

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**“CARACTERIZACIÓN DEL DAÑO
OXIDATIVO Y DE LA AUTOFAGIA POR
ESTRÉS A LO LARGO DE LA
MADURACIÓN DE LA CARNE DE
CERDO”**

**TRABAJO FIN DE MASTER
POR**

ADRIAN RUBIO GONZÁLEZ

JUNIO, 2014





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:

Dra. Dña. Ana Coto Montes (Universidad de Oviedo)

CERTIFICA:

Que D. **Adrian Rubio González** 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, 7^a promoción curso 2013-2014.

Oviedo, 6 de Junio de 2014

Dña. Ana Coto Montes

VºBº

Manuel Rendueles de la Vega

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTE TRABAJO FIN DE MASTER

Rubio-González A, Potes Y, Illán-Rodríguez D, Vega-Naredo I, Sierra V, Caballero B, Fàbrega E, Velarde A, Dalmau A, Oliván M, Coto-Montes A. Effect of animal mixing as a stressor on biomarkers of autophagy and oxidative stress during pig muscle maturation. *Animal*. 2014. Enviado para su publicación.

AGRADECIMIENTOS

En este apartado quiero dar las gracias a todas las personas que han ayudado a llevar a cabo este trabajo.

En primer lugar, a mis tutoras, la doctora Ana Coto-Montes y la doctora Mamen Oliván. A Mamen, por enseñarme todo lo que sé sobre la carne y más cosas sobre estadística de las que sabía. A Ana, por darme la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio y, así, dejarme empezar en este mundo de la ciencia. Gracias por ofrecerme tu confianza, por los consejos... por enseñarme.

A mis compañeros de laboratorio, Susana, Marina, Bea, Yaiza e Illán, por hacer más amenas las horas que nos pasamos allí dentro. A Susana, por dejarme disponer de todo lo que necesitaba en el laboratorio, tanto materiales como conocimientos. A Marina, la veterana, que nos conocimos en la carrera y me dio a conocer la existencia de este laboratorio, gracias por enseñarme lo que sabías cuando llegué aquí, aunque a veces tengamos nuestros más y nuestros menos, siempre me tendrás ahí. A Bea, mi “favorita”, gracias por todo el apoyo y todos los consejos que me das, científicos y no científicos. A Yaiza, gracias por los buenos ratos que nos haces pasar sobre cine. Y a Illán, la última incorporación, gracias por toda la ayuda que ofreces. También quiero dar las gracias al doctor Ignacio Vega-Naredo y a la doctora Beatriz Caballero por sus consejos y por estar siempre ahí para dar el toque de sabiduría y experiencia.

También quiero dar las gracias a los coordinadores y profesores del Master en Biotecnología alimentaria de la Universidad de Oviedo por todo lo que nos han enseñado en este curso. Al Departamento de Morfología y Biología celular de la Universidad de Oviedo y al Área de Sistemas de producción animal del Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario por acogerme y darme la oportunidad de realizar este trabajo.

Y por último, pero por no por ello menos importante, sino todo lo contrario, quiero dar las gracias a mi familia. Gracias a mis padres por vuestro apoyo, ayuda, confianza... sin vosotros, llegar hasta aquí no habría sido posible. Y a “güelita”, gracias por enseñarme a que, si las cosas no salen, se vuelven a intentar, y a creer que los sueños se pueden alcanzar.

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN	13
ABSTRACT	14
LISTA DE FIGURAS	16
LISTA DE TABLAS	17
INTRODUCCIÓN	19
CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y EXPERIMENTALES	23
El cerdo como animal	23
Raza de cerdo Large White	23
Raza de cerdo Landrace	24
Raza de cerdo Large White x Landrace	25
Raza de cerdo Duroc	26
El músculo	26
Conversión del músculo en carne	29
Principales cambios <i>post-mortem</i> en la arquitectura del músculo	31
Calidad de la carne	35
Parámetros indicativos de calidad de la carne	35
Factores que afectan a la calidad final de la carne	37
Estrés oxidativo	39
Defensa antioxidante	41
Daño oxidativo	44
Autofagia	48
METODOLOGÍA	53
Animales	53
Preparación de las muestras	54
Actividad antioxidante total	54
Actividad de la superóxido dismutasa	54
Actividad de la catalasa	55
Daño oxidativo de lípidos	55
Inmunoensayo Western Blot	55
Análisis estadístico	56
RESULTADOS EXPERIMENTALES	58
pH	58

Actividades antioxidantes	58
Actividad antioxidante total	59
Enzimas antioxidantes	59
Superóxido dismutasa	60
Catalasa	60
Daño oxidativo de lípidos	60
Autofagia	61
Beclin 1	62
LC3-I	63
LC3-II	63
Flujo autofágico (LC3-II/LC3-I)	63
Análisis multivariante	65
DISCUSIÓN	67
CONCLUSIONES	74
SÍMBOLOS	76
BIBLIOGRAFÍA	80

**RESUMEN Y
ABSTRACT**

RESUMEN

La comprensión de los mecanismos que influyen en la conversión *post-mortem* del músculo en carne podría conducir a la identificación de biomarcadores de bienestar animal y de calidad de la carne. Entre los factores que pueden afectar negativamente a dicho bienestar animal se encuentran procesos que provocan estrés en los individuos. Mezclar animales desconocidos puede ser una de estas causas de estrés ante- y peri-sacrificio. En base a ello, el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de diferentes tratamientos de manejo animal sobre la evolución *post-mortem* de potenciales biomarcadores presentes en el metabolismo muscular, con especial énfasis en el estudio de las variaciones en el estrés oxidativo y la autofagia, ya que nuestro grupo ha demostrado que afectan a la calidad de la carne final. Los tratamientos experimentales, tales como la mezcla de animales desconocidos en la granja y/o durante el transporte y estabulación anteriores al sacrificio, no son procedimientos prohibidos, sin embargo, al no conocerse su implicación en la calidad de la carne, pueden promover el estrés psicológico. Debido a lo anteriormente expuesto hemos decidido estudiar su efecto. En el músculo *Longissimus dorsi* de cerdos machos [(Large White x Landrace) x Duroc], hemos demostrado que la mezcla de animales produce un aumento del estrés oxidativo y, posteriormente, provoca autofagia como estrategia adaptativa de las células musculares para contrarrestar el estrés inducido. Esto afecta al metabolismo del músculo *post-mortem* y podría tener efectos importantes en los procesos de ablandamiento de la carne y de la adquisición de la calidad de la carne. Con base a estos resultados, proponemos que el seguimiento de la presencia y evolución de los principales biomarcadores de la autofagia (Beclin 1, la relación LC3-II/LC3-I) y/o de defensa antioxidante muscular (actividad antioxidante total, actividad de la superóxido dismutasa y de la catalasa) en los primeros tiempos *post-mortem* sea utilizado para la predicción precoz de la calidad de la carne final, ya que permite la detección sufrida por el animal.

ABSTRACT

Understanding the mechanisms that influence the *post-mortem* conversion of muscle into meat could lead to the identification of biomarkers of animal welfare and meat quality. Mixing unfamiliar animals may be an important ante- and peri-slaughter stressor. The objective of this work was to study the effects of different management treatments on the *post-mortem* evolution of biomarkers of muscle metabolism, with a special focus on variations in oxidative stress and autophagy that can affect final meat quality. Experimental treatments, such as mixing unfamiliar animals at farm and/or during transport and lairage prior to slaughter, are not forbidden procedures and can promote psychological stress. In the *Longissimus dorsi* muscle of male pigs [(Large White x Landrace) x Duroc], we demonstrated that mixing animals produces increased oxidative stress and subsequently triggers autophagy as an adaptive strategy of the muscle cells for counteracting induced stress. This affects the *post-mortem* muscle metabolism and could have important effects on the processes of meat tenderization and meat quality acquisition. Based on these results, we propose that monitoring the presence and evolution of the main biomarkers of autophagy (Beclin 1, the LC3-II/LC3-I ratio) and/or muscle antioxidant defense (total antioxidant activity, superoxide dismutase activity, catalase activity) at early *post-mortem* times allows detection of animal stress and also could be used for early prediction of the ultimate meat quality.

LISTAS DE FIGURAS Y TABLAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotografía de un cerdo de la raza Large White _____	24
Figura 2. Fotografía de un cerdo de la raza Landrace _____	25
Figura 3. Fotografía de un cerdo de la raza Large White x Landrace _____	25
Figura 4. Fotografía de un cerdo de la raza Duroc _____	26
Figura 5. Esquema de la estructura del tejido conjuntivo en el músculo esquelético _	27
Figura 6. Esquema de la estructura del tejido muscular _____	28
Figura 7. Esquema de las principales proteínas implicadas en la estructura miofibrilar _____	32
Figura 8. Esquema de la transferencia de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial _____	40
Figura 9. Esquema del sistema enzimático de defensa antioxidante _____	42
Figura 10. Esquema del proceso de lipoperoxidación (LPO) _____	44
Figura 11. Esquema de las diferentes modificaciones de polipéptidos _____	47
Figura 12. Esquema de los diferentes tipos de autofagia _____	49
Figura 13. Análisis inmunoblot de la expresión de Beclin 1 y efecto de los tratamientos de mezcla sobre Beclin 1 _____	62
Figura 14. Análisis inmunoblot de la expresión de LC3-I y LC3-II y efecto de los tratamientos de mezcla sobre LC3-I, LC3-II y flujo autofágico (LC3-II/LC3-I)_____	65
Figura 15. Análisis biplot de componentes principales de variables y tratamientos __	66

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Efecto de los grupos de mezcla y el tiempo post-mortem sobre el pH y los biomarcadores de estrés oxidativo medidos en el músculo LD _____ 61

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La carne de cerdo es la carne más consumida en el mundo, lo que representó en 2011 más del 37% de la producción total de carne (más de 110 millones de toneladas) (FAOSTAT, 2013). Por lo tanto, este mercado se está moviendo hacia la producción de animales que sean eficientes productores de carne, mostrando un rápido crecimiento y tratando siempre de optimizar la obtención de un alto contenido de carne magra a un coste mínimo de producción. Para ello, se está llevando a cabo una manipulación de la composición genética de los animales y una cuidadosa selección de las razas. Pero ello ha dado lugar a la producción de animales que son mucho más susceptibles al estrés, lo que ha llevado a un aumento en la incidencia de defectos de la calidad de la carne, como carne de cerdo pálida, blanda y exudativa; en inglés, pale, soft and exudative (PSE) (Adzitey y Nurul, 2011).

Los cerdos son animales mamíferos con una muy baja densidad de glándulas sudoríparas, por lo que, su capacidad para disipar el calor por sudoración es insignificante. Por lo tanto, la hipertermia se convierte en una situación muy peligrosa para estos animales, que causa anomalías en las funciones celulares, la síntesis de proteínas, el metabolismo y la proliferación celular (Sonna *et al.*, 2002), que se ve, además acompañado por el aumento de los niveles de calcio, estrechamente relacionado con la fisiología del músculo. Por lo tanto, en el caso de estrés agudo, estos animales pueden sufrir enormes dificultades en la regulación de la contracción muscular y entrar en un estado de rigidez general (Webb, 1996, Manteca, 1998), lo que podría provocar la muerte por paro cardíaco inducido por hipertermia, hipercatecolemia y contracción celular permanente (Reiner, 1993, O'Brien, 1995, Calvo, 1997).

