inhibición de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Coto-Montes, 2004). El sistema antioxidante se mantiene activo durante más o menos tiempo en función del estrés sufrido, pudiendo observarse diferencias a lo largo de las horas durante el proceso de tenderización. Se ha demostrado que durante la maduración hay una variación en cuanto al tipo y a la proporción de las proteínas implicadas en los procesos metabólicos y estructurales (Polati et al., 2012) afectando al nivel de terniza final del producto.

2.4. AUTOFAGIA.

La autofagia es fundamentalmente un mecanismo de supervivencia adscrito a un sistema constante de reciclaje de estructuras dañadas (Tomas-Zapico et al., 2005). La autofagia es un proceso celular dinámico por el cual membranas subcelulares secuestran proteínas y orgánulos para su degradación por proteasas lisosomales con el fin de recuperar sus componentes. Éste es un proceso evolutivamente muy conservado que puede ocurrir en todas las células eucariotas, desde levaduras hasta mamíferos. La autofagia permite a las células responder flexiblemente a los cambios ambientales que abarcan desde la adaptación a la escasez de nutrientes hasta la adaptación frente a un daño celular y, en el caso en el que los mecanismos adaptativos resulten insuficientes, interviene en la manifestación

Mientras que proteínas de vida media corta se degradan preferentemente por el proteasoma, las de vida media larga son degradadas por el sistema lisosomal-autofágico (Cuervo, 2004). La autofagia está considerada como la principal ruta inducible para la renovación de componentes citoplásmicos y depende de una síntesis continua de proteínas y presencia de ATP. Hasta el momento se han descrito tres tipos de autofagia: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas (chaperone-mediated autophagy, CMA) (Figura 11).n de la muerte celular como MCP tipo II antes citada.

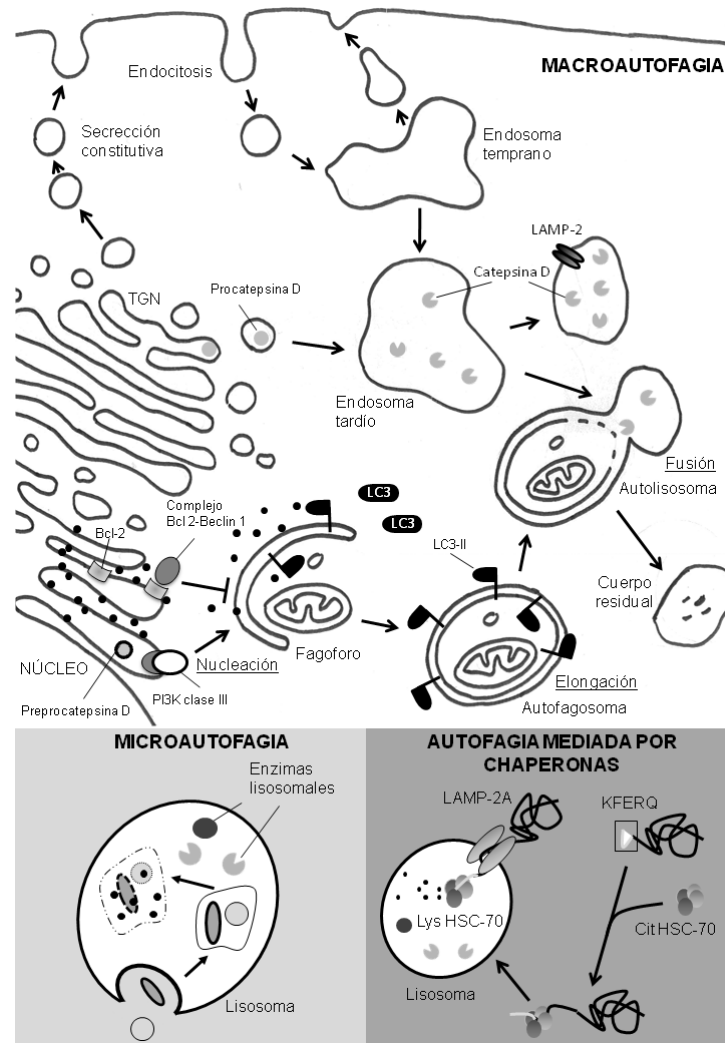


Figura 11. Tipos de autofagia. El diagrama muestra las tres principales formas de autofagia: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas. En la microautofagia, porciones de citosol son internalizadas a través de invaginaciones de la membrana lisosomal. En la macroautofagia, grandes porciones de citoplasma son secuestradas en estructuras de doble membrana que se fusionan con lisosomas. En la autofagia mediada por chaperonas, proteínas citosólicas específicas son transportadas al interior lisosomal a través de un complejo chaperona/receptor. Adaptado de Vega-Naredo y Coto-Montes (Vega-Naredo and Coto-Montes, 2009).

Estos tres tipos de autofagia difieren entre sí en la ruta que sigue el material a degradar en su camino hacia el lisosoma, pero muestran un paso final común que consiste en la degradación lisosomal y posterior reciclaje en material citoplásmico. Durante la microautofagia el secuestro de material citoplásmico se realiza mediante una invaginación directa de la membrana lisosomal (Yen and Klionsky, 2008). La CMA permite la degradación lisosomal de proteínas específicas y difiere del resto de rutas de degradación lisosomal en que no requiere tráfico vesicular. Esas proteínas, prestas a ser

degradadas, portan un péptido señal KFERQ que es reconocido por una chaperona citosólica (hsc70) que transporta la proteína al lisosoma donde la proteína-sustrato interacciona con la proteína asociada a la membrana lisosomal 2A (lysosome-associated membrane protein type 2A, LAMP-2A) (Cuervo and Dice, 1996). Una vez efectuado el reconocimiento, la proteína es desplegada por un complejo de chaperonas antes de ser importada al lumen lisosomal, donde es degradada rápidamente (Massey et al., 2006). La unión de la proteína-sustrato con LAMP-2A es un paso limitante en la CMA. La inducción de este tipo de autofagia ha sido demostrada durante hambruna prolongada, exposición a compuestos tóxicos y estrés oxidativo moderado (Kaushik and Cuervo, 2006).

Generalmente el término autofagia se aplica a procesos macroautofágicos. La macroautofagia es un proceso de alta capacidad que permite el secuestro simultáneo de múltiples constituyentes citoplásmicos, incluyendo grandes orgánulos, para su degradación en el lumen lisosomal (Levine and Klionsky, 2004). Consta de cinco fases: inducción; selección de carga y embalaje de porciones de citoplasma en vesículas de doble membrana, llamadas autofagosomas; fusión de los autofagosomas con endosomas tardíos; degradación de los autofagosomas y su contenido por las proteasas lisosomales; y, por último, reciclaje de las macromoléculas constituyentes y formación del cuerpo residual (Yen and Klionsky, 2008). Aunque el origen de las membranas que forman el autofagosoma aún permanece oscuro, se ha propuesto la implicación tanto del retículo endoplasmático como del aparato de Golgi, así como de ciertas estructuras preautofagosomales denominadas fagóforos en un proceso de nucleación, ensamblaje y elongación de pequeñas estructuras membranosas (Yen et al., 2010). Los genes y proteínas que constituyen la maquinaria básica de este proceso están bien descritos en levaduras y muchos de sus ortólogos mamíferos ya han sido caracterizados. Dichos genes han sido denominados Atg (Autophagy-relaTed Genes) y codifican proteínas necesarias para la inducción, generación, maduración y reciclado de autofagosomas. Por su parte, las proteínas codificadas por estos genes se han clasificado en cuatro grupos funcionales:

a) Los complejos de proteínas serina/treonina quinasas (Atg1, Atg13, Atg17) que actúan como sustratos de mTOR (mammalian target of rapamycin) quinasa en la inducción.

b) El complejo de señalización lípido-quinasa (Atg 6 o Beclin-1, Atg14, Atg34, Atg15) que participa en procesos de nucleación vesicular.

c) El sistema de conjugación similar a ubiquitina (Atg8 o LC3, Atg12) que participa en la elongación de la membrana vesicular.

d) Las proteínas implicadas en la ruta de reciclado y que median el desmontaje de las proteínas Atg de los autofagosomas maduros (Atg2, Atg9, Atg18).

Aunque bajo el término macroautofagia se incluye cualquier proceso no selectivo de secuestro de grandes estructuras celulares, distintos tipos de autofagias selectivas han sido descritas recientemente y, en función de los orgánulos secuestrados, se les han denominado mitofagia, micro y macropexofagia, reticulofagia, ribofagia e incluso microautofagia gradual del núcleo. Sin embargo, todos y cada uno de estos procesos comparten características morfológicas y componentes moleculares comunes.

Tanto cada una de las variedades de macroautofagia como la CMA se encuentran íntimamente influidas por el estrés oxidativo, pero los niveles de estrés oxidativo necesarios para disparar un proceso u otro son diferentes. Así, la CMA es inducida por niveles moderados de estrés oxidativo (Kaushik and Cuervo, 2006) mientras que poco se conoce sobre los niveles necesarios para activar la macroautofagia.

2.4.1. Relación entre la autofagia y la tenderización.

Tras la exanguinación, en el músculo pueden ocurrir diferentes vías catabólicas de muerte celular (apoptosis, autofagia, etc.) que tienen gran influencia en el proceso de conversión de músculo en carne. Las mitocondrias son las primeras y también los principales orgánulos afectados por los cambios post-mortem, por lo que son decisivas en las respuestas celulares y, por tanto, la calidad final de la carne. Dependiendo del programa de muerte celular, se activan diversas proteasas en diferente medida, dando lugar a distintos grados de ablandamiento (Sierra and Olivan, 2013).

Un conocimiento en profundidad de los elementos que forman parte de cada una de estas fases, permitiría la reconsideración del proceso de conversión del músculo en

carne y abriría nuevas posibilidades en la búsqueda de biomarcadores celulares directos o indirectos del ablandamiento de la carne y de la adquisición de calidad.

METODOLOGÍA UTILIZADA

3. METODOLOGÍA UTILIZADA.

3.1. INSTRUMENTACIÓN Y MATERIALES UTILIZADOS.

3.1.1. Instrumentación.

- *Espectrofotómetro para microplacas:* maquinaria diseñada para la medición de una gran diversidad de aplicaciones como la cuantificación directa de ADN, pruebas de pureza, cuantificación de ácido ribonucleico (ARN), así como mediciones en el rango visible ensayos de inmunoabsorción electroforética (ELISA), cinéticas enzimáticas y ensayos colorimétricos directos. Este dispositivo ha permitido llevar a cabo la medición de varios parámetros bioquímicos determinantes para el proyecto, tales como la cuantificación proteica, el daño de lípidos y proteínas y la actividad antioxidante total, bajo condiciones de longitud de onda específicas para cada prueba. Se precisan de placas ELISA de 96 pocillos realizando el aparato en su medición una corrección de longitud de paso automatizada. El lector dispone del Software para Análisis de Datos Gen5. El modelo utilizado es un espectrofotómetro BioTek PowerWave XS.

- *Fuente de alimentación:* proporciona voltaje constante o corriente constante a los instrumentos utilizados en la electroforesis o transferencia. Dispositivo indispensable para la realización de la técnica de Western Blot (WB).

- *Ultra-Turrax:* para la homogeneización del tejido se utilizó el modelo T-25 (JANKE & KUNKEL IKA-Labortechnik).

- *Campana:* Se trata de una cabina de flujo laminar vertical en la que el flujo de aire pasa a través de un filtro HEPA H-14 a una velocidad constante, en régimen laminar y en dirección vertical, generando un área estéril y protegiendo al producto de la contaminación externa y de la contaminación cruzada entre muestras. Sistema de filtración de una sola etapa para partículas de 0,3 µm en la parte superior y con extracción del 100% del flujo de aire hacia el exterior. Modelo CRUMA 870 FL.

- *Balanzas:* utilizadas para el pesado de los reactivos de las disoluciones correspondientes. Mettler Toledo AB54-S.

- *Centrífugas:* para llevar a cabo la centrifugación de las muestras se han

utilizado dos modelos, Kendro Biofuge pico y ORTOALRESA Digicen 20-R.

- *Baño termostático*: utilizado para llevar a cabo la desnaturalización de las proteínas y para la incubación de las muestras en la prueba de LPO. Selecta TERMOFIN.

- *Agitador orbital*: mecanismo empleado en la incubación de las membranas en la prueba de WB. IKA ks 130 basic.

- *Agitador*: utilizado para la mezcla de las muestras. VORTEX VELP científica.

- *pHmetro*: se utiliza para llevar a cabo las medidas de pH correspondientes un pHmetro Mettler Toledo MP220.

3.1.2. Materiales y reactivos químicos.

- 1,1,3,3-tetrametoxipropano (MDA). SIGMA-ALDRICH. 108383.
- 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolina 6 ácido sulfónico) sal diamónica. SIGMA-ALDRICH. A1888-5G.
- 2,4-dinitrofenilhidrazina. SIGMA-ALDRICH. D-2630.
- 4-metilaminofenol sulfato (Metol). PANREAC. 141798.1207.
- Acetonitrilo. SIGMA. 60004-1L.
- Ácido clorhídrico 35%. PROLABO.20248295.
- Ácido metanosulfónico. MERCK. 8.06022.0250.
- Ácido tricloroacético (TCA). MERCK. 100807.
- Acrilamida/Bis 30%. BIO-RAD. 161-0154.
- Anticuerpo Beclin 1 desarrollado en cabra. Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA. sc- 10086.
- Anticuerpo GAPDH desarrollado en cabra. Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA. sc-20356.
- Anticuerpo LC3 desarrollado en conejo. Medical & Biological Laboratories CO., LTC, Naka-ku Nagoya, Japan.
- Bradford Reagent. SIGMA. B6916.
- Bromuro de potasio. PANREAC. 141489.1210

- Carbonato sódico (anhidro). PANREAC. 141648.1210.
- Cloruro de sodio. SIGMA-ALDRICH. S-7653.
- Etanol absoluto. PROLABO. 20821.296.
- Fijador. Kodak. 1107248.
- Fosfato de sodio dihidrogenado. PROLABO. 28013.264.
- Fosfato dipotásico de hidrógeno. PROLABO. 26030.293.
- Glicina. MERCK. 104169.
- Guanidina. SIGMA-ALDRICH. G-7028.
- Hidroquinona. PANREAC. 141351.1210.
- Luminol. Kit de Millipore. WBKLS0100.
- Membranas de transferencia de polifluoruro de vinilideno (PVDF). Immobilon. IPVH00010.
- Metanol. PROLABO. 20847.295.
- N-metil-2-fenilindol. SIGMA-ALDRICH. 404888-10G.
- Películas de autorradiografía. Amersham Hyperfilm ECL. 28906836. Peroxidasa de rábano (HRP) P6782-25MG.
- Peróxido de hidrógeno. PROLABO. 23619.264.
- Persulfato de amonio (APS). SCHARLAUD. AM-0371.
- Sodio dodecil sulfato (SDS). SIGMA-ALDRICH. L-3771.
- Temed. SIGMA-ALDRICH. T-9281.
- Tris-HCl 0,5M pH 6.8. BIO-RAD. 161-0799.
- Tris-HCl 0,5M pH 8.8. BIO-RAD. 161-0798.
- Sulfato de sodio. PANREAC. 141717.1211.
- Trizma. SIGMA-ALDRICH. T-1503.
- Tween 20. SIGMA-ALDRICH. P-5927.