Un menor grado de estrés puede no inducir la muerte de los animales, pero ejercer un efecto dramático en las características organolépticas de la carne. Esta situación, tanto si conlleva la muerte del animal o afectación severa se conoce como Síndrome de Estrés Porcino. Las carnes PSE se observan principalmente en cerdos que han sido seleccionados para un crecimiento rápido y eficiente, que conlleve un alto porcentaje de carne magra y una conformación adecuada. Las carnes PSE se caracterizan por poseer una glicólisis rápida, lo que conduce a una alta concentración de ácido láctico en el músculo antes y poco después del sacrificio. Esta situación provoca una disminución rápida del pH después del sacrificio, que en conjunción con una alta

temperatura, da como resultado la desnaturalización de las proteínas musculares y fugas de membrana, induciendo un aspecto pálido y alta pérdida de agua por goteo. Sin embargo, el vínculo celular y fisiológico entre el estrés y las pérdidas organolépticas se desconoce hasta el momento.

Se ha demostrado que las condiciones de manejo previo al sacrificio, como el transporte, la estabulación y la mezcla de animales desconocidos, afectan al estrés de los animales y, por tanto, a la vista de lo expuesto hasta el momento, a la calidad de la carne de cerdo (Stoier *et al.*, 2001, Hambrecht *et al.*, 2005). Mezclar animales desconocidos es una práctica común en la producción de cerdos, pero puede conducir a una tensión social dentro del grupo y, por lo general, a una lucha continua para crear una nueva jerarquía (Fàbrega, 2013). Por lo tanto, la mezcla de animales puede ser un importante factor de estrés ante- y peri-sacrificio que puede afectar al bienestar de los cerdos y con afectación final en la calidad cárnica (Gispert *et al.*, 2000).

En términos generales, se conoce que en el desarrollo de estrés psicológico, el estrés oxidativo juega un papel importante en relación con disfunciones significativas inducidas en muchos tejidos (Li *et al.*, 2012). Por lo tanto, bajo estrés psicológico, los animales sufren un aumento en la producción de radicales libres, lo que provoca un desequilibrio entre las especies reactivas de oxígeno (EROs) y la capacidad del sistema para desintoxicar fácilmente intermediarios reactivos y/o reparar el daño resultante (Lardone *et al.*, 2006).

Estudios previos de nuestro grupo han demostrado que el estrés oxidativo está relacionado directamente con la tenderización de la carne en las etapas tempranas *post-mortem* (Coto-Montes *et al.*, 2004, Caballero *et al.*, 2006), y muchos trabajos se han centrado en los procesos de oxidación como causa principal del deterioro de la calidad de los alimentos musculares (Trefan *et al.*, 2011). Sin embargo, el vínculo entre el estrés psicológico y el estrés oxidativo celular en el músculo *post-mortem* aún debe ser aclarado.

En un proceso normal en el momento del sacrificio, el proceso de desangrado priva a las células y tejidos de nutrientes y oxígeno, lo que lleva a la acumulación masiva de EROs, deteniéndose la producción de adenosín trifosfato (ATP) y causando así la acidificación citoplasmática y la desregulación del calcio (Caballero *et al.*, 2007).

Estos estímulos provocan diferentes respuestas celulares, incluyendo cambios en la autofagia. La aparición de la autofagia en el músculo *post-mortem* dependerá de la situación de ayuno y del estrés del animal antes de su muerte, así como de la naturaleza de la señal de muerte celular y del tipo de tejido estudiado. Estudios previos de nuestro grupo han demostrado que el estrés oxidativo global, combinado con los anteriores factores descritos, dispara la autofagia en el tejido muscular de los toros de un año en las primeras etapas *post-mortem* (García-Macia *et al.*, 2014). Este estudio ha mostrado también que la autofagia en la carne muestra una evolución temporal durante la maduración de la carne, y podría desempeñar un papel esencial en el proceso de maduración de la carne (García-Macia *et al.*, 2014).

La autofagia se considera una forma especializada de proteólisis lisosomal, donde una porción del citoplasma u orgánulos enteros son secuestrados en vesículas de doble membrana conocidas como autofagosomas, que luego se fusionan con los lisosomas, lo que resulta en la degradación de su contenido por catepsinas lisosomales (Caballero y Coto-Montes, 2012). Inicialmente, la autofagia se consideraba sinónimo de muerte celular programada de tipo II, un mecanismo equivalente a la apoptosis. Sin embargo, ahora ha sido bien establecido que la autofagia es, inicialmente, un mecanismo protector importante para las células sometidas a estrés, tal como la inanición, mediante la provisión de nutrientes y la eliminación de agregados de proteínas y mitocondrias dañadas (Coto-Montes *et al.*, 2012).

A la luz de estos resultados, el objetivo de este estudio fue determinar el efecto del estrés en los animales causado por la mezcla de animales desconocidos en diferentes momentos en el proceso de cría (en la granja y/o durante el transporte y la estabulación antes del sacrificio), buscando la presencia y la evolución de los principales biomarcadores de autofagia y estrés oxidativo en la carne de cerdo durante las primeras etapas *post-mortem* de la maduración. Además, se evaluó su relación con un rasgo clave de la calidad de la carne, el pH.

Este estudio es parte de una investigación más amplia sobre el efecto de las estrategias de mezcla de los animales sobre el bienestar animal y su rendimiento (Fàbrega, 2013).

**CONSIDERACIONES
TEÓRICAS Y
EXPERIMENTALES**

CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y EXPERIMENTALES

El cerdo como animal

El cerdo es un animal mamífero, artiodáctilo, de la familia *Suidae*, cuyo nombre científico es *Sus scrofa domestica*. Es un animal doméstico usado en la alimentación en muchas civilizaciones. Su domesticación se inició en Oriente Próximo hace unos 13.000 años, aunque se produjo un proceso paralelo e independiente de domesticación en China. En la actualidad, el cerdo doméstico se encuentra distribuido por casi todo el mundo.

El cerdo doméstico adulto tiene un cuerpo pesado y redondeado, hocico comparativamente largo y flexible, patas cortas con cuatro dedos con pezuñas y una cola corta. La piel, gruesa pero sensible, está cubierta, en parte, de ásperas cerdas y exhibe una amplia variedad de colores y dibujos. A pesar de su apariencia son animales ágiles, rápidos e inteligentes.

Estos animales están adaptados para la producción de carne, dado que crecen y maduran con rapidez, tienen un período de gestación corto, de unos 114 días, y pueden tener camadas muy numerosas. En libertad, los cerdos pueden llegar a vivir de 10 a 15 años. Son herbívoros en estado salvaje porque tienen una mandíbula preparada para vegetales. En domesticación, son omnívoros y se les da también carne, siempre picada, pero consumen una gran variedad de vegetales y restos orgánicos que contengan proteínas.

Los cerdos desarrollan complejas estructuras sociales, y a las tres semanas de edad comienzan a interactuar, jugando, con otros miembros de su comunidad. Es, durante esta época, cuando los cerdos desarrollan lazos sociales más fuertes con ciertos miembros de su comunidad, lazos que prevalecerán a lo largo de su existencia.

Raza de cerdo Large White

El Large White, o también llamado gran cerdo blanco inglés, es una raza de cerdo originaria del nordeste de Inglaterra, del condado de Yorkshire. Es un cerdo uniformemente blanco, de orejas tiesas y patas largas (Figura 1). Es muy rústico y está

muy bien adaptado a la crianza al aire libre, aunque también se adaptó bien a la vida en cautividad.

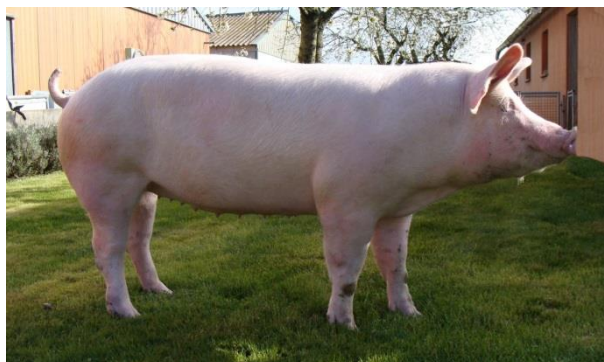


Figura 1. Fotografía de un cerdo de la raza Large White.

El Large White tiene grandes cualidades como reproductor, que combina con un crecimiento muy rápido y unas canales de calidad satisfactoria. Debido a esta versatilidad, se utiliza en cruces para obtener hembras de cualidades óptimas y para la obtención de verracos con muy buena conformación para la obtención de carne. Los criadores enfocaron sus trabajos de selección en ambas direcciones dando lugar a la creación de dos variedades. Todas estas cualidades hacen de esta raza de cerdos la más extendida en el mundo.

Raza de cerdo Landrace

La raza Landrace es originaria de Dinamarca y tiene una excelente adaptación al medio, siendo el pilar para los programas de hibridación, obteniéndose hembras de muy buena producción y excelente comportamiento, frente a las exigencias de las nuevas técnicas de manejo en las explotaciones porcinas.

Es una raza muy versátil, ya que se utiliza como línea pura, materna o paterna. Sus índices productivos son muy parecidos a los de Large White, aunque tiene un mayor rendimiento de la canal y también una mayor longitud de la misma, presenta unos valores algo inferiores en los parámetros reproductivos, y una mayor tendencia a presentar PSE. Esta raza está reconocida como de tipo magro, ya que presenta unos bajos valores de engrasamiento.

Es una raza muy deseada también por su ganancia diaria en peso, conversión alimenticia y poca grasa. El Landrace es una raza blanca de buena musculatura, remarcado por la alta calidad de su canal, alto porcentaje de jamón y particularmente por la producción de tocino (Figura 2). Por otro lado, tienen una respuesta óptima bajo condiciones adversas, tanto de producción como climáticas.

Es, probablemente, junto con Large White la raza más utilizada.



Figura 2. Fotografía de un cerdo de la raza Landrace.

Raza de cerdo Large White x Landrace

El cruce de las líneas puras Large White y Landrace da como resultado madres F1 que son la combinación perfecta entre eficacia de producción, capacidad maternal, uniformidad y vitalidad de las camadas. Posee una rusticidad que las hace capaces de desenvolverse en cualquier condición con camadas de, aproximadamente, 14 nacidos vivos y una media de 11,5 lechones destetados por camada con un promedio de 7 kilos por individuo, convirtiéndola en la mejor opción para producir lechones de engorde (Figura 3).



Figura 3. Fotografía de un cerdo de la raza Large White x Landrace.

Raza de cerdo Duroc

La raza Duroc es una raza de ganado porcino procedente de Estados Unidos, donde es una de las más populares. Su coloración es roja, con variaciones de tonalidad. El peso medio de los machos es de 350 kg y el de las hembras de 300 kg (Figura 4).



Figura 4. Fotografía de un cerdo de la raza Duroc.

Su origen se encuentra en los cerdos rojos que eran criados en el este de EE. UU. a principios del siglo XIX, los cuales procedían en gran medida de cerdos de capa colorada y tipo ibérico de España y Portugal. Se originó del cruzamiento de la raza Jersey Red de Nueva Jersey y de la antigua Duroc de Nueva York. La raza resultante fue conocida como Duroc-Jersey, pero posteriormente fue denominada simplemente como Duroc.

El músculo

El músculo es un tejido con diversas funciones mecánicas, encargado del movimiento del cuerpo, de mantener el equilibrio y la coordinación, pero, además, el metabolismo de las células musculares está implicado en el mantenimiento del calor corporal y la movilización de la sangre y la linfa. Existen pocas células que tengan que generar tanta fuerza y estar sometidas a cambios tan drásticos en su metabolismo como las células musculares. Por ello, la organización, estructura y metabolismo del músculo es clave para mantener su función e integridad.

Existen tres tipos de tejido muscular: el tejido muscular estriado esquelético, que es el que puede acortar su longitud por acción de los sarcómeros estables que presenta

como efecto de la estimulación por parte de impulsos nerviosos provenientes del sistema nervioso; el tejido muscular estriado cardiaco, exclusivo del corazón, que le permite a este contraerse y así bombear la sangre que llega a su interior; y el tejido muscular liso que desarrolla sarcómeros sólo de forma transitoria y está presente en el estómago y a lo largo de todo el tubo digestivo, en los bronquios, en vasos sanguíneos, en la vejiga y en el útero, entre otros.

El músculo esquelético está compuesto por conjuntos de fascículos, estando a su vez cada fascículo formado por un conjunto de fibras musculares, o también llamadas células musculares, que son mantenidas juntas por tejido conjuntivo propio. El tejido conjuntivo rodea tanto a las fibras individuales, denominándose así endomisio, como a los fascículos, componiendo el perimisio, y a los conjuntos de fascículos que forman el músculo, formando finalmente el epimisio, y es indispensable para la transducción de fuerzas (Figura 5).

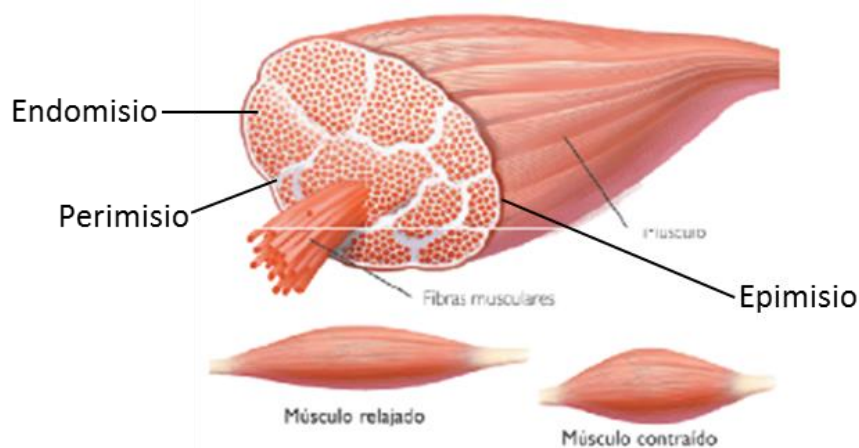


Figura 5. Esquema de la estructura del tejido conjuntivo en el músculo esquelético.

La fibra muscular esquelética es un sincitio multinucleado rodeado de membrana plasmática, también llamada sarcolema, a la que se adhiere el tejido conjuntivo del exterior. Las fibras musculares están ocupadas en casi su totalidad por agrupaciones de unidades longitudinales, llamados sarcómeros, 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, denominados filamentos gruesos, y

de actina y sus proteínas asociadas, denominados filamentos finos, que son los verdaderos elementos contráctiles del músculo estriado (Figura 6).

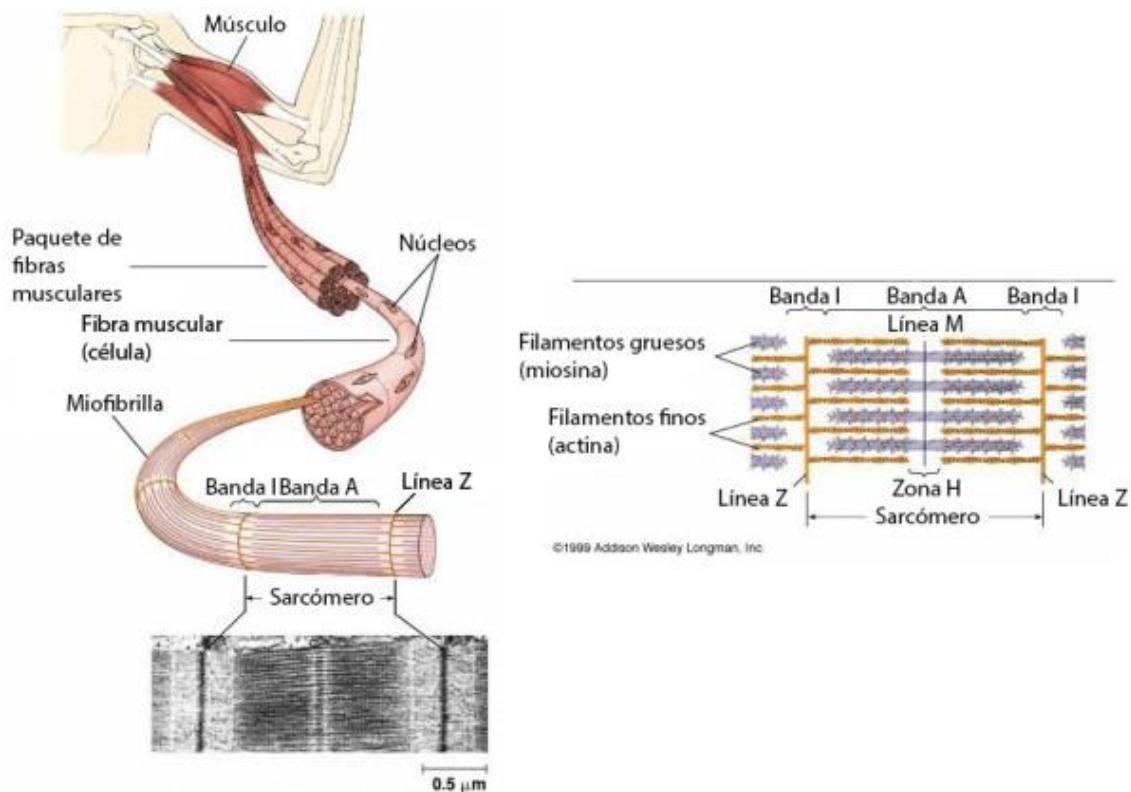


Figura 6. Esquema de la estructura del tejido muscular.

El sarcómero, contiene 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, denominadas bandas A, y zonas menos densas, denominadas bandas I. Tanto las bandas A como las I están divididas en dos mitades por regiones estrechas de densidad contrastante, 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, hacia la mitad de la zona H, hay una fina línea densa llamada línea M. La estructura comprendida entre dos líneas Z es el sarcómero. Las bandas I están compuestas principalmente de filamentos finos, mientras que las A están compuestas por filamentos gruesos y 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 y Pawlina, 2007).

Conversión 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 sensorial.

Este proceso consta de tres fases (Sentandreu *et al.*, 2002):

- La fase *pre-rigor*, durante la cual el músculo permanece excitable y se correspondería con la fase de supervivencia del sistema nervioso (Chrystall y Devine, 1985).
- La fase *rigor*, en la que los componentes energéticos (ATP, fosfocreatina, glucosa) se agotan.
- La fase *post-rigor*, de maduración o tenderización de la carne en la que se produce una desestructuración de la arquitectura muscular.

Tras el sacrificio del animal, como consecuencia del desangrado, se produce un descenso brusco 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 un cambio del metabolismo aerobio al anaerobio que varía en el tiempo dependiendo de las reservas mitocondriales en cada caso. A medida que se van reduciendo los niveles de ATP, se acumula 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, produciéndose entonces un incremento en la fuerza iónica, en parte debido a la incapacidad de funcionamiento de las bombas de Ca^{2+} /ATPdependiente y Na^{+} - K^{+} /ATPdependiente, 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 modifica su configuración, desbloqueando los sitios activos de la actina a los que se unía. Al quedar estos sitios 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 *et al.*, 1996). De esta forma, los filamentos finos son trasladados sobre los gruesos, produciéndose un acortamiento muscular, llamado 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 terneza de la carne como consecuencia fundamentalmente de la rotura de la estructura miofibrilar por parte de sistemas proteolíticos endógenos que juegan un papel determinante (Ouali, 1992, Sentandreu *et al.*, 2002, Weaver *et al.*, 2009, Huff Lonergan *et al.*, 2010). 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 cáncer, Alzheimer, enfermedades neuromusculares, etc. (Majno y Joris, 1995, Hengartner, 2000, 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 que en los cambios en la estructura celular y proteica que se observan en el músculo tras la muerte del animal y que no han sido todavía explicados, podrían participar 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 tratan de estrategias que inducen la 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 muerte celular: la muerte celular programada, que incluye la apoptosis y la autofagia, y la muerte celular no programada, que incluye la 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 muerte celular programada 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, por ejemplo, en apoptosis desde que ocurren los primeros cambios mitocondriales hasta la activación de las caspasas, que son el principal sistema proteolítico efector de apoptosis, sólo transcurren aproximadamente 10 minutos, aunque el proceso completo hasta la total destrucción celular puede durar horas o incluso días. Una vez que ésta ha comenzado, la muerte celular es inevitable (Green, 2005).

Principales cambios *post-mortem* en la arquitectura del músculo

Los principales cambios que se producen en la arquitectura del músculo son el acortamiento sarcomérico y, posteriormente, durante la maduración de la carne, cambios proteolíticos en la arquitectura de las miofibrillas y sus proteínas asociadas.

Estudios proteómicos recientes estiman que la estructura sarcomérica está compuesta por, al menos, 65 proteínas, sin contar las distintas isoformas que se coordinan estrechamente entre sí (Fraterman *et al.*, 2007). Hay muchas proteínas clave localizadas en distintas regiones de la célula muscular relacionadas con la contracción (Figura 7), como por ejemplo aquellos que se localizan sobre o cerca de la línea Z o de la banda I, que están implicadas de algún modo en el mantenimiento de la estructura y función de la célula muscular y que son degradadas durante el proceso de tenderización *post-mortem*.

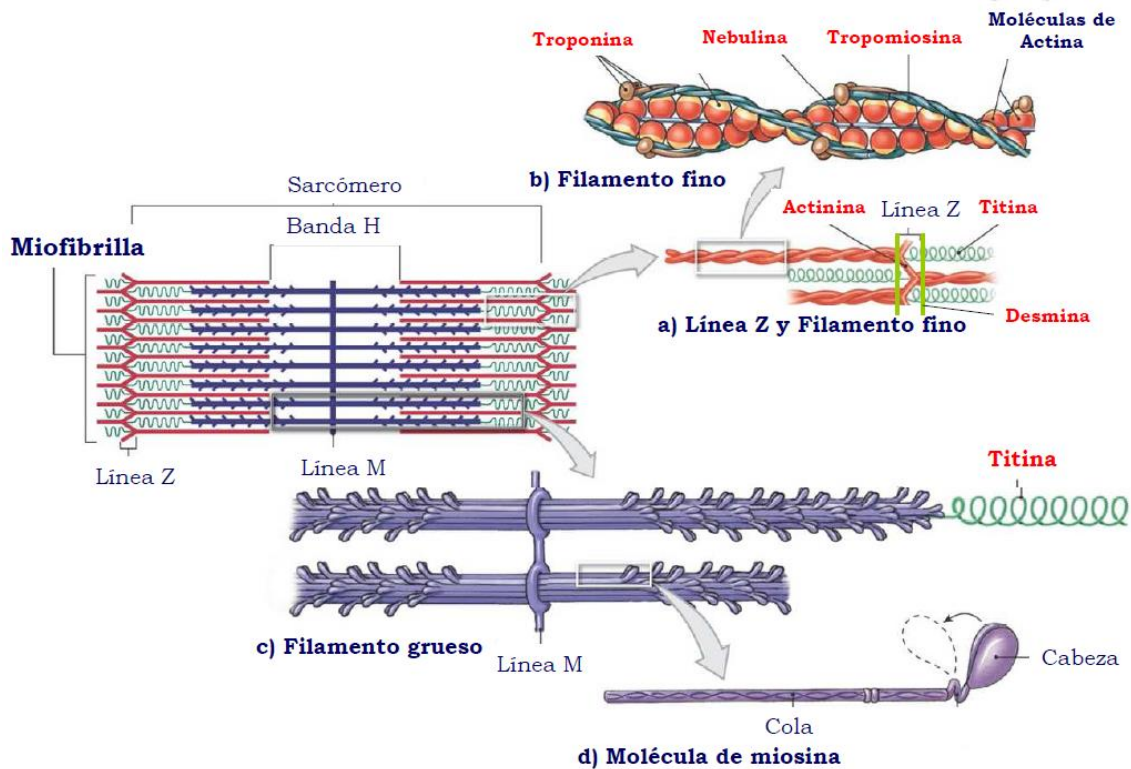


Figura 7. Esquema de las principales proteínas implicadas en la estructura miofibrilar.