3.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO: ANIMALES. TEST SESGO COGNITIVO Y ESTRÉS INDUCIDO.

3.2.1. Población de estudio.

En el presente proyecto se utilizaron 12 cerdos machos enteros de cruce comercial, negativos al gen halotano (en recesividad incrementa la susceptibilidad al estrés). Los animales se criaron en una granja experimental del IRTA (Instituto de

investigación y tecnología agroalimentaria) de Monells (Gerona) desde el destete y hasta alcanzar el peso de sacrificio (100 kg peso vivo).

3.2.2. Test cognitivo.

Un mes antes del sacrificio, los animales se sometieron al test del sesgo cognitivo, que permite diferenciar los animales según su estado emocional. Este test se desarrolló específicamente para este proyecto y su validación se realizará en base a los resultados que se obtengan en este estudio. Para ello, cada animal fue sometido a 18 sesiones de entrenamiento (dos sesiones por día) durante 9 días consecutivos para su aclimatación. La sesión de entrenamiento consistía en conducir al animal desde su corral de origen hasta el corral donde se aplican las pruebas, y allí se les colocaba un comedero en un sitio concreto del establo que, en ocasiones, permitía el libre acceso a la comida (comedero sin reja) y en otros casos, restringía el acceso a la misma (comedero con reja). Para evitar un posible efecto de lateralidad, el 50% de los animales encontraron el comedero con acceso a la comida al lado derecho y el otro 50% al lado izquierdo. En esta fase de entrenamiento pudo comprobarse que a partir de la decimoquinta sesión los animales habían aprendido correctamente a encontrar el comedero en el establo. Tras el entrenamiento, se realizó el test del sesgo cognitivo, en donde se colocó el comedero en el centro del corral (posición ambigua) y se evaluó el comportamiento del animal y el tiempo que tardaba en contactar con el comedero, lo que permitió clasificar los animales como positivos (+) o negativos (-) para el test del sesgo cognitivo, en función de su capacidad para explorar el ambiente externo en busca de la nueva localización del comedero, considerándose, por tanto, como de sesgo positivo a los animales más emprendedores y arriesgados y negativo a los temerosos y cobardes.

3.2.3. Estrés inducido.

Al llegar al peso de sacrificio pre-fijado (100 kg) los animales fueron transportados al matadero experimental del IRTA, en donde la mitad de los animales de cada sesgo cognitivo recibieron un manejo *ante-mortem* estresante (ruidos en el pasillo

de entrada) (grupo estresado) y los otros no (grupo control). En el momento del sacrificio todos los animales fueron tratados por igual.

Sesgo Cognitivo → Estrés ↓	Positivo (n=9)	Negativo (n=3)
Estresados (n=6)	n=4	n=2
Controles (n=6)	n=5	n=1

Tabla 1. Clasificación de los grupos de estudio, estresados y controles según el test del sesgo cognitivo. n = número de animales en cada grupo.

3.3. DETERMINACIONES DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD.

Los parámetros de calidad que se determinaron en cada animal fueron los siguientes: el pH a 45 minutos y a las 24 horas *post-mortem*, tanto en el músculo *Semimembranosus* (SM) como en el *Longissimus thoracis* (LT); drip loss a partir de una muestra de LT.

3.3.1. Pérdida de jugo por goteo (Drip loss).

La carne posee una alta CRA en condiciones normales, ya que la parte muscular de los mamíferos contiene alrededor de un 75% de agua, que disminuye como consecuencia de fenómenos de evaporación, pérdidas por gravedad, presión, cocinado, descongelado, etc. (Offer and Trinick, 1983). Por ello, la CRA se determina con la técnica de pérdida de jugo que expresa la falta de capacidad del músculo para retener el jugo natural y se relaciona con la desnaturalización de las proteínas musculares debido a una bajada rápida de pH en las primeras horas *post-mortem*.

Para evaluar el drip loss, se siguió el método de (Rasmussen, 1996), con pequeñas modificaciones. A las 24 h *post-mortem* se extrajo de la canal una porción del

músculo LT a partir de la cual se prepararon dos muestras de 25 mm de diámetro, que se colocaron en un contenedor especial (Meat juice collector, Sarstedt, Germany) con tapa, para evitar pérdidas. Para determinar el drip loss se pesó la carne en una balanza de precisión antes y después del tratamiento y se calculó el porcentaje de peso perdido en forma de exudado durante la conservación, según la siguiente fórmula.

$$\text{Drip loss (\%)} = (\text{peso exudado mg} / \text{peso muestra mg}) \times 100$$

3.3.2. Determinación del pH:

Son muchos los factores que influyen en la medición del pH y su relación con la calidad de la canal, y entre ellos se encuentran la edad, el sexo, el peso, etc. (Sanz et al., 1996). Durante las 12 primeras horas *post-mortem* el pH desciende de manera gradual, para luego estabilizarse hacia las 24 h. Se considera que cuando el valor de pH es menor



Figura 12: Medida del pH con un pH-metro portátil con electrodo de penetración.

a 6.0 durante la primera hora *post-mortem* y la temperatura de la carne está próxima a 35°C, se estaría frente a una carne PSE (pálida, blanda y exudativa), que tiene una coloración pálida con intensa exudación, la cual es una anomalía común en ciertos cerdos. Se midió el pH del músculo *Longissimus dorsi* (LD) a los 45 minutos *post-mortem*, con un pH-metro portátil (Knick) con un electrodo de penetración (Figura 12).

Los datos obtenidos en este proyecto se encuentran todos dentro del rango de normalidad, aun así se aprecia un descenso del pH considerable que a su vez se encuentra condicionado por un aumento en el drip loss, hecho que permite establecer un intervalo de confianza para definir carnes de mala calidad como aquellas que presentan valores de pH inferiores a 6.5 y de drip loss entre 3,5 y 7, y de buena calidad con valores superiores a dicho punto de corte para el pH y con un rango de 0-3,5 para el drip loss.

3.4. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS.

Se homogenizaron 500 mg de tejido en 4,5 mL de tampón potasio pH 7,4 10 mM y NaCl 50 mM 0,1% tritón un polytron Ultra-Turrax T25 (JANKE & KUNKEL IKA-Labortechnik, USA) para llevar a cabo las siguientes determinaciones.

3.4.1. Cuantificación proteica.

El homogenizado se centrifugó a 3000 rpm a 4°C durante 6 minutos, los precipitados se descartaron y con los sobrenadantes recogidos se determinó la concentración total de proteínas mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

Se realiza una curva patrón con concentraciones conocidas de albúmina. Para ello se parte de una solución stock de albúmina disuelta en agua a una concentración 10mg/ml para preparar una solución madre 0,1mg/ml. Para las muestras de tejido, se prepara una dilución 1:1000. Se añaden 200 µL de reactivo Bradford a todos los pocillos. Finalmente se mide la absorbancia de forma puntual a 595 nm. A partir de la recta patrón obtenida con los estándares de albúmina, se calculan las concentraciones en las muestras problema.

La alta variabilidad de compuestos que llevan a cabo la función antioxidante hace necesaria una medición global.

3.4.2. Actividad antioxidante total (AAT).

La AAT es un parámetro medible que proporciona información sobre la cantidad total de sustancias antioxidantes disueltas, y a menudo es considerada un indicador útil de la capacidad del sistema para impedir el daño causado por las EROs. La valoración de la AAT del homogeneizado se efectuó mediante una modificación desarrollada en nuestro laboratorio de la técnica de Arnao y colaboradores para extractos vegetales (Arnao, 2001).

3.4.3. Daño de proteínas (PD).

La presencia de grupos carbonilo en los residuos aminoacídicos se utilizó como marcador del daño oxidativo de proteínas. El estudio se llevó a cabo siguiendo el protocolo desarrollado por Levine y colaboradores (Levine et al., 1990), con las variaciones introducidas por Coto-Montes y Hardeland (Coto-Montes and Hardeland, 1999).

3.4.5. Peroxidación lipídica (LPO).

El proceso de peroxidación lipídica lleva a la producción de peróxidos de lípidos y sus derivados como MDA y 4-HNE que proveen un índice conveniente de la peroxidación lipídica (Esterbauer et al., 1990). Para llevar a cabo la determinación se utiliza el kit Bioxytech LPO-568 kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). El kit contiene un reactivo cromógeno (N-metil-2-fenilindol) que reacciona con MDA y 4-HNE a 45°C formándose un cromóforo estable con un máximo de absorbancia a 586 nm.

3.4.4. Western Blot (WB).

La detección y la cuantificación de las proteínas Beclin 1 y LC3-I y LC3-II como principales marcadores de autofagia se llevaron a cabo mediante la técnica WB, con las características particulares para cada molécula que se detallan a continuación.

Para **Beclin 1** (60 kDa), es un homólogo en mamíferos de Atg7 de levaduras y se encuentra implicado en la formación de autofagosomas por lo que se trata de un marcador por excelencia de cualquier proceso autofágico. Las muestras se desnaturalizaron en tampón de carga comercial (Tris/ HCl 62,5 mM, pH 6,8, 2% SDS, 25% glicerol, 0,01% azul de bromofenol) a 100° C durante 5 minutos y se separaron a través de un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10 % a 60 mA. Tras la migración de las proteínas, éstas fueron transferidas a una membrana de PVDF a 90 V durante 2 h. La membrana fue bloqueada (para evitar uniones inespecíficas) en un tampón tris salino (TBS) y 0,5% Tween-20 (TBS-T) con leche desnatada en polvo al 5%, a 4°C durante

toda la noche. A la mañana siguiente se incubó la membrana, en un agitador rotatorio, durante 4 horas y a 4°C, con el anticuerpo anti Beclin 1, desarrollado en cabra (sc-10086, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA). El anticuerpo fue diluido previamente 1:1000 en TBS-T con leche desnatada en polvo al 1%. Después de tres lavados (con TBS-T) de 5 minutos cada uno, la membrana fue incubada con el anticuerpo secundario (anticabra) ligado a una peroxidasa, durante 2 horas a 4°C. Éste (SIGMA A 5420) fue previamente diluido 1:5000 en TBS-T con leche en polvo al 1%. Tras la incubación, el anticuerpo fue sometido a dos lavados (de 15 minutos cada uno) con TBS-T a 4°C.

Para **LC3-I** (18 kDa) y **LC3-II** (16 kDa) (microtubule-associated protein light chain 3) homólogo en mamíferos de Atg8 de levaduras, es una proteína asociada a los microtúbulos que se modifica post-traduccionalmente para dar lugar a: LC3-I que es la forma citosólica y se convierte en LC3-II durante procesos autofágicos, localizándose en la membrana de preautofosomas y autofosomas. Funciona como marcador de macroautofagia o MCP de tipo II. Las muestras se desnaturalizaron en tampón de carga comercial (Tris/ HCl 62,5 mM, pH 6,8, 2% SDS, 25% glicerol, 0,01% azul de bromofenol) a 100° C durante 5 minutos y se separaron a través de un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 16 % a 60 mA. Tras la migración de las proteínas, éstas fueron transferidas a una membrana de PVDF a 90 V durante una hora. La membrana fue bloqueada para evitar uniones inespecíficas en un tampón TBS y 0,5% Tween-20 (TBS-T) con leche desnatada en polvo al 10%, a 4°C durante toda la noche. A la mañana siguiente se incubó la membrana, en un agitador rotatorio, durante 1 hora y a temperatura ambiente, con el anticuerpo anti LC3, desarrollado en conejo, (Medical & Biological Laboratories CO., LTC, Naka-ku Nagoya, Japan). El anticuerpo fue diluido previamente 1:1000 en TBS-T con leche desnatada en polvo al 1%. Después de 3 lavados (con TBS-T), de 10 minutos cada uno, la membrana fue incubada con el anticuerpo secundario (anticonejo) ligado a una peroxidasa, durante 1 hora a temperatura ambiente. Éste (Cell Signalling 7074) fue diluido previamente 1:5000 en TBS-T con leche en polvo al 1%. Tras la incubación, el anticuerpo fue sometido a 3 lavados con TBS-T, de 10 minutos cada uno.

Para la detección y cuantificación de la **GAPDH**, utilizado como marcador de carga, se lavaron las membranas usadas anteriormente para Beclin 1, LC3-I y LC3-II

con TBS-T durante 10 minutos, se reactivaron con metanol durante 15 segundos, se les dio otro lavado, y se incubaron, en un agitador rotatorio, durante 4 h y a 4°C, con el anticuerpo anti GAPDH, desarrollado en cabra (sc-20356, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA). El anticuerpo fue diluido previamente 1:1000 en TBS-T con leche desnatada en polvo al 1%. Después de 3 lavados (con TBS-T) de 5 minutos cada uno, la membrana fue incubada con el anticuerpo secundario (anticabra) ligado a una peroxidasa, durante 2 h a 4°C. Éste (SIGMA A 5420) fue previamente diluido 1:5000 en TBS-T con leche en polvo al 1%. Tras la incubación, el anticuerpo fue sometido a 2 lavados (de 15 minutos cada uno) con TBS-T a 4°C.

Para Beclin 1, LC3-I y LC3-II y la GAPDH, para el revelado en el inmunoblotting se usó el kit de Millipore (Cat.No. WBKLS0100) para la detección de la quimioluminiscencia mediante luminol. La detección de la luz visible se realizó con la ayuda de una película de autorradiografía.