Sin embargo, ninguna proteína asociada puede compararse con el papel que ocupan la actina y la miosina en la contracción muscular. La miosina y la actina son las proteínas más abundantes de las miofibras del músculo esquelético y contribuyen esencialmente a mantener la estructura y fuerza tensil del músculo inicialmente. Se pensaba que ninguna de ellas sufría degradación *post-mortem*, sin embargo, gracias a las nuevas tecnologías en proteómica, Lametsch *et al.* consiguieron aislar en carne de cerdo hasta 11 fragmentos distintos de actina, que variaban en pesos de 4 a 26 kDa y pH de 4,52 a 5,5, mostrando, claramente, que la actina es objeto de degradación *post-mortem* (Lametsch *et al.*, 2002). Posteriormente, también se demostró degradación *post-mortem* de la miosina, la cual, puede ser llevada a cabo por β -calpaína (Lametsch *et al.*, 2004). Estos descubrimientos tendrán, más tarde, mucha importancia, ya que cualquier modificación, por pequeña que sea, a nivel de los complejos de actomiosina puede afectar a la accesibilidad de las proteasas a sus sustratos (Weaver *et al.*, 2007) e influir notablemente en la solubilidad de estas proteínas y en la oposición al corte de las fibras lo que representará una importante contribución a la calidad de la carne.

La troponina es una proteína globular presente a nivel de los filamentos finos del músculo, y compuesta por tres subunidades globulares: la troponina T, que proporciona un punto de unión entre la tropomiosina y la troponina; la troponina C, que es la responsable de la fijación del calcio necesario en el proceso de la contracción muscular; y la troponina I que tiene una función inhibitoria de la ATPasa de los complejos de actomiosina. Existen suficientes evidencias de que la degradación de la troponina T con la maduración, parece ser llevada a cabo también por la β -calpaína, y la subsiguiente aparición de fragmentos de aproximadamente 30 kDa está altamente correlacionada con la terneza de la carne (Olson y Parrish, 1977, Rowe *et al.*, 2004a). Esta degradación puede conducir a una desestabilización de la estructura sarcomérica a nivel de los filamentos finos.

En relación a su posible degradación durante la tenderización, diversas proteínas accesorias que mantienen la alineación entre los filamentos finos y gruesos han sido estudiadas. Entre ellas destacan la titina, que es la tercera proteína en abundancia en el músculo; una megaproteína de 3 MDa, cuya función es mantener el alineamiento sarcomérico de la miofibrilla durante la contracción. La nebulina, también una megaproteína de 600-900 kDa, que se asocia con los filamentos finos de actina, constituyendo una asociación que puede anclar los filamentos finos a la línea Z del sarcómero. La degradación de ambas produciría debilitamiento de la estructura sarcomérica y, por tanto, de la estructura muscular. Degradación de titina en carne se ha observado en numerosos estudios (Zeece *et al.*, 1986, Melody *et al.*, 2004, Rowe *et al.*, 2004a) produciéndose un fragmento denominado T2, de aproximadamente 2400 kDa, y otro de aproximadamente 1200 kDa. Este último aparece más tempranamente en carne con menor dureza instrumental y mejores valores de terneza sensorial (Huff-Lonergan *et al.*, 1995, Huff-Lonergan *et al.*, 1996). Igualmente, la degradación de nebulina se correlaciona con la tenderización *post-mortem* de la carne en diversos trabajos (Huff-Lonergan *et al.*, 1995, Melody *et al.*, 2004). La desmina, por su parte, es una proteína que forma parte de los filamentos intermedios localizada en la periferia de la línea Z. Los filamentos intermedios conectan miofibrillas adyacentes al nivel de la línea Z y también miofibrillas, a otras estructuras celulares como la membrana plasmática, por lo que son muy importantes en el mantenimiento de la integridad estructural de las células musculares (Robson, 1989, Robson *et al.*, 1995). Se ha descrito que la desmina es

degradada más rápidamente en la carne de menor dureza y mayor capacidad de retención de agua (Huff-Lonergan y Lonergan, 1999, Zhang *et al.*, 2006).

El interés económico que despiertan estos procesos hace que numerosos investigadores centren sus estudios en ellos y, en particular, en la búsqueda de marcadores biológicos que consigan detectar la calidad del producto de forma precoz, así como su estado de maduración. Durante los últimos años, se han hecho grandes avances en el estudio proteolítico, es decir, en el análisis del contenido proteico celular o proteomal del músculo, y su evolución a lo largo de la maduración, con el fin de analizar su relación con la evolución de la calidad de la carne, así como identificar fragmentos proteicos que puedan funcionar como marcadores de calidad (Lametsch *et al.*, 2004, Bernard *et al.*, 2007, Hollung *et al.*, 2009). Siguiendo estos objetivos, Bouley *et al.* consiguieron identificar en el músculo de terneros añejos de raza Charolais un amplio número de proteínas; con función metabólica (25,5%), estructural (17%), de defensa celular (16%) y del aparato contráctil (14,5%), además de identificar distintas isoformas de la troponina T y diferenciar diversas proteínas fosforiladas, lo que permitieron aplicar este método en el estudio de la fisiología del músculo de animales con distinto manejo o genética (Bouley *et al.*, 2004). En este sentido, un año más tarde, los mismos autores (Bouley *et al.*, 2005) analizaron el proteoma de animales con el gen de la hipertrofia muscular, encontrando diferencias como consecuencia de la mutación en varias proteínas del aparato contráctil, entre ellas troponina T, y también en proteínas metabólicas como la fosfoglucomutasa (PGM) y la proteína de unión de ácidos grasos cardíaca (H-FABP).

La identificación de marcadores en la carne durante las primeras horas *post-mortem* no solo es de gran interés científico, sino que, además, podría tener una aplicación directa en el sector, ya que podría transferirse a las empresas para ser utilizado como herramienta para discriminar, desde los primeros pasos de la cadena, la calidad de distintos canales y tomar decisiones sobre su destino o, incluso, sobre el método de conservación más adecuado para obtener la mejor calidad organoléptica. No obstante, hay que ser conscientes de que su detección conlleva la utilización de técnicas analíticas de alto coste y que requieren un tiempo de espera relativamente alto, por lo que es preciso orientar las investigaciones hacia el desarrollo de métodos de predicción rápidos y no destructivos que permitan controlar los parámetros de calidad citados. Con la vista puesta en este interés hemos desarrollado el presente estudio.

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.

Parámetros indicativos de calidad de la carne

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 capacidad de retención de agua, 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 en este trabajo son:

- **El pH.** Se define como el logaritmo negativo de la concentración de protones de una disolución. 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 físicoquímicas de la carne. La acumulación de metabolitos intermedios tras la muerte del animal, 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 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.*, 1997) y, en ocasiones, a la inactivación de enzimas, lo que puede afectar negativamente a la tenderización de la carne (Rowe *et al.*, 2004a, Rowe *et al.*, 2004b). 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), ya descritos. El método más utilizado en alimentos, y en particular en la

carne, para medir el estado oxidativo, es el índice de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico; en inglés, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), que mide la cantidad de malonaldehído que se produce como resultado de la oxidación de las grasas y algunas proteínas que generalmente está altamente correlacionado con la calidad sensorial.

Factores que afectan a la calidad final 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, 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...). Dichos factores pueden dividirse en función del espacio temporal en el que actúan:

- **Factores *ante-mortem*: la raza.** La raza es un factor muy importante que afecta a muchas características productivas de los animales y también a la calidad final de la carne.
- **Factores *peri-mortem*: el transporte, el manejo y el estrés al sacrificio.** Todos los animales destinados a la producción de carne van a sufrir ciertos niveles de estrés al sacrificio, y ésto 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 (Hemsworth y Barnett, 2001). Esto estará modulado por distintos factores intrínsecos del animal (genética, sexo, edad, estado fisiológico) además de por experiencias anteriores y aprendizaje adquirido (Boissy, 1995, Hemsworth y Barnett, 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 *et al.*, 2000, Warner *et al.*, 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 (Ferguson y Warner, 2008, 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 (Nockels *et al.*, 1996, Immonen y Puolanne, 2000), el tiempo que dure el transporte, el manejo aplicado durante el transporte de los animales desde la granja al matadero (Schaefer *et al.*, 1997, Arthington *et al.*, 2003), 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 (Hambrecht *et al.*, 2005, Mounier *et al.*, 2006) y la privación de agua y alimento (Ferguson y Warner, 2008). La concentración de glucógeno también varía notablemente en el momento del sacrificio, dependiendo de la tasa de alimentación (Schaefer *et al.*, 1997, Gardner y Thompson, 2003, Bee *et al.*, 2006), del peso vivo (Smith y Dobson, 1990), del estado nutricional (Geay *et al.*, 2001), del tipo de músculo y fibras musculares (Hambrecht *et al.*, 2005), de la capacidad tamponadora del músculo (Silva *et al.*, 1999, Immonen y Puolanne, 2000), del sexo (Shackelford *et al.*, 1994, Hoffman *et al.*, 1998), de la raza (Gardner y Thompson, 2003) y del temperamento propio de los animales (Gardner y 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 *et al.*, 2005), en terneza, color, capacidad de retención de agua y también sobre la maduración de la carne (Gregory, 2003) y pueden determinar la aparición de carnes oscuras, duras y secas; en inglés, Dark, Firm, Dry (DFD), con un pH elevado y unas características como color, capacidad de retención de agua o textura que no son las deseables (Beriaín y Lizaso, 1998, Viljoen *et al.*, 2002, Wulf *et al.*, 2002).

- **Factores *post-mortem*: el tiempo de maduración.** El tiempo de maduración de la carne es fundamental para la adquisición de un grado de terneza adecuado debido al ablandamiento de la carne, que se atribuye a una

degradación progresiva y selectiva de la estructura de las miofibrillas a causa de la acción de enzimas proteolíticos endógenos. Además, a lo largo de la maduración ocurren fenómenos oxidativos que afectan a lípidos y proteínas y provocan cambios en el color de la carne y contribuyen de forma positiva en el desarrollo adecuado de su *flavor* característico. Por un lado, los procesos *post-mortem* acontecidos hasta la instauración de la rigidez cadavérica conducen a la degradación de ATP a inosín monofosfato (IMP), que al degradarse da lugar a ribosa, fosfato e hipoxantina y a esta última molécula se le atribuye un efecto favorable sobre las características sensoriales de la carne (Prändl *et al.*, 1994). Por otro lado, también se producen durante la maduración compuestos que contribuyen al aroma de la carne por degradación de proteínas y grasas (Touraille y Girard, 1985). Marino comprobó que una extensión del tiempo de maduración de 15 a 21 días *post-mortem* incrementaba el *flavor* de la carne (Marino *et al.*, 2006), coincidiendo con resultados de Campo *et al.* y Napolitano *et al.* que encontraron que la intensidad del *flavor* se incrementaba con el tiempo de maduración (Campo *et al.*, 1999, Napolitano *et al.*, 2001), probablemente debido a fenómenos de proteólisis y lipólisis que dan lugar a la formación de precursores del sabor. Además, muchos péptidos que son producidos durante la maduración podrían reaccionar con otras moléculas dando lugar a nuevos componentes del *flavor*, razón por la que Campo *et al.* apuntaban la necesidad de un tiempo de maduración adecuado para el desarrollo de componentes del *flavor* y la adquisición de ciertas propiedades sensoriales de la carne tras el sacrificio (Campo *et al.*, 1999).