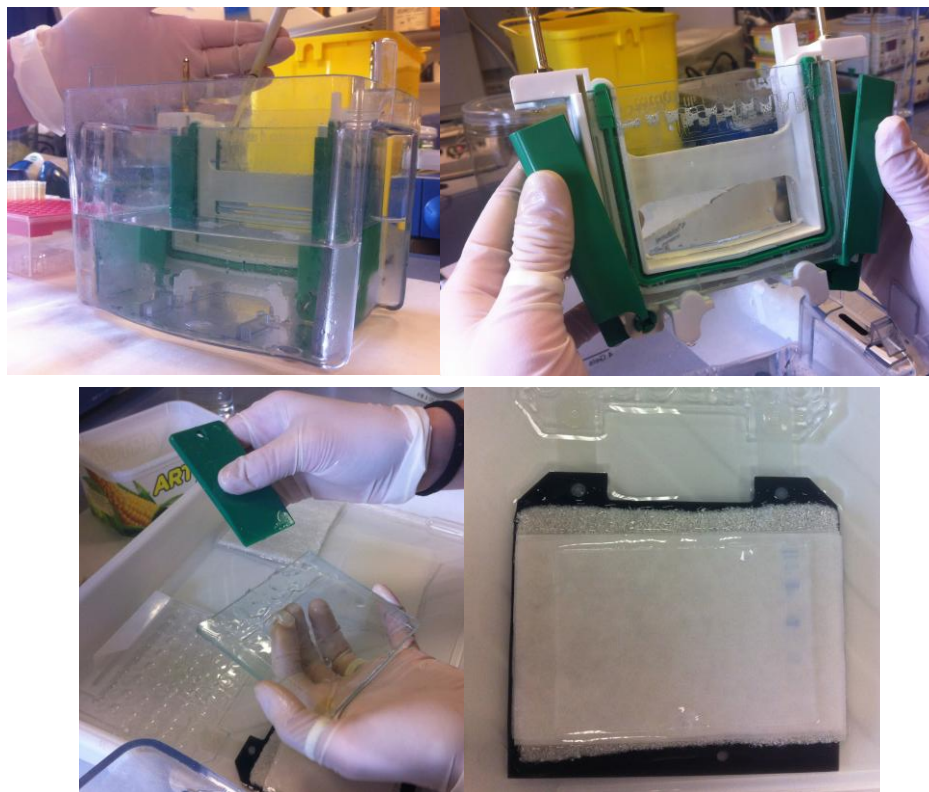


Figura 13: Secuencia fotográfica de la técnica de Wertern Blot.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Se realizó un análisis estadístico de los resultados, representados como media \pm desviación estándar (DS), mediante programas estadísticos. Para comprobar la distribución normal de las muestras se realizó el test de Kolmogorov-Smirnof, fijando 0,05 como nivel de significación aceptado. Así mismo, se llevó a cabo un análisis de la varianza de un factor (ANOVA) para comprobar si existían diferencias significativas dentro de los valores de cada prueba entre los distintos tratamientos para los individuos, aceptando un nivel de significación de $p < 0,05$. Y por último se realizaron pruebas a posteriori, tales como el test HSD de Tukey, el Games-Howell y el test Bonferroni (con un nivel de significación de $p < 0,05$), atendiendo al nivel de estrés o a parámetros buenos o malos de calidad, para analizar detalladamente las diferencias entre ambos casos.

Sin embargo no debemos olvidar que este estudio está planificado, en último término, para determinar de las características adecuadas o inadecuadas del estrés que se habría originado. Por ello, variaciones individuales deben ser también tenidas en cuenta y estudiadas en detalle a la búsqueda de características especiales, observadas en los animales y derivadas del tratamiento, que pueden servir como base de mejora de los protocolos utilizados, con vista a conocer si se ha desarrollado un estrés eficiente para todos los animales.

RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN.

Los productos cárnicos son la principal fuente proteica en la alimentación humana en todo el mundo. Recientemente el Director General de Agricultura y Desarrollo Rural de la Comisión Europea ha previsto una reducción del consumo total de carne en la UE de un 0,6% en el 2013, resultado derivado de los altos precios internos y la recesión económica. El sector que se ha visto más afectado es el vacuno, sin embargo la industria porcina se mantiene con valores similares a años anteriores. En el continente americano, durante el primer semestre del 2013 se ha producido un aumento moderado en la producción de carne de cerdo. Según datos del Servicio de Investigación Económica del Departamento de Agricultura de los EEUU (USDA), EEUU ha experimentado un incremento del 2,3% respecto al 2012.

Paralelamente a este fenómeno, se ha extendido una preocupación social por la salud y la nutrición, viéndose una demanda clara de información por parte de la sociedad acerca de las normas de bienestar animal y de la calidad de los productos del mercado. Productores y comerciantes de la cadena alimentaria reconocen cada vez más que las preocupaciones de los consumidores por el bienestar animal representa una oportunidad de negocio que podría incorporarse provechosamente en sus estrategias comerciales (Buller, 2008). En general, el bienestar animal es cada vez más percibido e interpretado como un atributo importante del concepto general de “calidad de los alimentos” (Buller, 2009).

Este hecho obliga a los investigadores del sector cárnico a desarrollar biomarcadores para percibir la existencia de estrés en el animal ante- y peri-sacrificio. Es por ello, que el presente trabajo se ha focalizado en el estudio de indicadores del estado emocional del ganado porcino a partir de medidas tanto de comportamiento como fisiológicas (biomarcadores estudiados en la carne desde su sacrificio y a lo largo de su maduración), que permiten evaluar de manera directa el bienestar animal y su efecto sobre la calidad del producto final.

Los parámetros de AAT, PD y LPO se analizaron desde tres puntos de vista distintos, para estudiar si alguna de estas clasificaciones hace que los animales difieran de forma significativa en su balance oxidativo.

- Desde el punto de vista del estrés inducido.

- Desde el punto de vista de la calidad de la carne, determinada ésta por el pH y el drip loss.

- Desde el punto de vista del sesgo cognitivo con el fin de desarrollar y validar el test utilizado para diferenciar estadísticamente a los animales según su estado emocional.

Finalmente, en base a estudios previos de nuestro grupo de investigación que mostraron que la activación de la autofagia en el tejido muscular tras el sacrificio de los animales es una respuesta obvia como mecanismo de defensa, se evaluó un conjunto de biomarcadores autofágicos y su evolución *post-mortem*.

4.1. ESTUDIO DEL BALANCE OXIDATIVO.

4.1.1. Desde el punto de vista del estrés inducido.

Los parámetros de estudio en el tejido muscular son muy flexibles y se adaptan según las condiciones cambiantes a las que se encuentran expuestos los animales. La calidad de la carne se encuentra fuertemente influenciado por la composición del músculo (Te Pas et al., 2013), por lo tanto los procesos oxidativos que tienen lugar en el proceso de maduración tras el sacrificio juegan un papel importante. Los efectos deletéreos de los radicales libres afectan enormemente causando daños tanto a nivel proteico como lipídico. Por otra parte, el sistema antioxidante ejerce una acción protectora sobre el tejido, impidiendo el daño de los radicales libres en gran número de biomoléculas, por lo tanto su actividad también es esencial durante la conversión del músculo en carne (Rowe et al., 2004).

En el primer estudio realizado se dividieron los animales en dos grupos en función de las diferentes condiciones de manejo impuestas antes del sacrificio. Un grupo fue conducido de manera tranquila al matadero, mientras que el otro de forma estresante con ruidos potentes inducidos por los operarios.

Los resultados obtenidos de PD y LPO guardan un alto grado de analogía entre ellos (Figura 14), mostrando el grupo de animales estresados niveles mayores de daño durante las primeras 4 horas, decreciendo progresivamente hasta alcanzar valores similares al grupo de los no estresados. La similitud en el patrón observado en ambas pruebas parece indicar que este incremento oxidativo está directamente relacionado con el estrés inducido y que, este efecto es temporal y no perdurable en el tiempo.

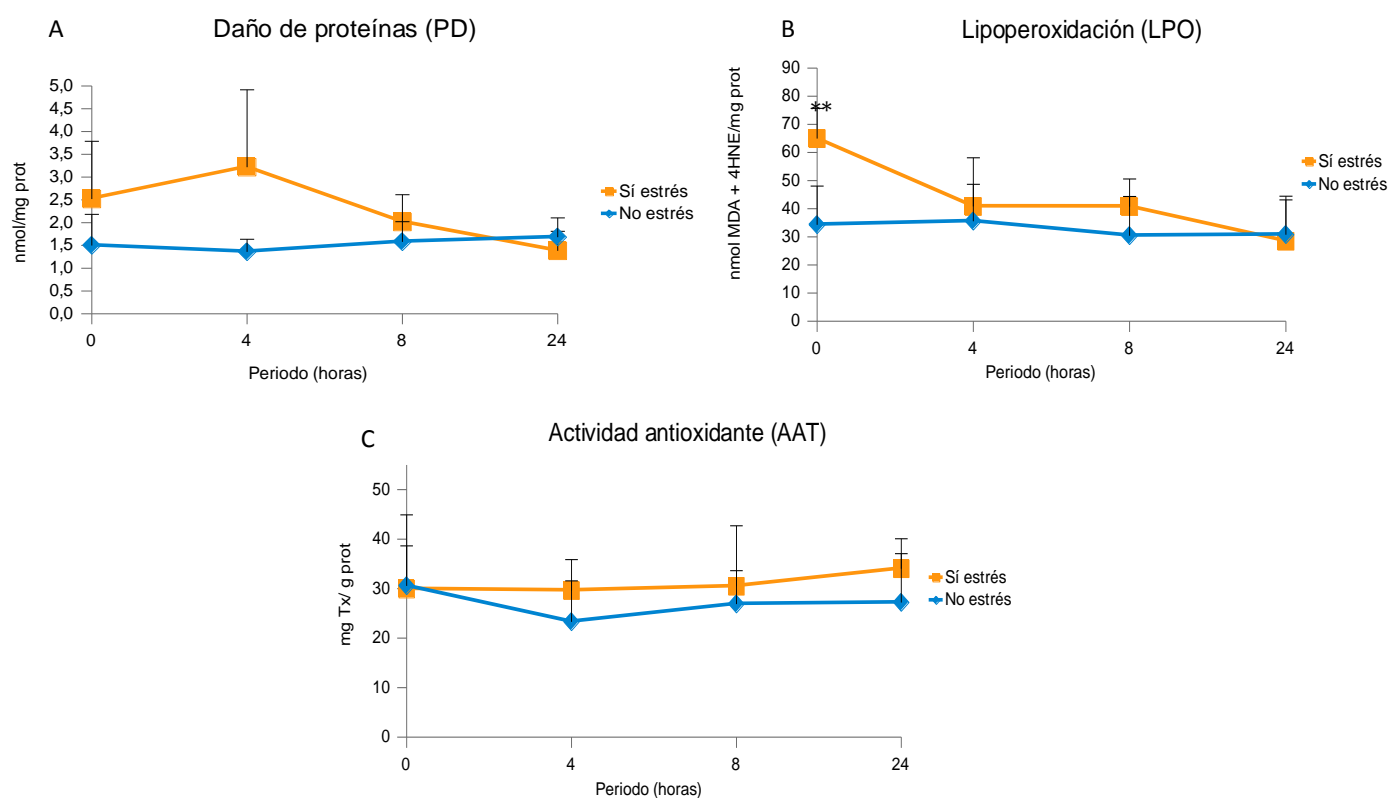


Figura 14. Representación gráfica de los parámetros del balance oxidativo desde el punto de vista del estrés inducido. (A) El daño de proteínas (PD) expresado como nmol de proteínas carboniladas. (B) La actividad antioxidante total (AAT) expresada como mgTx/g proteínas. (C) La lipoperoxidación (LPO) expresada como nmol de productos de peroxidación (MDA + 4-HNE). ** Diferencias estadísticas del periodo 0h vs 24h. Todos los datos se presentan como la media \pm desviación típica para al menos tres experimentos por separado.

Como ya se ha descrito, las proteasas juegan un papel importante en la degradación de proteínas como consecuencia de cambios tras la carbonilación (Delgado et al., 2001; Purintrapiban et al., 2003) y pudieron relacionar el PD con la calidad final del producto. Varios autores han demostrado que el notable aumento del PD durante las primeras horas tras el sacrificio está directamente relacionado con el estrés psicológico

inducido, que provoca un estrés oxidativo subsiguiente (Huang et al., 2010; Wang et al., 2007) y que afectaría al proceso de tenderización, aunque hasta el momento se desconoce su influencia a nivel celular y molecular durante la maduración *post-mortem*.

Cabe destacar que la similitud entre el PD y LPO apoya la teoría de que el incremento en el estrés que subyace al daño observado está directamente causado por el estrés inducido (Hambrecht et al., 2005; Liu et al., 1996; Menabde et al., 2011) por los operarios y no por el sufrido por el sacrificio en sí mismo, ya que ante éste último están expuestos ambos grupos experimentales.

Respecto a la AAT los animales de ambos grupos mostraron niveles estables a lo largo de las 24 horas de maduración, siendo ligeramente superiores en los animales estresados. Probablemente se haya visto disparado en respuesta al incremento en radicales libres provocado por el estrés inducido.

El estudio de estos parámetros mostró que la reducida capacidad de actuación del tejido *post-mortem*, es aún suficiente para que los enzimas actúen a lo largo del periodo de oreo estudiado (Coto-Montes, 2004), hecho que había sido demostrado con anterioridad en nuestro grupo.

4.1.2. Desde el punto de vista de la calidad de la carne (pH y drip loss).

El pH y el drip loss son dos parámetros que guardan una relación directa y que permiten una visión clara acerca de los cambios organolépticos que experimenta el músculo en su conversión y como éstos se ven influidos por el estrés. Los datos obtenidos tanto de pH como de drip loss se mantuvieron dentro de los rangos de normalidad (Tabla 2), pero la correlación entre ambos permite clasificar la carne en función de la calidad.