Estrés oxidativo

Los radicales libres son moléculas altamente inestables que poseen uno o más electrones desapareados en su orbital más externo, lo cual les lleva a interactuar ávidamente con otras moléculas. La producción de radicales libres es un proceso continuo e inevitable, puesto que la cadena respiratoria mitocondrial no es eficaz al 100% y cerca del 2% del oxígeno utilizado en la respiración aerobia por cualquier organismo, eventualmente, finaliza dando lugar a radicales libres. Muchos de estos

subproductos del metabolismo normal son altamente tóxicos y aún teniendo una vida media de milisegundos y pueden causar un daño importante en las macromoléculas.

Existen sustancias capaces de contrarrestar los efectos de los radicales libres que se denominan antioxidantes. Cuando el equilibrio entre los radicales libres y las sustancias antioxidantes, lo que se denomina *balance oxidativo*, se pierde en favor de los primeros se desencadena una cascada de procesos dañinos, una auténtica reacción en cadena de efectos nocivos. Esta situación se conoce como *estrés oxidativo*. La destrucción de las moléculas celulares debido a un exceso de radicales libres que no han sido neutralizados por la defensa antioxidante del organismo se conoce como *daño oxidativo* (Pierrefiche y Laborit, 1995).

Entre las principales EROs se encuentran los radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido (ROO^{\cdot}) e hidroxilo ($\cdot OH$) (Figura 8).

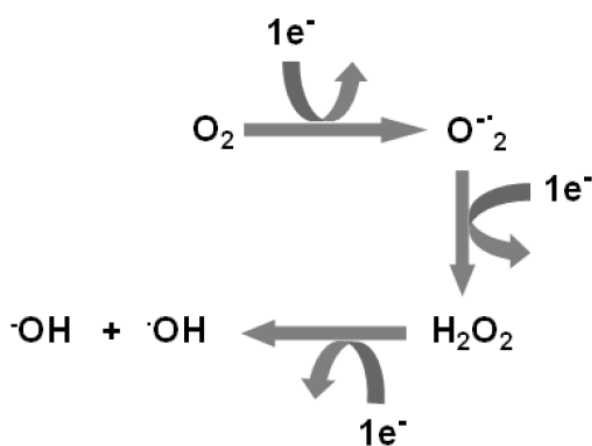


Figura 8. Esquema de la transferencia de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial.

El radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) 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 peróxido de hidrógeno (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 radical hidroxilo ($\cdot OH$) a través de la reacción de Fenton. El radical $\cdot OH$ es la especie reactiva de oxígeno más activa y mejor estudiada. 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 desoxirribonucleico (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, sino que también pueden jugar un papel fisiológico clave en la homeostasis. Éste es el caso del óxido nítrico (NO), que participa en la relajación muscular y en el control del tono vascular. Por su parte, el $O_2^{\cdot-}$ controla la producción de eritropoyetina, participa en el control de la ventilación, la relajación del músculo liso y la transducción de señales de varios receptores de membrana que activan funciones inmunes. Además, los radicales libres también son generados y utilizados por células de defensa como los neutrófilos, monocitos, macrófagos y eosinófilos (Turrens, 2003).

Los radicales libres, por tanto, son resultado de procesos fisiológicos propios del organismo, pero también pueden ser generados por otro tipo de factores exógenos, como por ejemplo pesticidas y radiaciones, o endógenos, como determinadas enfermedades y procesos inflamatorios e inmunes (Riediger *et al.*, 2007).

Defensa antioxidante

El hecho de que en las células se formen especies altamente reactivas, que puedan poner en peligro la integridad de la propia célula, genera la necesidad de contar con mecanismos de protección eficaces.

Se define como antioxidante a aquella sustancia que, aun encontrándose habitualmente en pequeñas concentraciones comparada con el sustrato oxidable, inhibe o retarda significativamente la oxidación de dicho sustrato.

Un importante número de enzimas actúan como antioxidantes gracias a su capacidad para absorber la energía de las EROs metabolizando los radicales libres o sus intermediarios reactivos, transformándolos en productos sin efectos nocivos para los tejidos.

Destacan como principales enzimas antioxidantes la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), y el tándem glutatión peroxidasa/ reductasa (GSH-Px/GSH-R) (Figura 9).

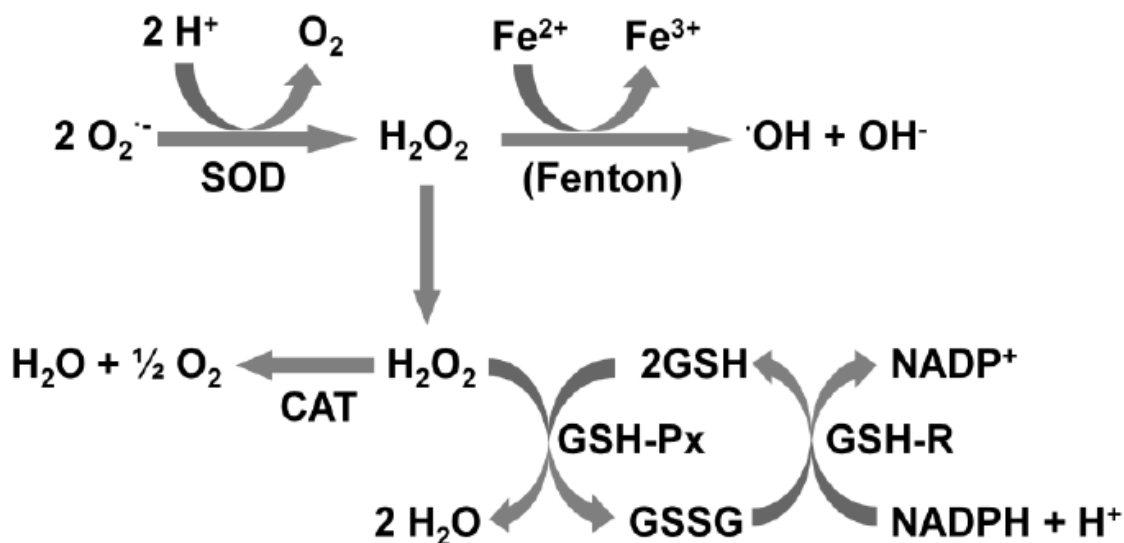


Figura 9. Esquema del sistema enzimático de defensa antioxidante.

La SOD está distribuida universalmente en todas las células con respiración aerobia. Se considera que es uno de los más importantes enzimas antioxidantes, aun cuando para cumplir este papel precisa de un acoplamiento perfecto con los enzimas encargados de neutralizar el H_2O_2 , producto de la reacción de este enzima. Si este balance no se produce, por exceso en la actividad SOD, descenso en la actividad de los enzimas antioxidantes acoplados (GSH-Px y/o CAT) u otros múltiples factores, el enzima SOD destruirá radicales $\text{O}_2^{\cdot-}$ dando lugar a elevados niveles de H_2O_2 que, a su vez, por la reacción de Fenton, producirán radicales $\cdot\text{OH}$, mucho más tóxicos que el primero y, por lo tanto, en base a esta actividad SOD se convertiría en un peligroso oxidante.

En células eucariotas superiores hay tres formas de dicho enzima: SOD citosólica o SOD1, que tiene cobre y zinc en su centro activo; SOD mitocondrial o SOD2, que tiene manganeso en su centro activo; y SOD extracelular o SOD3, que tiene cobre y zinc en su centro activo (Loschen *et al.*, 1974).

Químicamente, la CAT es una hemoproteína de estructura similar a la hemoglobina. Tiene cuatro subunidades proteicas, cada una de ellas con un grupo hemo y una molécula de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida; en inglés, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH). Se encuentra muy

activa en eritrocitos y en el hígado pero ha sido descrita en todos los tejidos, incluido el cerebro (Vega-Naredo *et al.*, 2005).

El H_2O_2 se forma como uno de los productos finales del metabolismo oxidativo aeróbico de los hidratos de carbono. La CAT actúa eliminándolo, pero tiene una baja afinidad por su sustrato, de manera que es mucho más eficiente cuando las concentraciones de H_2O_2 son elevadas, sin conocerse concentración de saturación. Se encuentra localizada principalmente en los peroxisomas (De Duve y Baudhuin, 1966).

La GSH-Px comparte sustrato con la CAT, utilizando el glutatión reducido (GSH) como donador específico de H^+ para reducir el H_2O_2 a agua. Además, también puede reaccionar de manera efectiva con lípidos y otros hidroperóxidos orgánicos. Se encuentra en el citosol y en la mitocondria, siendo la que contiene selenio de ubicación mayoritariamente mitocondrial (Lawrence y Burk, 1976). En tándem con ella trabaja la GSH-R, una flavoenzima dependiente de NADPH que cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH), de modo que permite la recuperación del glutatión a su estado reducido inicial. Tiene alta afinidad por el H_2O_2 y, por ello, comienza a actuar a bajas concentraciones de H_2O_2 , catalizando las reacciones descritas en la figura 9.

Por último, cabe destacar la existencia de depuradores no enzimáticos de radicales libres. Son compuestos capaces de neutralizar los radicales libres debido a su capacidad para donarles un electrón, neutralizando así su toxicidad potencial. Para que una molécula de estas características sea considerada un depurador de radicales libres, al donar un electrón debe formar un radical que no sea tóxico, ya que de otro modo el sistema sería inútil. En esta categoría se engloban varias moléculas de diversa naturaleza química como pueden ser los antioxidantes obtenidos a partir de la dieta como el ácido ascórbico, el α -tocoferol y el β -caroteno. También podemos encontrar en este grupo compuestos como la melatonina y el γ -glutamil-cisteinil-glicina (glutatión, GSH). El glutatión tiene poder reductor debido al grupo -SH libre de la cisteína central. Cuando se oxida, dos moléculas de glutatión se unen para formar el glutatión oxidado (GSSG) a través de un puente disulfuro establecido entre las dos cisteínas. Este péptido participa en una gran cantidad de procesos redox intracelulares como, por ejemplo, en el mantenimiento de la hemoglobina en estado ferroso. Su actividad antioxidante radica en

la donación de un electrón, neutralizando así la toxicidad de los radicales libres y dando lugar a la formación de un radical no tóxico.

Daño oxidativo

Si bien las células han desarrollado mecanismos de defensa para contrarrestar el efecto lesivo de los radicales libres, en casos de intoxicación masiva o continuada, estos sistemas celulares pueden ser superados, condicionando una situación de estrés oxidativo. Como ya hemos comentado, cuando este estrés provoca la destrucción molecular por el bombardeo continuado de EROs a moléculas, se alcanza el daño oxidativo. Esta agresión puede llegar a ocasionar la muerte celular por destrucción masiva de macromoléculas, favoreciendo la aparición de enfermedades, así como la aceleración del envejecimiento (Caballero *et al.*, 2008).