En base a dicha correlación, la carne que presenta valores de pH más bajos y drip loss elevado se caracteriza por ser carnes con mayor ligereza, mayor proporción de fibras claras y de peor calidad, inaceptables para el consumo (McKeith and Pringle, 2013). La carne de mayor calidad sensorial presenta, en contraposición un descenso de pH más lento y, por tanto, valores de pH más altos y drip loss más bajo, produciendo carnes más jugosas y con una mayor proporción de fibras musculares oscuras (McKeith

and Pringle, 2013).

Calidad	Cerdo	pH 45 SM	Drip loss
Buena	2	6,72	2,36
	5	6,74	3,46
	8	6,68	3,45
	16	6,70	1,58
	17	6,58	2,70
	18	6,70	0,91
Mala	4	6,30	5,86
	9	6,36	2,03
	10	6,10	7,89
	13	6,35	3,44
	14	6,58	5,38
	15	6,45	4,36

Tabla 2. Datos de pH y drip loss clasificados en función de la calidad de la carne; buena o mala.

El metabolismo muscular juega un papel esencial en la tenderización, y los datos obtenidos nos permiten relacionarlo con el estrés sufrido por el animal. Aquel grupo poblacional expuesto a situaciones de estrés agudo presenta una glucólisis acelerada y temprana y por lo tanto niveles mayores de ácido láctico en el músculo (Frisby et al., 2005; Leheska et al., 2002; Ritter et al., 2009). Esto es debido a que tras la muerte del animal y una situación de hipoxia la principal fuente de obtención de energía es el metabolismo anaerobio muscular. El ácido láctico acumulado en el músculo no es eliminado, ya que el sacrificio es inmediato tras su producción y se experimenta un descenso rápido del pH *post-mortem* (Pomponio et al., 2010; van Laack et al., 2001). Es sobradamente conocido el hecho de que esto está relacionado con carnes de tipo PSE con menor CRA y por tanto valores elevados de drip loss (Frisby et al., 2005; Lesiow and Xiong, 2013). Aquel grupo clasificado como de buena calidad mantiene una concentración de glucógeno adecuada, y por consiguiente se ve acompañado de una adecuada acidificación.

Por tanto, el pH muscular resulta ser una medida interesante para cuantificar el nivel de reserva en el músculo, además de permitir valorar cómo ha sido tratado el animal antes del sacrificio. Relacionando los datos obtenidos con el apartado anterior,

se cree que muy probablemente el descenso del pH y el incremento del drip loss observados estén relacionados con el aumento del PD durante las primeras 4 horas tras el sacrificio del animal (Traore et al., 2012), ya que se conoce que la degradación de proteínas estructurales del músculo ha sido relacionado con el enternecimiento de la carne debido al aumento de la pérdida de jugo por goteo (Melody et al., 2004).

Analizando individualmente el pH y el drip loss de los animales se puede observar un prototipo de cada grupo descrito. Además, los datos de PD obtenidos permiten confirmar la teoría expuesta con anterioridad. Así, el cerdo 18 es un claro ejemplo de productor de carne de buena calidad presentando niveles altos de pH con un valor de 6,7, un drip loss en torno a 0,9, y bajos niveles de PD de 1,34. Por el contrario, el individuo 10 caracterizado por producir carne de mala calidad tiene un pH cercano a 6, un elevado drip loss de 7,8, y niveles altos de PD de 1,34, tres veces mayor respecto al individuo 18.

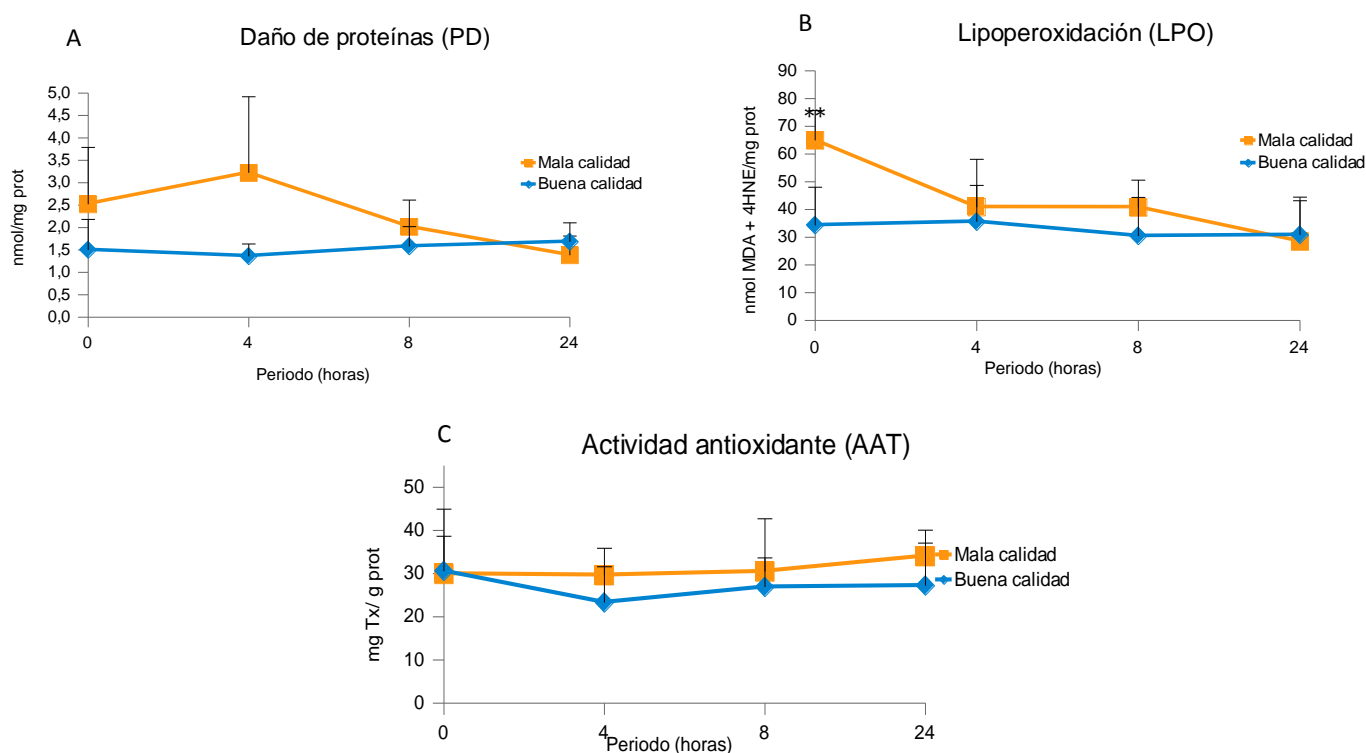


Figura 15. Representación gráfica de los parámetros del balance oxidativo desde el punto de vista de la calidad de la carne. (A) El daño de proteínas (PD) expresado como nmol de proteínas carboniladas. (B) La actividad antioxidante total (AAT) expresada como mgTx/g proteínas. (C) La lipoperoxidación (LPO) expresada como nmol de productos de peroxidación (malonaldehidos + 4-hidroxialquenos). ** Diferencias estadísticas del periodo 0h vs 24h. Todos los datos se presentan como la media \pm desviación típica para al menos tres experimentos por separado.

El estudio del PD, la LPO y la AAT en relación a la clasificación realizada en función de la calidad de la carne dio lugar a gráficas (Figura 15) iguales a las observadas en el apartado anterior (Figura 14). Esto permite verificar que existe una concordancia entre el estrés inducido y la calidad, permitiendo afirmar que en este estudio el estrés infligido a los animales ha sido suficiente para producir carne de peor calidad y con daños oxidativos importantes durante las primeras horas de maduración posteriores al sacrificio.

4.1.3. Desde el punto de vista del sesgo cognitivo.

La población también ha sido clasificada en función de los resultados obtenidos tras la evaluación del comportamiento del animal ante el test de sesgo cognitivo desarrollado para este proyecto, con el fin de evaluar su efecto sobre el bienestar y biomarcadores potenciales de estrés.

Se consiguió aplicar satisfactoriamente el protocolo, y tras las sesiones de entrenamiento se clasificaron los animales en positivos y negativos, en función del tiempo empleado en contactar con el comedero. En consecuencia, este resultado sugiere que la toma de decisión y el comportamiento mostrado por cerdos entrenados frente a un estímulo ambiguo (comedero en el medio) puede ser útil para distribuir los cerdos según su estado emocional. Se consideran optimistas o con mayor capacidad de interacción con el medio y respuesta al mismo aquellos con valores positivos y por tanto negativos aquellos con temor a lo desconocido.

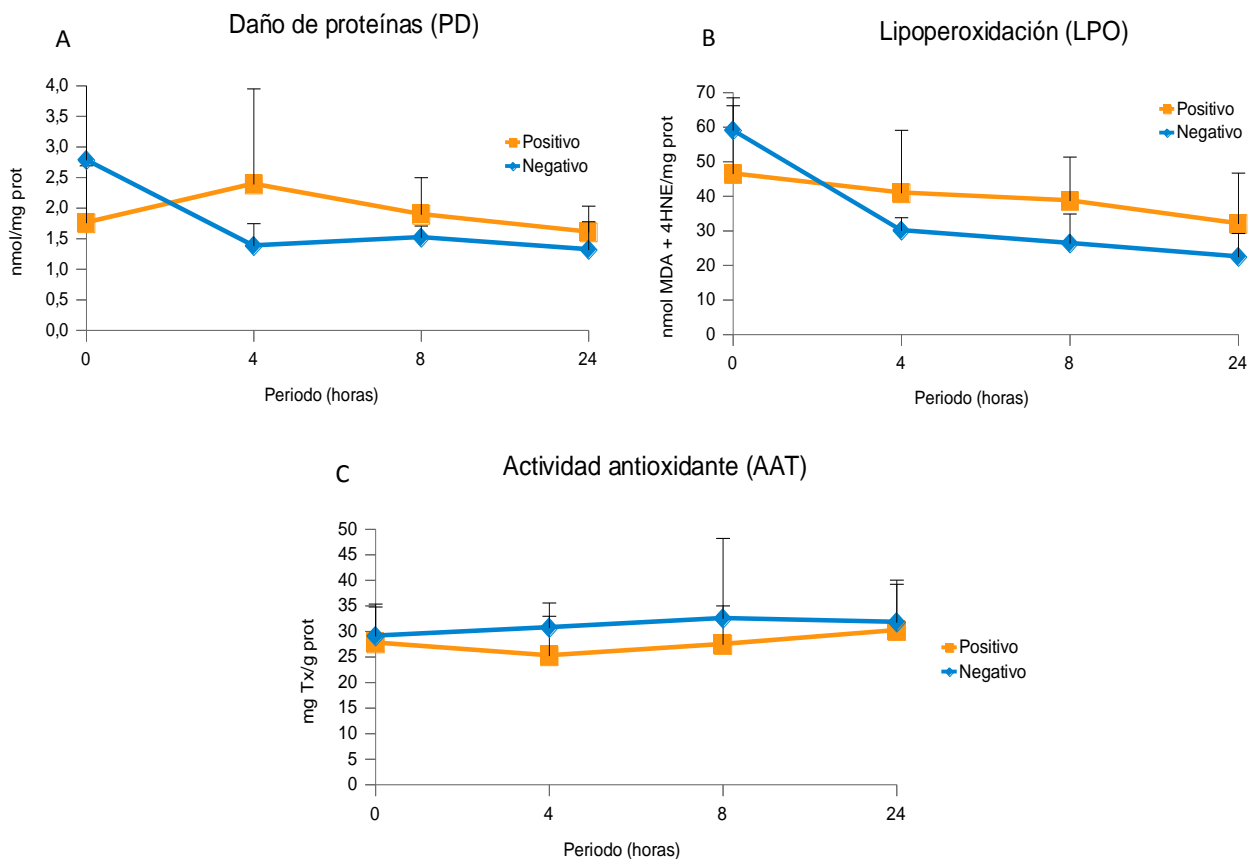


Figura 16. Representación gráfica de los parámetros del balance oxidativo desde el punto de vista del sesgo cognitivo. (A) El daño de proteínas (PD) expresado como nmol de proteínas carboniladas. (B) La actividad antioxidante total (AAT) expresada como mgTx/g proteínas. (C) La lipoperoxidación (LPO) expresada como nmol de productos de peroxidación (MDA + 4-HNE). ** Diferencias estadísticas del periodo 0h vs 24h. Todos los datos se presentan como la media \pm desviación típica para al menos tres experimentos por separado.

Observando las gráficas obtenidas (Figura 16), se puede ver que su evolución difiere de las anteriores. Se observa que los animales con sesgo cognitivo positivo poseen, en general, valores mayores en el daño de biomoléculas, tanto de lípidos como de proteínas. Pero, resulta interesante fijarse en los datos a las 0 horas, ya que son determinantes para medir la afectación del animal debido a los procesos *ante-mortem*, y muestran que el grupo experimental de sesgo negativo presenta niveles muy superiores tanto de PD como de LPO. Es decir, aquellos clasificados como positivos y considerados más emprendedores y “optimistas” muestran un menor estrés ante el sacrificio que los que muestran un patrón negativo y por tanto más “asustadizos”. Lo cual, parece indicar que el carácter común a estos animales hace que se asusten menos

ante el sacrificio y que, por ello, la carne obtenida posteriormente se vea menos afectada.

La AAT en los animales de sesgo cognitivo positivo muestra, de forma global, valores inferiores. Nuevamente, si comparamos estos resultados con los obtenidos en los estudios realizados en función del estrés inducido y la calidad final, se ve que, la AAT se dispara en situaciones estresantes con el fin de paliar los efectos del daño oxidativo. Al no dispararse este estrés en los animales de sesgo positivo, la AAT se mantiene en valores inferiores.

Finalmente se ha realizado una tabla para proporcionar una visión global de los resultados obtenidos, tratando de localizar peculiaridades a nivel individual.