La lipoperoxidación (LPO), u oxidación lipídica, es un proceso degradativo de autooxidación que implica una propagación en cadena de reacciones de radicales libres que afecta mayoritariamente a ácidos grasos poliinsaturados abundantes en las membranas biológicas y en las lipoproteínas, y que culmina en la formación de hidroperóxidos lipídicos y aldehídos lo suficientemente tóxicos como para reaccionar con otro ácido graso poliinsaturado (Figura 10). Cada vez hay más evidencias que apuntan a que los aldehídos generados endógenamente durante el proceso de LPO están implicados en la mayoría de los efectos patológicos y fisiológicos asociados con el estrés oxidativo en células y tejidos (Esterbauer y Cheeseman, 1990).

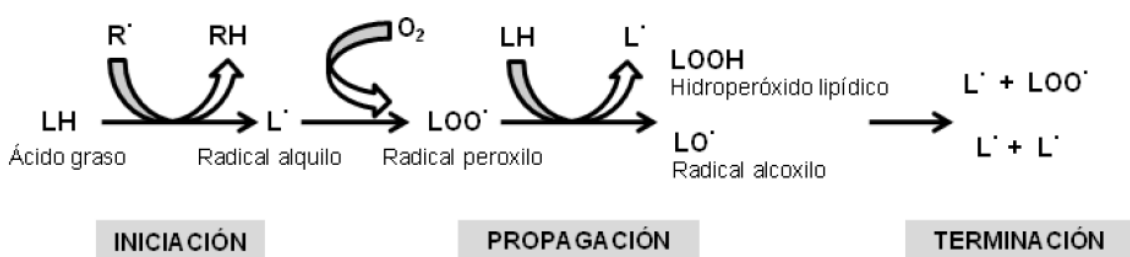


Figura 10. Esquema del proceso de lipoperoxidación (LPO).

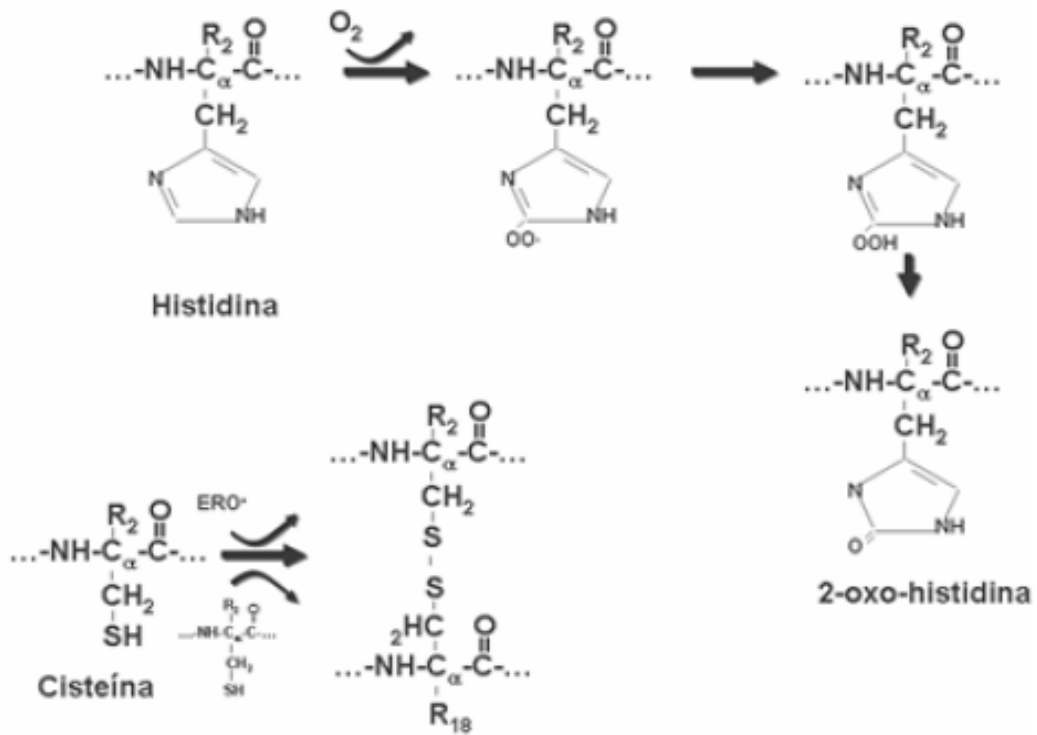
Entre los aldehídos derivados de la LPO destacan el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) que puede ser producido por el ácido araquidónico,

ácido linoleico o sus hidroperóxidos. El 4-HNE presenta un amplio rango de actividades biológicas, incluyendo la inhibición de la síntesis de proteínas y de ADN, inactivación de enzimas, estimulación de la fosfolipasa C, expresión de varios genes, etc. Incluso puede reaccionar con proteínas y ADN para generar diversos tipos de aductos (Esterbauer y Cheeseman, 1990).

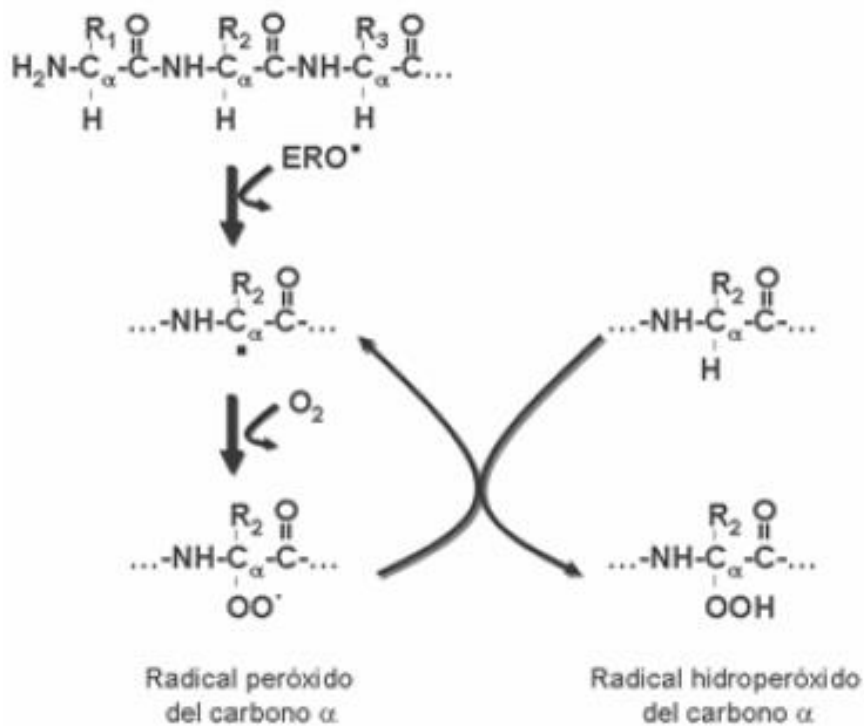
Cabe destacar la implicación de la LPO en la patogénesis de numerosas enfermedades, incluyendo aterosclerosis, diabetes, cáncer y artritis reumatoide, así como en la toxicidad asociada a drogas y en procesos de envejecimiento (Uchida, 2000).

Los radicales libres producidos durante una situación de estrés oxidativo también pueden dañar el esqueleto peptídico de las proteínas, generando proteínas carboniladas. Este proceso se inicia por la sustracción del hidrógeno de un 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 11). Los enzimas que contienen metales de transición son los más afectados por el alto riesgo de generar radicales hidroxilo en la vecindad de la proteína (Stadtman *et al.*, 1992). Las proteínas carboniladas se acumulan en una gran variedad de organismos durante el envejecimiento y en enfermedades relacionadas con el mismo (Levine y Stadtman, 2001). También se han encontrado proteínas modificadas por productos derivados de la LPO en enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Uchida, 2000, Sayre *et al.*, 2001).

a) Oxidación en la cadena lateral



b) Oxidación en el carbono α



c) Modificación por productos derivados de la LPO

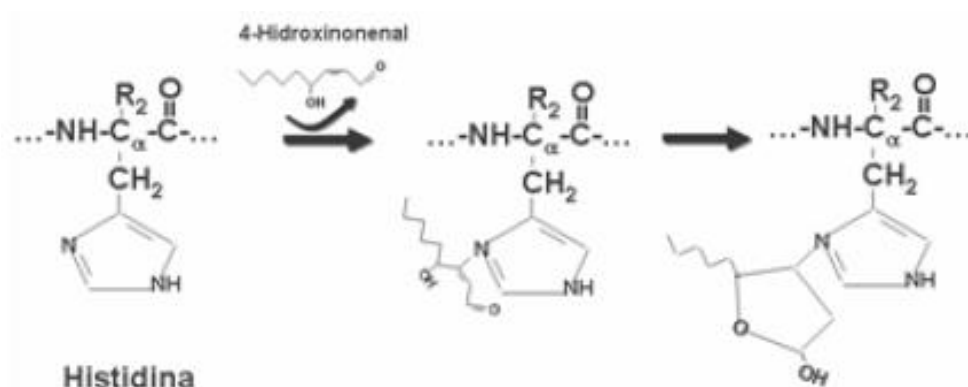


Figura 11. Esquema de las diferentes modificaciones de polipéptidos

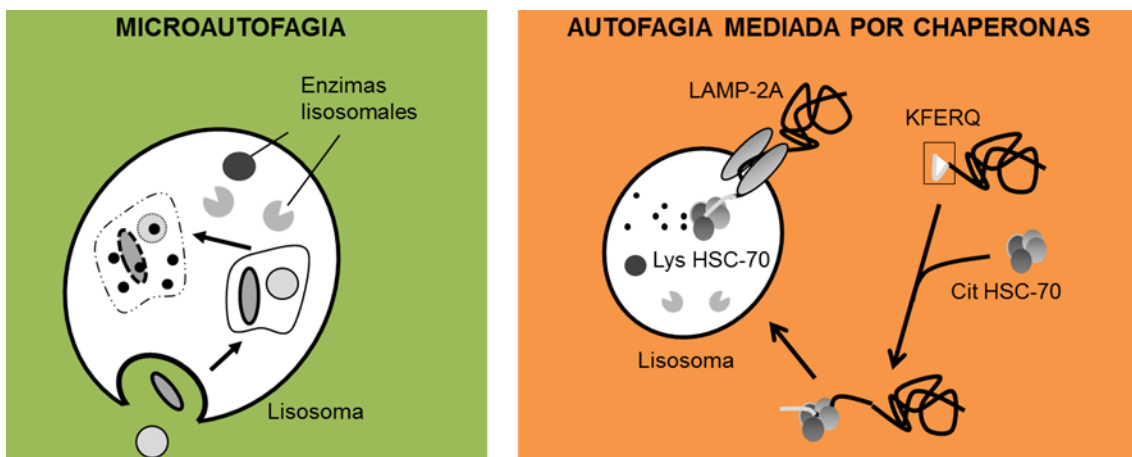
La exposición a oxidantes lleva también al incremento del daño a ácidos nucleicos. El daño al ADN puede resultar de reacciones con los residuos de desoxirribosa, con el esqueleto fosfodiéster o con las bases nitrogenadas. Habitualmente se produce por acción de radicales hidroxilo y epóxidos sobre las bases nitrogenadas, dando lugar a especies del tipo 8-oxo-deoxiguanosina. Las lesiones del ADN, que no son reparadas, se van acumulando y pueden contribuir a la aparición de procesos mutagénicos y carcinogénicos (Chatgialloglu y O'Neill, 2001). Sin embargo, el factor de transcripción p53 puede ser activado en respuesta al daño oxidativo en el ADN, favoreciendo la detención del ciclo celular y la corrección de los daños del material genético o, en el caso de un daño mayor, disparando la muerte programada de la célula.