Hora	Cerdos no estresados	Drip loss	pH (45 min)	Calidad	PD	LPO	AAT	Test cognitivo
0h	2	2,36	6,72	Buena	1,75	42,18	20,36	Positivo
	5	3,46	6,74	Buena	0,82	33,07	23,28	Positivo
	8	3,45	6,68	Buena	1,77	20,02	23,76	Positivo
	16	1,58	6,70	Buena	2,57	50,73	60,58	Negativo
	17	2,70	6,58	Buena	0,75	29,51	28,96	Positivo
	18	0,91	6,70	Buena	1,34	30,06	26,39	Positivo
4h	2				1,37	30,45	19,28	
	5				1,87	28,04	24,65	
	8				1,31	38,34	19,46	
	16				1,12	28,99	35,32	
	17				1,38	48,46	19,41	
	18				1,11	38,92	21,55	
8h	2				1,28	19,87	26,57	
	5				2,36	28,79	22,67	
	8				1,14	38,32	19,03	
	16				1,32	22,69	50,57	
	17				1,62	45,78	16,56	
	18				1,75	26,87	25,80	
24h	2				1,37	55,20	25,67	
	5				1,60	18,59	27,46	
	8				1,11	37,98	24,40	
	16				1,85	14,65	38,66	
	17				2,33	25,97	20,86	
	18				1,83	32,23	26,01	

Hora	Cerdos sí estresados	Drip loss	pH (45 min)	Calidad	PD	LPO	AAT	Test cognitivo
0h	4	5,86	6,30	Mala	3,92	75,85	43,73	Positivo
	9	2,03	6,36	Mala	2,29	78,43	21,57	Positivo
	10	7,89	6,10	Mala	4,29	63,49	21,00	Negativo
	13	3,44	6,35	Mala	1,54	39,97	30,86	Positivo
	14	5,38	6,58	Mala	1,49	62,83	31,16	Negativo
	15	4,36	6,45	Mala	1,60	68,96	30,86	Positivo
4h	4				2,07	31,35	43,43	
	9				4,52	76,00	25,18	
	10					34,21	25,53	
	13				2,35	16,15	22,85	
	14				1,64	26,86	24,42	
	15				5,52	60,23	36,26	
8h	4				3,10	49,96	40,04	
	9				2,31	36,14	28,04	
	10				1,50	36,11	22,10	
	13				1,74	40,85	32,30	
	14				1,71	20,12	24,78	
	15				1,72	61,29	35,54	
24h	4				1,45	43,49	51,10	
	9				1,51	5,15	26,62	
	10				1,08	25,17	22,51	
	13				2,14	28,46	33,10	
	14				1,02	27,43	34,03	
	15				1,08	40,85	36,75	

Tabla 3. Resumen de resultados obtenidos en todos los estudios realizados

Llama especialmente la atención el caso del animal número 16, por ser el único presente en el grupo del sesgo cognitivo negativo que ha presentado valores de pH y drip loss que permiten clasificar su carne como buena. Al observar los análisis realizados se ve que los valores alcanzados en PD y LPO son superiores a los demás de buena calidad, lo cual resultaría inesperado si fuese por los altísimos valores que presente, muy superiores a la media, de AAT. Nuevamente parece ser que la AAT se decanta como un valor directamente relacionado con la calidad de la carne.

4.2. BIOMARCADORES AUTOFÁGICOS.

Como ya se ha visto, el proceso de conversión de músculo en carne varía dependiendo del estrés sufrido por el animal. Se supone desde hace tiempo que este estrés debe modular significativamente los múltiples mecanismos celulares y titulares que se disparan en los animales en el momento del sacrificio. Sin embargo, hasta el momento, no se sabe cuáles son y cómo se modulan. Este estrés puede afectar directamente al mecanismo que la célula sigue ante el sacrificio. Es conocido que el sacrificio provoca una abrupta pérdida de oxígeno que induce el disparo de mecanismos de supervivencia celular a la espera de que desaparezca esta intensa hipoxia. El principal mecanismo de supervivencia celular es la autofagia, la existencia de la cual durante las primeras horas posteriores al sacrificio ha sido recientemente demostrada por nuestro grupo (García-Macia, 2013). Sin embargo este mecanismo puede verse alterado ante situaciones de estrés que, como ya se describió anteriormente, varían sustancialmente los daños de proteínas, de lípidos y los niveles de pH. Para conocer estas alteraciones se han evaluado biomarcadores del proceso autofágico en el músculo, estudiando su evolución a distintas horas tras el sacrificio y relacionándolo con el proceso de tenderización.

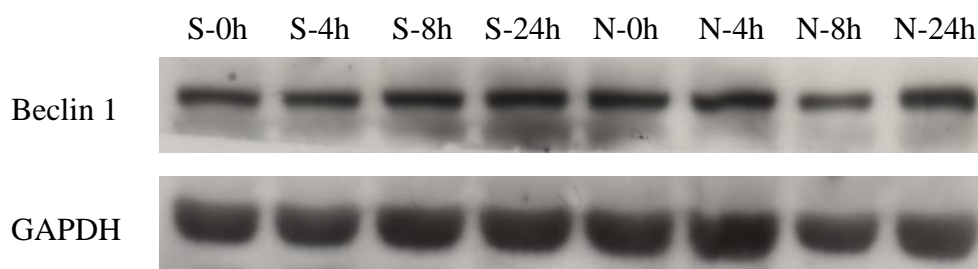
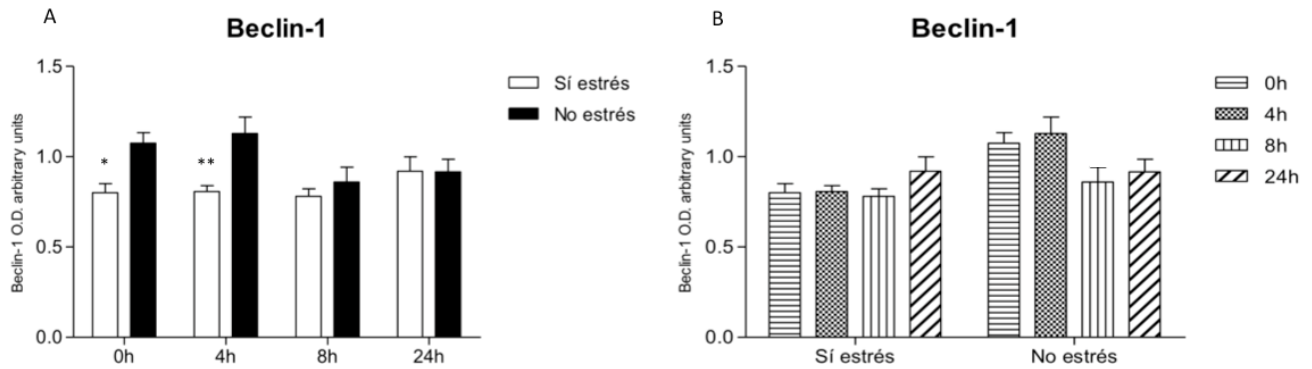


Figura 17. Análisis WB representativo de las pruebas realizadas de Beclin 1 (60 kDa) y GAPDH (37 kDa). Dos grupos experimentales, Sí estrés (S) y No estrés (N) durante 0h, 4h, 8h y 24h *post-mortem*.



	Tiempo (horas)				sig.
	0h	4h	8h	24h	
No estrés	1,07 \pm 0,29 ^a	1,13 \pm 0,44 ^{b,c}	0,86 \pm 0,41	0,91 \pm 0,34	ns
Sí estrés	0,80 \pm 0,25	0,81 \pm 0,16	0,78 \pm 0,20	0,92 \pm 0,39	ns

Tabla 4. Resumen de los datos estadísticos obtenidos en Beclin 1 (gráfica B). Los datos se presentan como media \pm DS de al menos tres experimentos por separado. En el grupo de No estrés las diferencias estadísticas se representan: a = $p < 0,05$ vs 8h; b = $p < 0,01$ vs 8h; c = $p < 0,05$ vs 24h. En el grupo de Sí estrés no se encontraron diferencias significativas tras.

Beclin 1 es un homólogo en mamíferos de Atg7 de levaduras y se encuentra implicado en la formación de autofagosomas por lo que se trata de un marcador por excelencia de cualquier proceso autofágico. Como el estrés provoca un decrecimiento significativo de los niveles de Beclin 1 en los primeros momentos posteriores al sacrificio (0h y 4h), que poco a poco va recuperándose al avanzar el periodo de tenderización ya que la autofagia es un mecanismo de supervivencia que la célula dispara (Klionsky, 2013), se observa como los animales estresados, que como hemos

indicado anteriormente tienen un mayor estrés oxidativo, reducen su capacidad de disparo autofágico. Esta reducción, y el incremento en el estrés, puede favorecer el disparo de procesos de muerte celular (Wu et al., 2013), lo que provocaría una tenderización más rápida, hecho consecuente con el mayor descenso de pH observado en estos animales y que iría en detrimento de la calidad de la carne.

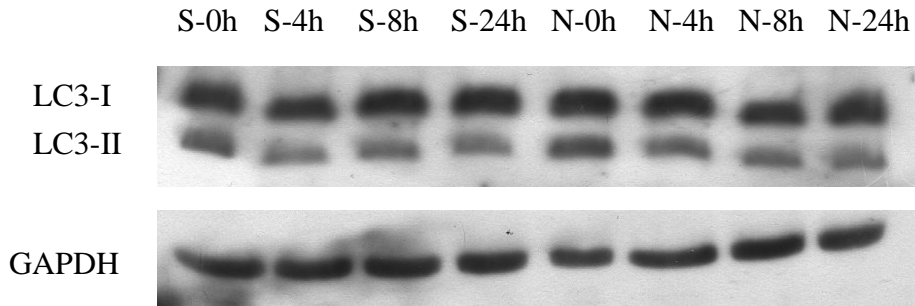


Figura 19. Análisis WB representativo de las pruebas realizadas de LC3-I (18 kDa), LC3-II (16 kDa) y GAPDH (37 kDa). Dos grupos experimentales, Sí estrés (S) y No estrés (N) durante 0h, 4h, 8h y 24h *post-mortem*.

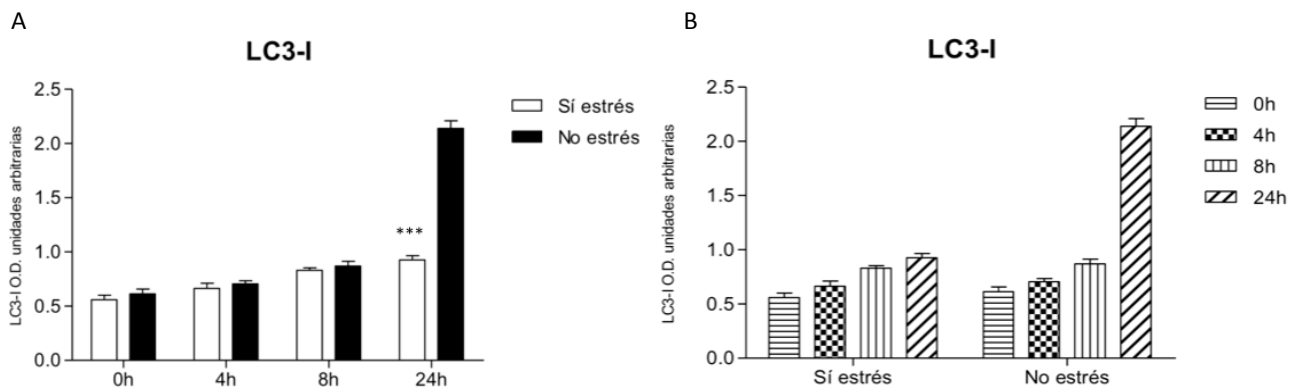


Figura 20. Densitometría de los WB LC3-I normalizados con la GAPDH para los distintos grupos experimentales (unidades arbitrarias). (A) Representación gráfica según la evolución *post-mortem* a distintas horas, 0h, 4h, 8h y 24h. ***: $p < 0,001$. (B) Representación gráfica de los dos grupos experimentales, Sí estrés y No estrés.

	Tiempo (horas)				sig.
	0h	4h	8h	24h	
No estrés	0,61±0,19 ^a	0,704±0,12 ^{b,c}	0,87±0,18	2,14±0,29	ns
Sí estrés	0,56±0,18 ^a	0,663±0,23 ^{b,c}	0,83±0,09 ^c	0,92±0,17	***

Tabla 5. Resumen de los datos estadísticos obtenidos en LC3-I (gráfica B). Los datos se presentan como media \pm DS de al menos tres experimentos por separado. ***: $p < 0,001$. En el grupo de No estrés las diferencias estadísticas se representan: a = $p < 0,001$ vs 8h y 24h; b = $p < 0,05$ vs 8h; c = $p < 0,001$ vs 24h. En el grupo de Sí estrés las diferencias estadísticas entre los grupos temporales fueron obtenidas se representan: a = $p < 0,001$ vs 8h y 24h; b = $p < 0,05$ vs 8h; c = $p < 0,001$ vs 24h.

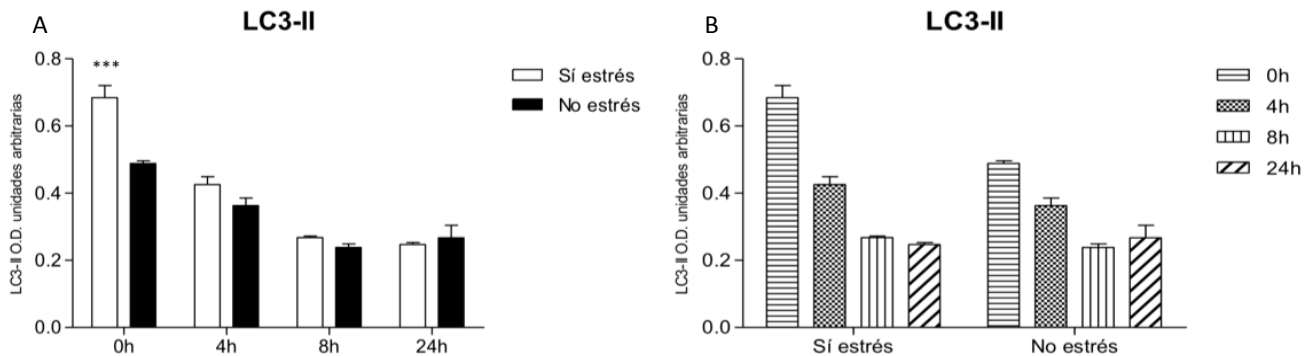


Figura 21. Densitometría de los WB LC3-II normalizados con la GAPDH para los distintos grupos experimentales (unidades arbitrarias). (A) Representación gráfica según la evolución post-mortem a distintas horas, 0h, 4h, 8h y 24h. ***: $p < 0,001$. (B) Representación gráfica de los dos grupos experimentales, Sí estrés y No estrés.

	Tiempo (horas)				sig.
	0h	4h	8h	24h	
No estrés	0,49±0,03 ^a	0,36±0,09 ^{b,c}	0,24±0,04	0,27±0,16	**
Sí estrés	0,68±0,15 ^a	0,42±0,09 ^b	0,27±0,02	0,25±0,02	*

Tabla 6. Resumen de los datos estadísticos obtenidos en LC3-II (gráfica B). Los datos se presentan como media \pm DS de al menos tres experimentos por separado. **: $p < 0,01$; . *: $p < 0,05$. En el grupo de No estrés las diferencias estadísticas se representan: a = $p < 0,001$ vs 4h, 8h y 24h; b = $p < 0,001$ vs 8h; c = $p < 0,01$ vs 24h. En el grupo de Sí estrés las diferencias estadísticas entre los grupos temporales fueron obtenidas ser representan: a = $p < 0,001$ vs 4h, 8h y 24h; b = $p < 0,001$ vs 8h y 24h.

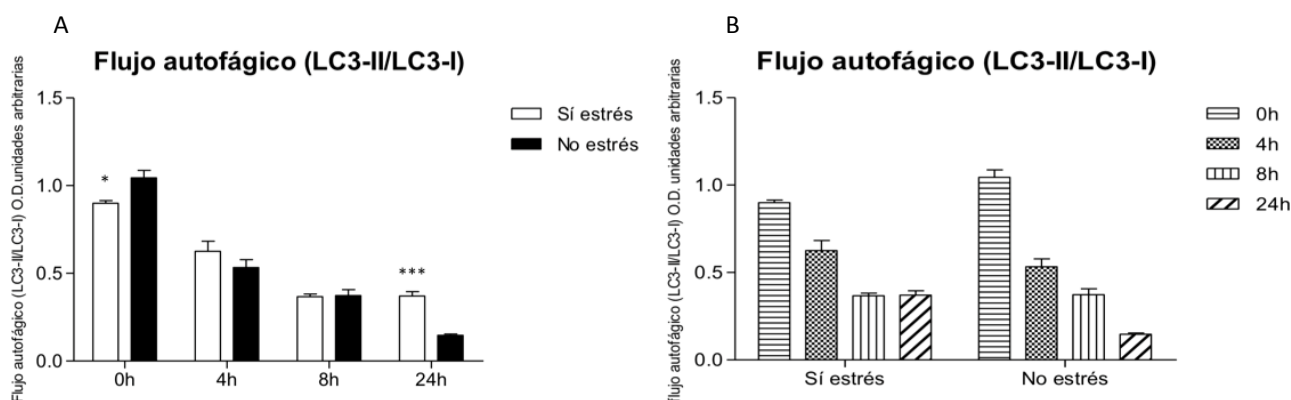


Figura 22. Densitometría de los WB LC3-II/LC3-I normalizados con la GAPDH para los distintos grupos experimentales (unidades arbitrarias). (A) Representación gráfica según la evolución post-mortem a distintas horas, 0h, 4h, 8h y 24h. * $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$. (B) Representación gráfica de los dos grupos experimentales, Sí estrés y No estrés.

	Tiempo (horas)				sig.
	0h	4h	8h	24h	
No estrés	1,04±0,18 ^a	0,53±0,19 ^{b,c}	0,37±0,14 ^c	0,15±0,03	**
Sí estrés	0,90±0,07 ^a	0,62±0,24 ^b	0,37±0,06	0,37±0,1	***

Tabla 7. Resumen de los datos estadísticos obtenidos en el ratio LC3-II/LC3-I (gráfica B). Los datos se presentan como media \pm DS de al menos tres experimentos por separado. **: $p < 0,01$; . ***: $p < 0,001$. En el grupo de No estrés las diferencias estadísticas se representan: a = $p < 0,001$ vs 4h, 8h y 24h; b = $p < 0,01$ vs 8h; c = $p < 0,001$ vs 24h. En el grupo de Sí estrés las diferencias estadísticas entre los grupos temporales fueron obtenidas tras aplicar un test de Bonferroni, específicamente: a = $p < 0,001$ vs 4h, 8h y 24h; b = $p < 0,001$ vs 8h y 24h.

MAP-LC3 (microtubule-associated protein light chain 3) homólogo en mamíferos de Atg8 de levaduras, es una proteína asociada a los microtúbulos que se modifica post-traduccionalmente para dar lugar a: LC3-I que es la forma citosólica y se convierte en LC3-II durante procesos autofágicos, localizándose en la membrana de preautofagosomas y autofagosomas.

Los resultados obtenidos muestran que se produce un incremento de LC3-I con el tiempo, a medida que la capacidad de la autofagia va disminuyendo. Por ello, este incremento tan significativo de LC3-I a las 24 horas en la carne procedente de animales no estresados indica, sin lugar a dudas, que la autofagia comienza a finalizar su actividad.

En LC3-II, sólo producto del proceso autofágico, se observa un incremento significativo de expresión en los animales estresados por encima de los no estresados, siendo este resultado curioso porque parece indicar que la autofagia se encuentra más activa en los animales estresados, en contraposición a los resultados observados anteriormente para Beclin 1.

Sin embargo, hemos de recordar que la conversión de LC3-I a LC3-II se relaciona con la formación de autofagosomas. Por tanto, además de los datos

individuales es indispensable mirar el ratio autofágico LC3-II/LC3-I (Skop et al., 2012).

Este proyecto se ha abordado mediante la implantación de un estrés artificial, que se sumará al que inevitablemente los animales sufren en el momento del sacrificio. Si además se le induce un estrés adicional la respuesta por parte del organismo del animal se ve estimulada. Así pues, la respuesta autofágica es muy rápida en ambas situaciones. Sin embargo se han observado diferencias significativas entre ambos grupos, mostrando una reducción en la autofagia en los animales con estrés oxidativo. Se cree que ante una pérdida abrupta de oxígeno los animales no estresados experimentan una respuesta más rápida de autofagia, debido a que el grupo de estresados ya ha sufrido situaciones adversas que ya han provocado efectos importantes como un incremento extra de radicales libres y una clara acidificación del medio, superior a la que presentan los no estresados. En ambos casos, este proceso tiene consecuencias en la tenderización.

El proceso de maduración de la carne es uno de los procesos más importantes para la obtención de un grado satisfactorio de terneza. La tenderización no deja de ser consecuencia de la degradación de las proteínas del citoesqueleto que mantienen la integridad estructural de las miofibrillas musculares. Pero, la velocidad en la que se lleve a cabo este proceso va a tener consecuencias importantes en la aceptación por parte del consumidor.

Nuestros resultados mostraron que ambos grupos experimentales, animales estresados y no estresados, desarrollan autofagia como respuesta adaptativa para mantener la supervivencia celular bajo condiciones estresantes. Esta estrategia tiene efectos muy importantes en el proceso de maduración de la carne, ya que induce retrasos en la desintegración de los discos Z, de la pérdida de alineación transversal de los sarcómeros y de la división longitudinal de las miofibrillas (García-Macia, 2013). Este retraso provoca que la tenderización sea lenta y de lugar a unas características organolépticas óptimas.

Nuestros resultados muestran, no sólo la existencia de procesos autofágicos sino también diferencias claras en el disparo de la misma entre grupos. Se ha visto que el grupo de animales no estresados desencadena una respuesta autofágica tratando de lograr la supervivencia celular y, por lo tanto, obtener un grado adecuado de

ablandamiento durante la tenderización; mientras que aquellos pertenecientes al grupo de sí estrés a pesar de desarrollar una respuesta autofágica, ésta se ve muy retrasada y bloqueada, probablemente debido a los daños oxidativos producidos, dando lugar a carnes de peor calidad.

La información que nos indica como realmente evoluciona la autofagia es el cociente LC3-II/LC3-I y éste sí concuerda con los resultados anteriormente obtenidos para Beclin 1, que indican que el mecanismo de supervivencia está más activado en los animales no estresados. Es más, en base a los resultados obtenidos, se puede hipotetizar que los animales estresados presentan un cierto bloqueo en la unión de los autofagosomas a los lisosomas, lo que indudablemente puede ser la causa del enlentecimiento de la autofagia ya que así se ha demostrado en otras circunstancias (Vega-Naredo et al., 2012). Sin embargo, estas hipótesis y su relación con el estrés psicológico experimentado por los animales, deberían ser comprobadas en estudios posteriores.

Los resultados obtenidos permiten una mayor comprensión de los procesos que subyacen a la maduración de la carne. Tanto el proceso autofágico como el sistema antioxidante celular manifestados tras el sacrificio del animal, permiten combatir los daños oxidativos y pueden relacionarse directamente como parámetros determinantes de la calidad tecnológica y sensorial de la carne.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES:

- El estrés psicológico provoca pérdida de calidad vía estrés oxidativo.
- Individuos temerosos presentan un estrés en el sacrificio que se traduce en un mayor daño a macromoléculas.
- El estrés psicológico del individuo en el momento del sacrificio provoca un bloqueo de la autofagia durante la tenderización temprana.

LISTA DE SÍMBOLOS

6. LISTA DE SÍMBOLOS:

2,4-DNP	2,4- dinitrofenilhidrazina
4-HNE	4-hidroxi-2-nonenal
AAT	Actividad antioxidante total
ACTH	Hormona adrenocorticotropa o corticotropina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de la varianza de un factor
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
CAT	Catalasa
CMA	Autofagia mediada por chaperonas
CRA	Capacidad de retención de agua
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
DFD	Oscura, dura y seca
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción electroforética
EROs	Especies reactivas de oxígeno
EEUU	Estados Unidos
GR	Glutación reductasa
GSSG	Glutación oxidado
GSH-Px	Glutación peroxidasa
HRP	Peroxidasa de rábano
IRTA	Instituto de investigación y tecnología agroalimentaria
kDa	KiloDalton
LAMP-2	Proteína asociada a la membrana lisosomal 2
LH	Ácido graso.
LPO	Lipoperoxidación
LT	<i>Longissimus thoracis</i>
Mb	Deoximioglobina
MbO2	Oximioglobina
MCP	Muerte celular programada
MDA	Malondialdehído
MH	Hipertermia maligna

MMb	Metamioglobina
NADPH	Nicotinamida adenosina dinucleótido fosfato
NO	Óxido nítrico
PD	Daño de proteínas
PSE	Pálida, blanda y exudativa
PSS	Síndrome de estrés porcino
PVN	Núcleo paraventricular del hipotálamo
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida
SM	<i>Semimembranosus</i>
SOD	Superóxido dismutasa
TCA	Tricloroacético
TBS	Tampón tris salino
TBS-T	Tampón tris salino con tween
UE	Unión Europea
UP	Ubiquitina proteasoma
WB	Western blot

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA:

- Ahn, D.U., K.C. Nam, M. Du, and C. Jo. 2001. Volatile production in irradiated normal, pale soft exudative (PSE) and dark firm dry (DFD) pork under different packaging and storage conditions. *Meat science*. 57:419-426.
- Ámsterdam., T.d. 1997. Protocolo sobre la protección y el bienestar de los animales anexo al Tratado de la Comunidad Europea. *In Diario Oficial*. C 340 de 310.311.1997, p. 1110. .
- Anderson, M.S., J.; Petersen, A.; Honarvar, A.K.; Karlsson, J.O. 2000. Caspase and proteasome activity during staurosporin induced apoptosis in lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.:2623-2632.
- Apple, J.K., E.B. Kegley, D.L. Galloway, T.J. Wistuba, and L.K. Rakes. 2005. Duration of restraint and isolation stress as a model to study the dark-cutting condition in cattle. *Journal of animal science*. 83:1202-1214.
- Arnao, M.C.A.A.M. 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. .73:239-244.
- Arthington, J.D., S.D. Eichert, W.E. Kunkle, and F.G. Martin. 2003. Effect of transportation and commingling on the acute-phase protein response, growth, and feed intake of newly weaned beef calves. *Journal of animal science*. 81:1120-1125.
- Attaix, D., L. Combaret, M.N. Pouch, and D. Taillandier. 2001. Regulation of proteolysis. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 4:45-49.
- Averos, X., L. Brossard, J.Y. Dourmad, K.H. de Greef, S.A. Edwards, and M.C. Meunier-Salaun. 2012. Meta-analysis on the effects of the physical environment, animal traits, feeder and feed characteristics on the feeding behaviour and performance of growing-finishing pigs. *Animal : an international journal of animal bioscience*. 6:1275-1289.
- Baz, A., L. Henry, R. Caravano, K. Scherrer, and J.P. Bureau. 1997. Changes in the subunit distribution of prosomes (MCP-proteasomes) during the differentiation of human leukemic cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 72:467-476.
- Bee, G., C. Biolley, G. Guex, W. Herzog, S.M. Lonergan, and E. Huff-Lonergan. 2006. Effects of available dietary carbohydrate and preslaughter treatment on glycolytic potential, protein degradation, and quality traits of pig muscles. *Journal of animal science*. 84:191-203.
- Boissy, A. 1995. Fear and fearfulness in animals. *The Quarterly review of biology*. 70:165-191.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 72:248-254.
- Brix, K., A. Dunkhorst, K. Mayer, and S. Jordans. 2008. Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions. *Biochimie*. 90:194-207.
- Buller, H.R., E. 2008. Welfare quality factsheet. *In Marketing animal welfare*. , Wageningen, NL.
- Buller, H.R., E. 2009. What can we tell consumers and retailers? *In Paper to the welfare quality final conference*., Uppsala, Sweden.