El estrés oxidativo está considerado como actor fundamental en procesos de muerte celular, envejecimiento y mutagénesis, estando además implicado en muchos tipos de enfermedades como cáncer, trauma post-isquémico y desórdenes neurodegenerativos (Behrend *et al.*, 2003, Caballero *et al.*, 2009). Aparte de su indiscutible significado patofisiológico, pocas células y órganos permanecen expuestos, de forma crónica y fisiológica, a altos niveles de estrés oxidativo, de forma que la ausencia de buenos modelos experimentales dificulta el estudio del papel del estrés oxidativo bajo condiciones “normales” o fisiológicas.

Autofagia

La autofagia es un mecanismo de supervivencia que está 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. Este 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, evoluciona a un proceso de muerte celular programada, similar a apoptosis o precursor de éste.

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; en inglés, chaperone-mediated autophagy (CMA) (Figura 12).



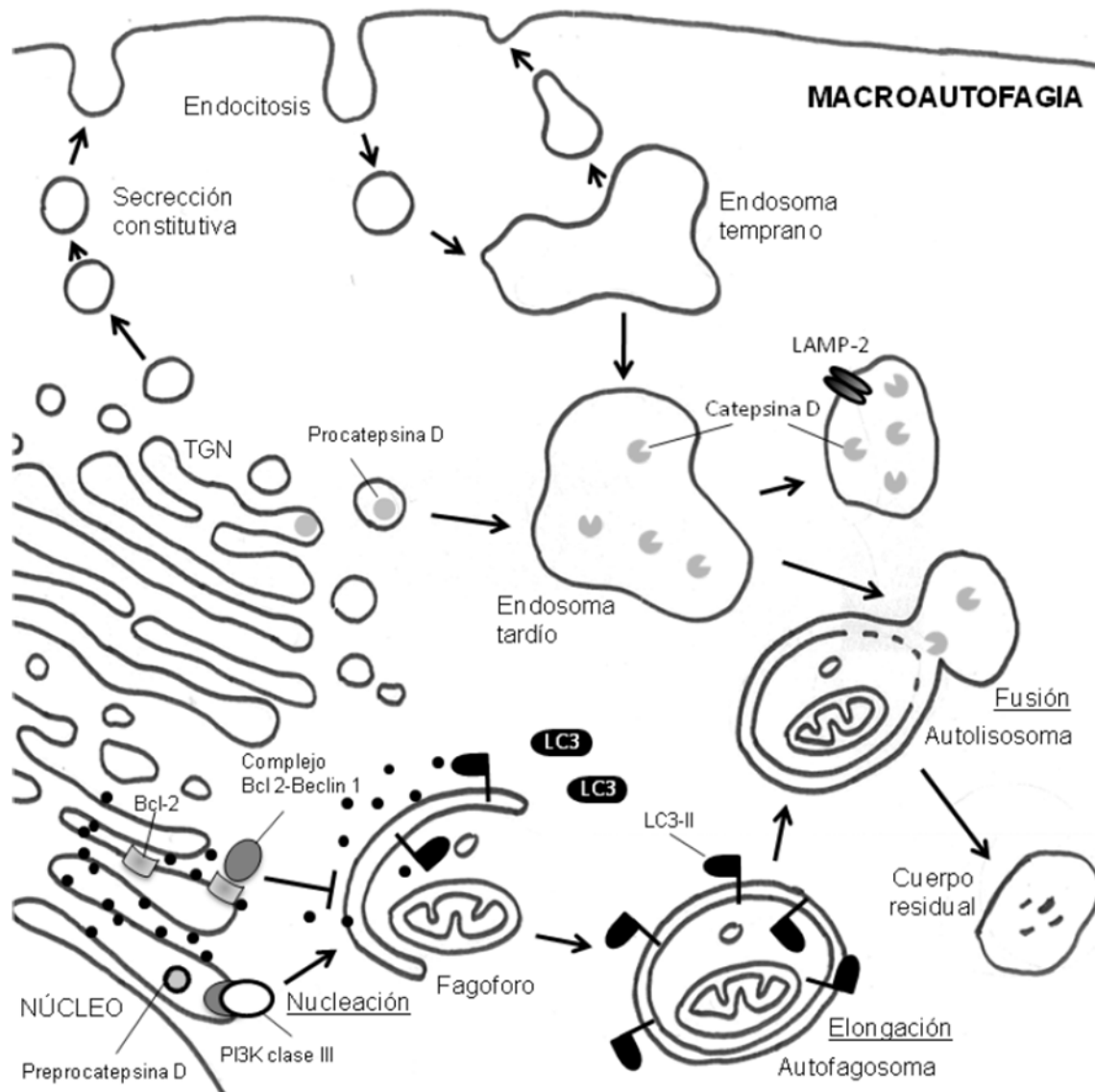


Figura 12. Esquema de los diferentes tipos de autofagia.

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 del material citoplásmico. Durante la microautofagia, el único proceso constitutivo de los tres, el secuestro de material citoplásmico se realiza mediante una invaginación directa de la membrana lisosomal (Yen y 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, llamada hsc70, que transporta la proteína al lisosoma donde el centro activo de la proteína interacciona con

su receptor asociado a la membrana lisosomal 2A; en inglés, lysosome-associated membrane protein type 2A (LAMP-2A) (Cuervo y 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 a 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 y 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 y 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 *Reciclaje* de las macromoléculas constituyentes y formación del cuerpo residual (Yen y 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 genes relacionados con autofagia; en inglés, autophagy-related genes (Atg), 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:

- Los complejos de proteínas serina/treonina quinasas (Atg1, Atg13, Atg17) que actúan como sustratos de diana de rapamicina en mamíferos; en inglés, mammalian target of rapamycin (mTOR) quinasa en la inducción.
- El complejo de señalización lípido-quinasa (Atg 6 o Beclin-1, Atg14, Atg34, Atg15) que participan en procesos de nucleación vesicular.

- El sistema de conjugación similar a ubiquitina (Atg8 o LC3, Atg12) que participa en la elongación de la membrana vesicular.
- Las proteínas implicadas en la ruta de reciclado 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 ido 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 y Cuervo, 2006) mientras que poco se conoce sobre los niveles necesarios para activar la macroautofagia.

Hay varias proteínas claves en la ruta macroautofágica. Entre ellas, cabe destacar Beclin 1, una proteína de mamíferos homólogo al Atg6 de levaduras, que forma un complejo multimérico con varias proteínas, entre ellas una fosfoinositol-3-quinasa (PI3K) de clase III (Vps34). Este complejo es fundamental también para la formación del autofagosoma (Liang *et al.*, 1999). LC3 es el marcador más utilizado de autofagia. LC3 se sintetiza inicialmente en una forma sin procesar, proLC3, que se convierte en la forma procesada proteolíticamente LC3-I, que carece de los aminoácidos del extremo C-terminal, y finalmente está modificado en una forma fosfatidiletanolamina conjugada, LC3-II (Skop *et al.*, 2012). LC3-II es el único marcador proteico que se asocia de forma fiable con fagóforos, autofagosomas sellados y autofagosomas maduros o lisosomas (Rubinsztein *et al.*, 2009). Sin embargo, LC3-II se localiza tanto en lugares luminales y citosólicos del autofagosoma y sufre una rápida degradación en el lisosoma (Skop *et al.*, 2012). Para determinar el flujo real de la autofagia, es necesario mostrar la relación LC3-II/LC3-I y también el incremento de los niveles de LC3-I y de LC3-II.

METODOLOGÍA

METODOLOGÍA

Animales

Cerdos [(Large White x Landrace) x Duroc] machos se criaron desde el nacimiento (abril) hasta el sacrificio (octubre) en una granja experimental del Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries; en español, Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias (IRTA-Monells) (Cataluña) y se sometieron a diferentes tratamientos de manejo que promueven distintos tipos de estrés psicológico, como la mezcla de animales desconocidos en la granja y/o durante el transporte y la estabulación antes del sacrificio. Durante el periodo de cría en la granja, algunos animales no se mezclaron nunca después de la formación inicial de los grupos experimentales (Unmixed group at the Farm, UF), mientras que los demás fueron sometidos a una rutina común de crear nuevos grupos sin tener en cuenta su camada y después fueron mezclados dos veces más (21 y 60 días de edad) con animales desconocidos (Mixed group at the Farm, MF).

Cuando los cerdos (n=15) alcanzaron un peso de 120 kg, fueron sacrificados en un matadero experimental situado a 1 km de la granja. Los procedimientos de manipulación y de transporte fueron suaves para evitar un estrés adicional. Después, se realizaron dos tratamientos diferentes previos al sacrificio: algunos animales no se mezclaron con animales de otros corrales durante el transporte o la estabulación antes del sacrificio (Unmixed group at Slaughter, US), mientras que el resto se mezclaron en el transporte y durante la estabulación (Mixed group at Slaughter, MS). A estos grupos experimentales no se les puede considerar como grupo control, intermediario y máximo porque al no saber el efecto provocado por cada estrés ejercido no podemos asegurar el incremento proporcional al músculo.

En base a estos tratamientos, los animales fueron divididos en tres grupos:

- UF-US (Unmixed at the Farm - Unmixed at Slaughter), representa al grupo control, sin estrés debido a la mezcla de animales, ya sea en la granja o durante el transporte y la estabulación.

- MF-US (Mixed at the Farm - Unmixed at Slaughter), representa al grupo sometido a estrés psicológico causado por la mezcla de animales desconocidos en la granja, pero no durante el transporte y la estabulación.
- MF-MS (Mixed at the Farm - Mixed at Slaughter), representa al grupo con estrés psicológico causado por la mezcla de animales desconocidos en la granja y durante el transporte y la estabulación.

A los 45 minutos después del sacrificio, se midió el pH en el músculo *Longissimus dorsi* (LD). Además, las muestras musculares fueron tomadas del LD de cada animal a las 4, 8 y 24 *post-mortem*. Estas muestras fueron inmediatamente congeladas sumergiéndolas completamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta que fueron analizadas.

Preparación de las muestras

Las muestras de músculo fueron homogeneizadas en una proporción 1:10 mL (músculo:tampón) en un tampón de homogeneización (pH 7,4), que contiene tampón fosfato potásico 10 mM, cloruro sódico 50 mM y Tritón 0,1%, usando un homogeneizador Ultra-Turrax T25. Los homogeneizados fueron centrifugados a 1500 g durante 6 minutos a 4°C. Los sobrenadantes, que contienen las proteínas, fueron recogidos, alicuotados y congelados a -80°C hasta su análisis.

Actividad antioxidante total

La actividad antioxidante total (AAT) fue determinada usando el método ABTS/H₂O₂/HRP (Arnao *et al.*, 2001, de Gonzalo-Calvo *et al.*, 2010). Los resultados están expresados en equivalentes de mg Trolox/mg proteína.

Actividad de la superóxido dismutasa

La actividad de la superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1) fue medida conforme a Martin y colaboradores (Martin *et al.*, 1987). Este enzima inhibe la autooxidación de la hematoxilina a hemateína, que es un compuesto coloreado. Los resultados están expresados como $\mu\text{mol hemateína/mg proteína*minuto}$.

Actividad de la catalasa

La actividad de la catalasa (CAT; EC 1.11.1.6) fue ensayada conforme a Lubinsky y Bewley usando H_2O_2 como sustrato (Lubinsky y Bewley, 1979). Los resultados están expresados como $\mu\text{mol } H_2O_2/\text{mg proteína}\cdot\text{minuto}$.

Daño oxidativo de lípidos

La peroxidación de lípidos (LPO) fue medida por la determinación del contenido de aldehídos reactivos, malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-2-(E)-nonenal (4-HNE), los cuales son los productos finales de la cascada de peroxidación lipídica. Las cantidades de MDA además de las de 4-HNE se determinaron en el músculo usando un kit de ensayo de LPO de Calbiochem (No. 437634) basado en la reacción de condensación del cromógeno 1-metil-2-fenilindol, ya sea con MDA o con 4-HNE. Los resultados están expresados como $\mu\text{mol (MDA+4-HNE)}/\text{g proteína}$.