- Burke, N.C., G. Scaglia, H.T. Boland, and W.S. Swecker, Jr. 2009. Influence of two-stage weaning with subsequent transport on body weight, plasma lipid peroxidation, plasma selenium, and on leukocyte glutathione peroxidase and glutathione reductase activity in beef calves. *Veterinary immunology and immunopathology*. 127:365-370.
- Chatgililoglu, C., and P. O'Neill. 2001. Free radicals associated with DNA damage. *Experimental gerontology*. 36:1459-1471.
- Chrystall, B.B.D., C.E. 1985. Electrical stimulation: its early development in New Zealand. *Advances in Meat Reserach*:73-119.
- Cong, J., D.E. Goll, A.M. Peterson, and H.P. Kapprell. 1989. The role of autolysis in activity of the Ca²⁺-dependent proteinases (mu-calpain and m-calpain). *The Journal of biological chemistry*. 264:10096-10103.
- Coto-Montes, A., and R. Hardeland. 1999. Antioxidative effects of melatonin in *Drosophila melanogaster*: antagonization of damage induced by the inhibition of catalase. *Journal of pineal research*. 27:154-158.
- Coto-Montes, A.C., B.; Sierra, V.; Vega-Naredo, I.; Tomás-Zapico, C.; Hardeland, R.; Tolivia, D.; Ureña, F.; Rodríguez-Colunga, M.J. 2004. Actividad de los principales enzimas antioxidantes durante el periodo de oreo de culones de la raza asturiana de los valles. *ITEA*. 100A:43-55.
- Coux, O., K. Tanaka, and A.L. Goldberg. 1996. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annual review of biochemistry*. 65:801-847.
- Cuervo, A.M. 2004. Autophagy: many paths to the same end. *Molecular and cellular biochemistry*. 263:55-72.
- Cuervo, A.M., and J.F. Dice. 1996. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science*. 273:501-503.
- Dean, R.T., S. Fu, R. Stocker, and M.J. Davies. 1997. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *The Biochemical journal*. 324 (Pt 1):1-18.
- Delgado, E.F., G.H. Geesink, J.A. Marchello, D.E. Goll, and M. Koohmaraie. 2001. The calpain system in three muscles of normal and callipyge sheep. *Journal of animal science*. 79:398-412.
- Esterbauer, H., M. Dieber-Rotheneder, G. Waeg, H. Puhl, and F. Tatzber. 1990. Endogenous antioxidants and lipoprotein oxidation. *Biochemical Society transactions*. 18:1059-1061.
- Esterbauer, H., R.J. Schaur, and H. Zollner. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical biology & medicine*. 11:81-128.
- Farmer, L.J. 1994. The role of nutrients in meat flavour formation. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 53:327-333.
- Font I Furnols, M.R., C.E.; Guerrero, L.; Oliver, M.A.; Sañudo, C.; Campo, M.M.; Nute, G.R.; Cañeque, V.; Álvarez, I.; San Julián, R.; Luzardo, S.; Brito, G.; Montossi, F. 2009. Acceptability of lamb fed on pasture, concentrate or combinations of both systems by European consumers. *Meat science*:196-202.
- Fridovich, I. 1997. Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *The Journal of biological chemistry*. 272:18515-18517.
- Frisby, J., D. Raftery, J.P. Kerry, and D. Diamond. 2005. Development of an autonomous, wireless pH and temperature sensing system for monitoring pig meat quality. *Meat science*. 70:329-336.

- García-Macia, M.S., V.; Palanca-Cuñado, A.; Vega-Naredo, I.; Gonzalo-Calvo, D.; Rodríguez-González, S.; Oliván, M.; Coto-Montes, A. 2013. Autophagy during beef aging. *Autophagy*.
- Gardner, G.E., and J.M. Thompson. 2003. Muscle glycogen repletion in 3 breeds of young cattle is not affected by energy intake. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*. 12 Suppl:S38.
- Geesink, G.H., S. Kuchay, A.H. Chishti, and M. Koohmaraie. 2006. Micro-calpain is essential for postmortem proteolysis of muscle proteins. *Journal of animal science*. 84:2834-2840.
- Goll, D.E., G. Neti, S.W. Mares, and V.F. Thompson. 2008. Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains. *Journal of animal science*. 86:E19-35.
- Goll, D.E., V.F. Thompson, H. Li, W. Wei, and J. Cong. 2003. The calpain system. *Physiological reviews*. 83:731-801.
- Goll, D.E., V.F. Thompson, R.G. Taylor, and T. Zalewska. 1992. Is calpain activity regulated by membranes and autolysis or by calcium and calpastatin? *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 14:549-556.
- Green, D.R. 2005. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell*. 121:671-674.
- Gregory, N.G. Animal welfare and meat science. In CABI Publishing, USA. 64-92.
- Gregory, N.G. 2003. Animal welfare and meat science. CABI Publishing, USA.
- Grune, T., T. Jung, K. Merker, and K.J. Davies. 2004. Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and 'aggresomes' during oxidative stress, aging, and disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 36:2519-2530.
- Guerrero, L.G., M.D.; . 1998. Evaluación de la fiabilidad de un panel de cata. In III Jornadas de Análisis sensorial, Valdediós, Villaviciosa, Asturias.
- Hambrecht, E., J.J. Eissen, D.J. Newman, C.H. Smits, M.W. Verstegen, and L.A. den Hartog. 2005. Preslaughter handling effects on pork quality and glycolytic potential in two muscles differing in fiber type composition. *Journal of animal science*. 83:900-907.
- Hamm, R. 1986. Functional properties of the myofibrillar system and their measurements. In *Muscle as food*, Academic Press, Orlando. pp135-199.
- Hengartner, M.O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 407:770-776.
- Hoffman, D.E., M.F. Spire, J.R. Schwenke, and J.A. Unruh. 1998. Effect of source of cattle and distance transported to a commercial slaughter facility on carcass bruises in mature beef cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 212:668-672.
- Honikel, K.O. 1998. Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat science*. 49:447-457.
- Hopkins, D.L., and J.M. Thompson. 2002. The relationship between post-mortem calcium concentration or pH and indicators of proteolysis in ovine muscle. *Meat science*. 61:411-414.
- Houbak, M.B., P. Ertbjerg, and M. Therkildsen. 2008. In vitro study to evaluate the degradation of bovine muscle proteins post-mortem by proteasome and mu-calpain. *Meat science*. 79:77-85.
- Huang, C.J., H.E. Webb, R.K. Evans, K.A. McCleod, S.E. Tangsilat, G.H. Kamimori, and E.O. Acevedo. 2010. Psychological stress during exercise: immunoendocrine and oxidative responses. *Exp Biol Med (Maywood)*. 235:1498-1504.

- Huff Lonergan, E., W. Zhang, and S.M. Lonergan. 2010. Biochemistry of postmortem muscle - lessons on mechanisms of meat tenderization. *Meat science*. 86:184-195.
- Huff-Lonergan, E.M., T.; Beekman, D.D.; Parrish, F.C. Jr; Olson, D.G.; Robson, R.M. 1996. Proteolysis of specific muscle structural proteins by mu-calpain at low pH and temperature is similar to degradation in postmortem bovine muscle. *Journal of animal science*:993-1008.
- Immonen, K., and E. Puolanne. 2000. Variation of residual glycogen-glucose concentration at ultimate pH values below 5.75. *Meat science*. 55:279-283.
- Jia, X., K. Hollung, M. Therkildsen, K.I. Hildrum, and E. Bendixen. 2006. Proteome analysis of early post-mortem changes in two bovine muscle types: M. longissimus dorsi and M. semitendinosus. *Proteomics*. 6:936-944.
- Johnson, M.H., C.R. Calkins, R.D. Huffman, D.D. Johnson, and D.D. Hargrove. 1990. Differences in cathepsin B + L and calcium-dependent protease activities among breed type and their relationship to beef tenderness. *Journal of animal science*. 68:2371-2379.
- Kaushik, S., and A.M. Cuervo. 2006. Autophagy as a cell-repair mechanism: activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Molecular aspects of medicine*. 27:444-454.
- King, D.A., C.E. Schuehle Pfeiffer, R.D. Randel, T.H. Welsh, Jr., R.A. Oliphint, B.E. Baird, K.O. Curley, Jr., R.C. Vann, D.S. Hale, and J.W. Savell. 2006. Influence of animal temperament and stress responsiveness on the carcass quality and beef tenderness of feedlot cattle. *Meat science*. 74:546-556.
- Kirkman, H.N., and G.F. Gaetani. 1984. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 81:4343-4347.
- Kirkman, H.N., S. Galiano, and G.F. Gaetani. 1987. The function of catalase-bound NADPH. *The Journal of biological chemistry*. 262:660-666.
- Kirschke, H., A.J. Barrett, and N.D. Rawlings. 1995. Proteinases 1: lysosomal cysteine proteinases. *Protein profile*. 2:1581-1643.
- Klauke, T.N., M. Pineiro, S. Schulze-Geisthovel, S. Plattes, T. Selhorst, and B. Petersen. 2013. Coherence of animal health, welfare and carcass quality in pork production chains. *Meat science*.
- Klionsky, D. 2013. An overview of autophagy: Morphology, mechanism and regulation. *Antioxidants & redox signaling*.
- Koohmaraie, M. 1992. Ovine skeletal muscle multicatalytic proteinase complex (proteasome): purification, characterization, and comparison of its effects on myofibrils with mu-calpains. *Journal of animal science*. 70:3697-3708.
- Koohmaraie, M., and G.H. Geesink. 2006. Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat science*. 74:34-43.
- Koohmaraie, M., S.C. Seidemann, J.E. Schollmeyer, T.R. Dutson, and J.D. Crouse. 1987. Effect of post-mortem storage on Ca(++)-dependent proteases, their inhibitor and myofibril fragmentation. *Meat science*. 19:187-196.
- Koohmaraie, M., G. Whipple, D.H. Kretchmar, J.D. Crouse, and H.J. Mersmann. 1991. Postmortem proteolysis in longissimus muscle from beef, lamb and pork carcasses. *Journal of animal science*. 69:617-624.

- Koohmaraie, M.S., S.C.; Schollmeyer, J.E.; Dutson, T.R.; Babiker, A.S. 1988. Factors associated with the tenderness of three bovine muscles. *Journal of animal science*:934-942.
- Kos, J., and T.T. Lah. 1998. Cysteine proteinases and their endogenous inhibitors: target proteins for prognosis, diagnosis and therapy in cancer (review). *Oncology reports*. 5:1349-1361.
- Kregel, K.C., and H.J. Zhang. 2007. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. 292:R18-36.
- Kreikemeier, K.K., J.A. Unruh, and T.P. Eck. 1998. Factors affecting the occurrence of dark-cutting beef and selected carcass traits in finished beef cattle. *Journal of animal science*. 76:388-395.
- Kumamoto, T., H. Ueyama, R. Sugihara, E. Kominami, D.E. Goll, and T. Tsuda. 1997. Calpain and cathepsins in the skeletal muscle of inflammatory myopathies. *European neurology*. 37:176-181.
- Lamare, M., R.G. Taylor, L. Farout, Y. Briand, and M. Briand. 2002. Changes in proteasome activity during postmortem aging of bovine muscle. *Meat science*. 61:199-204.
- Lecker, S.H., V. Solomon, S.R. Price, Y.T. Kwon, W.E. Mitch, and A.L. Goldberg. 1999. Ubiquitin conjugation by the N-end rule pathway and mRNAs for its components increase in muscles of diabetic rats. *The Journal of clinical investigation*. 104:1411-1420.
- Leheska, J.M., D.M. Wulf, and R.J. Maddock. 2002. Effects of fasting and transportation on pork quality development and extent of postmortem metabolism. *Journal of animal science*. 80:3194-3202.
- Lesiow, T., and Y.L. Xiong. 2013. A simple, reliable and reproductive method to obtain experimental pale, soft and exudative (PSE) pork. *Meat science*. 93:489-494.
- Levine, B., and D.J. Klionsky. 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental cell*. 6:463-477.
- Levine, R.L., D. Garland, C.N. Oliver, A. Amici, I. Climent, A.G. Lenz, B.W. Ahn, S. Shaltiel, and E.R. Stadtman. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology*. 186:464-478.
- Liang, X., K. Chen, B. Fruen, J. Hu, J. Ma, X. Hu, and J. Parness. 2009. Impaired interaction between skeletal ryanodine receptors in malignant hyperthermia. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*. 1:533-539.
- Liu, J., X. Wang, M.K. Shigenaga, H.C. Yeo, A. Mori, and B.N. Ames. 1996. Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 10:1532-1538.
- Luczaj, W., and E. Skrzydlewska. 2003. DNA damage caused by lipid peroxidation products. *Cellular & molecular biology letters*. 8:391-413.
- Mach, N., A. Bach, A. Velarde, and M. Devant. 2008. Association between animal, transportation, slaughterhouse practices, and meat pH in beef. *Meat science*. 78:232-238.

- Majno, G., and I. Joris. 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American journal of pathology*. 146:3-15.
- Mancini, R.A., and M.C. Hunt. 2005. Current research in meat color. *Meat science*. 71:100-121.
- Massey, A.C., C. Zhang, and A.M. Cuervo. 2006. Chaperone-mediated autophagy in aging and disease. *Current topics in developmental biology*. 73:205-235.
- McKeith, R.O., and T.D. Pringle. 2013. Quality attributes and color characteristics in three-piece boneless hams. *Meat science*. 95:59-63.
- Melody, J.L., S.M. Lonergan, L.J. Rowe, T.W. Huiatt, M.S. Mayes, and E. Huff-Lonergan. 2004. Early postmortem biochemical factors influence tenderness and water-holding capacity of three porcine muscles. *Journal of animal science*. 82:1195-1205.
- Menabde, K.O., G.M. Burdzhnanadze, M.V. Chachua, Z.T. Kuchukashvili, and N.I. Koshoridze. 2011. [Tissue specificity of lipid peroxidation under emotional stress in rats]. *Ukrainskii biokhimicheskii zhurnal*. 83:85-90.
- Moberg, G.P.M., J.A. 2001. The biology of animal stress. Basic principles and implications for animal welfare. UK CABI Publishing, Oxon. 309-336.
- Moldoveanu, T., C.M. Hosfield, D. Lim, J.S. Elce, Z. Jia, and P.L. Davies. 2002. A Ca(2+) switch aligns the active site of calpain. *Cell*. 108:649-660.
- Monson, F., C. Sanudo, and I. Sierra. 2005. Influence of breed and ageing time on the sensory meat quality and consumer acceptability in intensively reared beef. *Meat science*. 71:471-479.
- Mounier, L., H. Dubroeuq, S. Andanson, and I. Veissier. 2006. Variations in meat pH of beef bulls in relation to conditions of transfer to slaughter and previous history of the animals. *Journal of animal science*. 84:1567-1576.
- Murani, E., S. Ponsuksili, R.B. D'Eath, S.P. Turner, G. Evans, L. Tholking, E. Kurt, R. Klont, A. Foury, P. Mormede, and K. Wimmers. 2011. Differential mRNA expression of genes in the porcine adrenal gland associated with psychosocial stress. *Journal of molecular endocrinology*. 46:165-174.
- Neti, G., S.M. Novak, V.F. Thompson, and D.E. Goll. 2009. Properties of easily releasable myofilaments: are they the first step in myofibrillar protein turnover? *American journal of physiology. Cell physiology*. 296:C1383-1390.
- Nockels, C.F., K.G. Odde, and A.M. Craig. 1996. Vitamin E supplementation and stress affect tissue alpha-tocopherol content of beef heifers. *Journal of animal science*. 74:672-677.
- O'Brien, P.J., H. Shen, C.R. Cory, and X. Zhang. 1993. Use of a DNA-based test for the mutation associated with porcine stress syndrome (malignant hyperthermia) in 10,000 breeding swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 203:842-851.
- O'Halloran, G.R., D.J. Troy, D.J. Buckley, and W.J. Reville. 1997. The role of endogenous proteases in the tenderisation of fast glycolysing muscle. *Meat science*. 47:187-210.
- Offer, G., and J. Trinick. 1983. On the mechanism of water holding in meat: The swelling and shrinking of myofibrils. *Meat science*. 8:245-281.
- Ohsumi, Y. 2001. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2:211-216.
- Ouali, A. 1992. Proteolytic and physicochemical mechanisms involved in meat texture development. *Biochimie*. 74:251-265.

- Ouali, A., C.H. Herrera-Mendez, G. Coulis, S. Becila, A. Boudjellal, L. Aubry, and M.A. Sentandreu. 2006. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat science*. 74:44-58.
- Paniagua, R.N., M.; Sesma, P.; Álvarez-Uría, M.; Fraile, B. 1996. Histología Vegetal y Animal. Biología de las células y tejidos animales y vegetales, Madrid, España.
- Pasquini, L.A., C.B. Marta, A.M. Adamo, J.M. Pasquini, and E.F. Soto. 2000. Relationship between the ubiquitin-dependent pathway and apoptosis in different cells of the central nervous system: effect of thyroid hormones. *Neurochemical research*. 25:627-635.
- Peters, J.M., W.W. Franke, and J.A. Kleinschmidt. 1994. Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *The Journal of biological chemistry*. 269:7709-7718.
- Pierrefiche, G., and H. Laborit. 1995. Oxygen free radicals, melatonin, and aging. *Experimental gerontology*. 30:213-227.
- Polati, R., M. Menini, E. Robotti, R. Millioni, E. Marengo, E. Novelli, S. Balzan, and D. Cecconi. 2012. Proteomic changes involved in tenderization of bovine Longissimus dorsi muscle during prolonged ageing. *Food chemistry*. 135:2052-2069.
- Pomponio, L., P. Ertbjerg, A.H. Karlsson, L.N. Costa, and R. Lametsch. 2010. Influence of early pH decline on calpain activity in porcine muscle. *Meat science*. 85:110-114.
- Prosser, B.L., R.J. Khairallah, A.P. Ziman, C.W. Ward, and W.J. Lederer. 2013. X-ROS signaling in the heart and skeletal muscle: stretch-dependent local ROS regulates [Ca(2)(+)]_i. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 58:172-181.
- Purintrapiban, J., M.C. Wang, and N.E. Forsberg. 2003. Degradation of sarcomeric and cytoskeletal proteins in cultured skeletal muscle cells. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*. 136:393-401.
- Rasmussen, A.J.A., M. 1996. New method for determination of drip loss in pork muscles. In Hildrum & Risvik. *In 42nd International Congress of Meat Science and Technology, Lillehammer, Norway* 286-287.
- Rennerre, M., K. Poncet, Y. Mercier, P. Gatellier, and B. Metro. 1999. Influence of dietary fat and vitamin E on antioxidant status of muscles of turkey. *Journal of agricultural and food chemistry*. 47:237-244.
- Ritter, M.J., M. Ellis, D.B. Anderson, S.E. Curtis, K.K. Keffaber, J. Killefer, F.K. McKeith, C.M. Murphy, and B.A. Peterson. 2009. Effects of multiple concurrent stressors on rectal temperature, blood acid-base status, and longissimus muscle glycolytic potential in market-weight pigs. *Journal of animal science*. 87:351-362.
- Robert, N., M. Briand, R. Taylor, and Y. Briand. 1999. The effect of proteasome on myofibrillar structures in bovine skeletal muscle. *Meat science*. 51:149-153.
- Ross, M.H.P., W. 2007. Tejido muscular. Histología. Texto y atlas color con Biología Celular y Molecular.
- Rowe, L.J., K.R. Maddock, S.M. Lonergan, and E. Huff-Lonergan. 2004. Oxidative environments decrease tenderization of beef steaks through inactivation of mu-calpain. *Journal of animal science*. 82:3254-3266.

- Sanz, M.C., M.T. Verde, T. Saez, and C. Sanudo. 1996. Effect of breed on the muscle glycogen content and dark cutting incidence in stressed young bulls. *Meat science*. 43:37-42.
- Schaefer, A.L., S.D. Jones, and R.W. Stanley. 1997. The use of electrolyte solutions for reducing transport stress. *Journal of animal science*. 75:258-265.
- Sekikawa, M.Y., M.; Fukushima, M.; Shimada, K.; Ishikawa, T.; Mikami, M. 2001. Effect of proteasome inhibitor on sarcoplasmic protein of bovine skeletal muscle during storage. *Food chemistry*:17-21.
- Sentandreu, M.A.C., G.; Ouali, A. 2002. Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends in Food Science and Technology*:400-421.
- Serra, X., L. Guerrero, M.D. Guardia, M. Gil, C. Sanudo, B. Panea, M.M. Campo, J.L. Olleta, M.D. Garcia-Cachan, J. Piedrafita, and M.A. Oliver. 2008. Eating quality of young bulls from three Spanish beef breed-production systems and its relationships with chemical and instrumental meat quality. *Meat science*. 79:98-104.
- Shackelford, S.D., M. Koohmaraie, T.L. Wheeler, L.V. Cundiff, and M.E. Dikeman. 1994. Effect of biological type of cattle on the incidence of the dark, firm, and dry condition in the longissimus muscle. *Journal of animal science*. 72:337-343.
- Sierra, V., and M. Olivan. 2013. Role of mitochondria on muscle cell death and meat tenderization. *Recent patents on endocrine, metabolic & immune drug discovery*. 7:120-129.
- Silva, J.A., L. Patarata, and C. Martins. 1999. Influence of ultimate pH on bovine meat tenderness during ageing. *Meat science*. 52:453-459.
- Skop, V., M. Cahova, Z. Papackova, E. Palenickova, H. Dankova, M. Baranowski, P. Zabielski, J. Zdychova, J. Zidkova, and L. Kazdova. 2012. Autophagy-lysosomal pathway is involved in lipid degradation in rat liver. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. 61:287-297.
- Smith, R.F., and H. Dobson. 1990. Effect of preslaughter experience on behaviour, plasma cortisol and muscle pH in farmed red deer. *The Veterinary record*. 126:155-158.
- Sonna, L.A., J. Fujita, S.L. Gaffin, and C.M. Lilly. 2002. Invited review: Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *J Appl Physiol*. 92:1725-1742.
- Stoltze, L., A.K. Nussbaum, A. Sijts, N.P. Emmerich, P.M. Kloetzel, and H. Schild. 2000. The function of the proteasome system in MHC class I antigen processing. *Immunology today*. 21:317-319.
- Suzuki, K., S. Tsuji, S. Kubota, Y. Kimura, and K. Imahori. 1981. Limited autolysis of Ca²⁺-activated neutral protease (CANP) changes its sensitivity to Ca²⁺ ions. *Journal of biochemistry*. 90:275-278.
- Taillandier, D., L. Combaret, M.N. Pouch, S.E. Samuels, D. Bechet, and D. Attaix. 2004. The role of ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in the remodelling of skeletal muscle. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 63:357-361.
- Taylor, R.G., C. Tassy, M. Briand, N. Robert, Y. Briand, and A. Ouali. 1995. Proteolytic activity of proteasome on myofibrillar structures. *Molecular biology reports*. 21:71-73.

- Te Pas, M.F., L. Kruijt, M. Pierzchala, R.E. Crump, S. Boeren, E. Keuning, R. Hoving-Bolink, M. Hortos, M. Gispert, J. Arnau, A. Diestre, and H.A. Mulder. 2013. Identification of proteomic biomarkers in M. Longissimus dorsi as potential predictors of pork quality. *Meat science*.
- Tews, D.S. 2005. Muscle-fiber apoptosis in neuromuscular diseases. *Muscle & nerve*. 32:443-458.
- Thomas, A.R., H. Gondoza, L.C. Hoffman, V. Oosthuizen, and R.J. Naude. 2004. The roles of the proteasome, and cathepsins B, L, H and D, in ostrich meat tenderisation. *Meat science*. 67:113-120.
- Tomas-Zapico, C., B. Caballero, V. Sierra, I. Vega-Naredo, O. Alvarez-Garcia, D. Tolivia, M.J. Rodriguez-Colunga, and A. Coto-Montes. 2005. Survival mechanisms in a physiological oxidative stress model. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 19:2066-2068.
- Traore, S., L. Aubry, P. Gatellier, W. Przybylski, D. Jaworska, K. Kajak-Siemaszko, and V. Sante-Lhoutellier. 2012. Higher drip loss is associated with protein oxidation. *Meat science*. 90:917-924.
- Turk, B., D. Turk, and V. Turk. 2000. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochimica et biophysica acta*. 1477:98-111.
- Turrens, J.F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology*. 552:335-344.
- Uchida, K. 2003. Histidine and lysine as targets of oxidative modification. *Amino acids*. 25:249-257.
- Uchida, K., M. Shiraishi, Y. Naito, Y. Torii, Y. Nakamura, and T. Osawa. 1999. Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production. *The Journal of biological chemistry*. 274:2234-2242.
- van Laack, R.L., S.G. Stevens, and K.J. Stalder. 2001. The influence of ultimate pH and intramuscular fat content on pork tenderness and tenderization. *Journal of animal science*. 79:392-397.
- Vega-Naredo, I., B. Caballero, V. Sierra, M. Garcia-Macia, D. de Gonzalo-Calvo, P.J. Oliveira, M.J. Rodriguez-Colunga, and A. Coto-Montes. 2012. Melatonin modulates autophagy through a redox-mediated action in female Syrian hamster Harderian gland controlling cell types and gland activity. *Journal of pineal research*. 52:80-92.
- Vega-Naredo, I., and A. Coto-Montes. 2009. Physiological autophagy in the Syrian hamster Harderian gland. *Methods in enzymology*. 452:457-476.
- Viljoen, H.F., H.L. de Kock, and E.C. Webb. 2002. Consumer acceptability of dark, firm and dry (DFD) and normal pH beef steaks. *Meat science*. 61:181-185.
- Wang, L., G. Muxin, H. Nishida, C. Shirakawa, S. Sato, and T. Konishi. 2007. Psychological stress-induced oxidative stress as a model of sub-healthy condition and the effect of TCM. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. 4:195-202.
- Warner, R.D.B., J.J.; Kerr, M.G. 2000. Meat quality traits in lamb M.Longissimus thoracis et lumborum: The effect of pre-slaughter stress and electrical stimulation., Argentina. Buenos Aires. 154-155.
- Warner, R.D.F., D.M.; McDonagh, M.B.; Channon, H.A.; Cottrell, J.J.; Dunshea, F.R. 2005. Acute exercise stress and electrical stimulation influence the

- consumer perception of sheep meat eating quality and objective quality traits. *Australian Journal of Experimental Agriculture*:553-560.
- Warriss, P.D. 2003. Optimal lairage times and conditions for slaughter pigs: a review. *The Veterinary record*. 153:170-176.
- Weaver, A.D., B.C. Bowker, and D.E. Gerrard. 2009. Sarcomere length influences mu-calpain-mediated proteolysis of bovine myofibrils. *Journal of animal science*. 87:2096-2103.
- Whipple, G., M. Koohmaraie, M.E. Dikeman, J.D. Crouse, M.C. Hunt, and R.D. Klemm. 1990. Evaluation of attributes that affect longissimus muscle tenderness in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. *Journal of animal science*. 68:2716-2728.
- Wood, J.D.R., R.L.; Nute, G.R.; Fisher, A.V.; Campo, M.M.; Kasapidou, E.; Sheard, P.R.; Enser, M.A. 2003. Effects of fatty acids on meat quality reiew. *Meat science*:66, 21-32.
- Wordpress. 2007. Fisiología muscular. Componentes del músculo.
- Wu, Y., X. Zhang, X. Kang, N. Li, R. Wang, T. Hu, M. Xiang, X. Wang, W. Yuan, A. Chen, D. Meng, and S. Chen. 2013. Oxidative Stress Inhibits Adhesion and Transendothelial Migration and Induces Apoptosis and Senescence of Induced Pluripotent Stem Cells. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*.
- Yen, W.L., and D.J. Klionsky. 2008. How to live long and prosper: autophagy, mitochondria, and aging. *Physiology (Bethesda)*. 23:248-262.
- Yen, W.L., T. Shintani, U. Nair, Y. Cao, B.C. Richardson, Z. Li, F.M. Hughson, M. Baba, and D.J. Klionsky. 2010. The conserved oligomeric Golgi complex is involved in double-membrane vesicle formation during autophagy. *The Journal of cell biology*. 188:101-114.
- Zalachoras, I., R. Houtman, E. Atucha, R. Devos, A.M. Tijssen, P. Hu, P.M. Lockey, N.A. Datson, J.K. Belanoff, P.J. Lucassen, M. Joels, E.R. de Kloet, B. Roozendaal, H. Hunt, and O.C. Meijer. 2013. Differential targeting of brain stress circuits with a selective glucocorticoid receptor modulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110:7910-7915.
- Zeece, M.G.W., T.L.; Keen, M.A.; Reville, W.J. 1992. Role of proteinases and inhibitors in post.mortem muscle protein degradation. . In Proceedings of the Reciprocal Meat Conference., Colorado State University. 51-61.
- Zhang, S.X., M.M. Farouk, O.A. Young, K.J. Wieliczko, and C. Podmore. 2005. Functional stability of frozen normal and high pH beef. *Meat science*. 69:765-772.