Inmunoensayo Western Blot

Las alícuotas de muestras de homogeneizado de músculo contienen 100 μg de proteína por muestra y se mezclaron con tampón de muestra Laemmli (BioRad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE.UU.) y desnaturalizados por ebullición a 100°C durante 5 minutos. Después, en cada muestra fueron aislándose cada proteína por peso molecular y carga eléctrica mediante la generación de una cometa diferencial en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y posteriormente se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Immobilon TM-P; Millipore Corp., Bedford, MA, EE.UU.). Las membranas fueron bloqueadas durante toda la noche a 4°C con leche desnatada 5 o 10% (p/v) disuelta en tampón Tris salino (TBS) (Tris/HCl 50 mM, pH 7,5 y NaCl 150 mM). Posteriormente, las membranas se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios: anti-Becnin 1 (sc-10086, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) y anti-LC3 (PD014, Medical & Biological Laboratories CO., LTC, Naka-ku Nagoya, Japan) previamente diluidos en TBS que contiene leche desnatada 1% (p/v). Después de tres lavados durante 10 o 20 minutos en Tampón Tris salido que contiene Tween-20 (TBS-T) (Tris/HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM y Tween-20 0,05%), las membranas se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (Sigma Aldrich, Saint Louis,

MO, USA) diluido en tampón TBS que contiene leche desnatada 1% (p/v) durante una hora a temperatura ambiente, seguido de tres lavados de 10 o 20 minutos con TBS-T. Las membranas se revelaron usando un sustrato quimioluminiscente para la peroxidasa de rábano picante (WBKLS0500, Millipore Corporation, Billerica, USA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se presentan los datos representativos de, al menos, tres experimentos separados. Los niveles de proteínas se analizaron cuantitativamente usando el software Quantity One 5.5.1. Los resultados se normalizaron con Ponceau como control de carga, ya que, debido al propio proceso de tenderización en si mismo, tanto β -actina, como GADPH, como α -tubulina mostraron fragmentación en las muestra recogidas.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías usando el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, California, USA). El modelo incluye los efectos del tratamiento de mezcla (UF-US, MF-US, MF-MS), el tiempo *post-mortem* (4h, 8h, 24h) y su interacción con los efectos principales. Una vez que se descartó la interacción entre el tratamiento de mezcla y el tiempo, el efecto del tratamiento de mezcla y el efecto del tiempo se analizaron por separado. Cuando fueron significativas, las diferencias se analizaron con el test post-hoc Bonferroni.

El análisis multivariante se aplicó para explorar las relaciones complejas entre la calidad de la carne, definida por el pH, y las variables bioquímicas, definidas mediante biomarcadores de autofagia y estrés oxidativo y entre las variables y los tratamientos. Luego, se realizó un análisis de componentes principales (PCA), con extracción de cuatro factores y rotación varimax utilizando XLSTAT (2013).

RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN

RESULTADOS EXPERIMENTALES

En general, los datos sobre la autofagia y el estrés oxidativo obtenidos mostraron que las muestras tomadas a tiempos tempranos *post-mortem* (4h y 8h) eran más adecuadas para el estudio de las alteraciones en la biología celular de las células del músculo, ya que reflejaron con más precisión los efectos del estrés sobre los animales en el proceso de conversión del músculo en carne, mientras que a un tiempo de muestreo largo, como el de 24h *post-mortem*, las alteraciones encontradas en las células podrían estar relacionadas, más probablemente, con la degeneración celular generalizada en lugar de con las condiciones experimentales.

pH

El pH del músculo LD registrado a los 45 minutos *post-mortem* (pH45) (Tabla 1) en los animales sometidos a tratamientos de mezcla (MF-US y MF-MS) mostró una tendencia de una mayor tasa de declive *post-mortem*, por lo tanto, los valores de pH45 fueron menores en la carne de los tratamientos MF-US y MF-MS (6,45 y 6,50, respectivamente) que en la carne de animales sin mezclar (control) (UF-US = 6,71).

Este resultado está de acuerdo con trabajos anteriores de Støier y colaboradores y Young y colaboradores, quienes mostraron que el estrés a corto plazo antes del aturdimiento resulta en valores más bajos de pH y temperaturas más altas en una etapa temprana *post-mortem* (Stoier *et al.*, 2001, Young *et al.*, 2009). De hecho, una mayor tasa de descenso del pH tendrá un efecto sobre el metabolismo del músculo *post-mortem* y, por lo tanto, en la calidad final de la carne de cerdo (Rosenvold y Andersen, 2003).

Actividades antioxidantes

Todos los ensayos antioxidantes (Tabla 1) llevados a cabo en los músculos de los animales de los tratamientos de mezcla (MF-US y MF-MS) mostraron un aumento significativo ($p < 0,001$), en algunos casos y en otros no, en los tiempos tempranos *post-mortem* (4h y 8h) en comparación con el grupo control de animales sin mezclar (UF-US), lo que indica un posible papel del estrés causado por la mezcla de animales

desconocidos en el desencadenamiento de la capacidad antioxidante para combatir las EROs.

Actividad antioxidante total

Como se muestra en la Tabla 1, a las 4h, la AAT fue significativamente ($p < 0,01$) mayor en el músculo de los animales sometidos al tratamiento de doble mezcla, es decir, mezclándolos tanto en la granja como durante el transporte y la estabulación antes del sacrificio (MF-MS = 70,94), que en el grupo de animales mezclados sólo en la granja (MF-US), cuya media fue de 46,13, que era, a su vez, significativamente ($p < 0,001$) mayor que la observada en el grupo de animales sin mezclar (control) (UF-US = 19,75). Por lo tanto, en este tiempo *post-mortem* más temprano, la AAT parece estar directamente relacionada con el estrés fisiológico derivado del grado de mezcla de los animales dentro del grupo.

En el siguiente tiempo de muestreo *post-mortem* (8h), se encontró un gran aumento de la AAT ($p < 0,001$) en el músculo de los animales del grupo MF-MS, lo que parece indicar la presencia de estrés agudo inducido por el tratamiento de doble mezcla. Además, el músculo de los animales de este grupo sometido al tratamiento de doble mezcla (MF-MS) mostró un agotamiento temprano de la AAT, es decir, presentando los valores más bajos de AAT a las 24h *post-mortem*, mientras que la carne del grupo de animales mezclados en la granja (MF-US) siguió mostrando los valores más altos de AAT ($p < 0,001$) (Tabla 1). Mientras tanto, la AAT en el músculo de los animales del grupo control (UF-US) mostró niveles moderados, con un aumento significativo a las 8h, seguido de una disminución significativa a las 24h. Estos resultados sugieren una intensa activación de la protección contra el estrés oxidativo muscular en animales sometidos al factor estresante que es la mezcla, con una activación más temprana que se observó en animales en el grupo de tratamiento de doble mezcla.

Enzimas antioxidantes

Los enzimas antioxidantes son la primera línea de defensa antioxidante, consistiendo principalmente en la actividad de la superóxido dismutasa y en la actividad de la catalasa, que normalmente trabajan en tándem, reutilizando el producto de la

superóxido dismutasa (H_2O_2) como sustrato de la catalasa, como hemos expuesto en la introducción de este trabajo.

Superóxido dismutasa

También, la respuesta de SOD se relaciona directamente con la intensidad del estrés en los primeros períodos *post-mortem* (Tabla 1). Por lo tanto, a las 4h *post-mortem*, el tratamiento de doble mezcla (MF-MS) indujo la máxima actividad de la SOD, mostrando diferencias significativas con las otras condiciones ($p<0,01$). Más tarde, a las 8h, ambos tratamientos de mezcla (MF-US y MF-MS) produjeron un aumento en la actividad de la SOD muscular, aunque la diferencia no fue significativa debido a la alta variabilidad de los datos, seguido de una disminución a las 24h *post-mortem*, cuando la actividad de la SOD en el músculo de los animales control (UF-US) comenzó a aumentar ($p<0,01$).

Catalasa

De acuerdo con los resultados de SOD, la enzima CAT también mostró una mayor actividad, directamente relacionada con el grado del estresante de mezcla a las 4h, siendo, nuevamente, significativamente mayor ($p<0,001$) en MF-US y MF-MS (3,39 y 3,73, respectivamente) con respecto a UF-US (1,84). Esta actividad se mantuvo a las 8h ($p<0,001$) y luego cayó pronunciadamente a las 24h, muy probablemente debido a un efecto de degradación celular (Tabla 1).

Daño oxidativo de lípidos

En general, la LPO refleja la capacidad que la actividad de los antioxidantes ha tenido en la neutralización de los radicales libres, mostrando un mayor daño de lípidos en el tejido en el caso en el que la actividad antioxidante sea insuficiente. En nuestro trabajo, no hubo diferencias significativas entre los grupos a las 4h *post-mortem*, probablemente debido a que se trataba de un punto demasiado inicial como para mostrar diferencias, mientras que a las 8h, comparando todos los grupos, se observó un daño mucho mayor de lípidos en los músculos de los animales del grupo sin mezclar (control) ($p<0,001$) que lo observado en los otros dos grupos sometidos al factor estresante de mezcla de los animales. Si, a las 8h *post-mortem*, estudiamos por separado solo los dos grupos estresados, los datos mostraron que, entre ellos, las diferencias eran más

pequeñas pero también significativas ($p<0,05$), con mayor daño de lípidos en animales sometidos al factor estresante de doble mezcla (MF-MS). Estas diferencias fueron mitigadas en el último punto de tiempo estudiado (24h), donde no se encontraron diferencias significativas, en el músculo de los animales del grupo de doble mezcla, aunque sí se presentó el nivel más bajo de daño de lípidos ($p<0,001$), es decir, los que presentan mayor defensa antioxidante en los primeros (4h a 8h) tiempos *post-mortem*.

Tabla 1. Efecto de los grupos de mezcla (en filas) y el tiempo *post-mortem* (en columnas) sobre el pH y los biomarcadores de estrés oxidativo, medidos en el músculo LD: actividad antioxidante total (AAT, mg Trolox/mg proteína), actividad de la superóxido dismutasa (μmol hematoxilina/mg proteína*minuto), actividad de la catalasa (μmol H_2O_2 /mg proteína*minuto) y peroxidación lipídica (μmol MDA+4-HNE/g proteína).

GRUPO DE MEZCLA						
	Tiempo <i>post-mortem</i>	UF-US	MF-US	MF-MS	s.e.	Sign.
pH	45 min	6.71	6.45	6.50	0.227	NS
AAT	4h	19.75 a A	46.13 b A	70.94 c A	0.874	***
	8h	36.56 a B	44.41 a A	201.27 b B	8.955	***
	24h	24.42 a C	109.32 b B	20.13 a C	17.537	***
	Sign.	***	***	***		
Actividad Superóxido dismutasa	4h	3.38 a A	3.35 a AB	5.95 b	0.910	**
	8h	2.37 A	9.06 B	7.12	3.992	NS
	24h	5.51 a B	2.83 b A	3.52 b	0.523	***
	Sign.	**	*	NS		
Actividad Catalasa	4h	1.84 a A	3.39 b A	3.73 b A	0.420	***
	8h	2.28 a B	4.10 b B	3.33 c B	0.163	***
	24h	1.71 a A	1.64 a C	1.44 b C	0.093	***
	Sign.	***	***	***		
Peroxidación lipídica	4h	113.76 A	127.83 A	117.87 A	19.549	NS
	8h	170.44 a B	49.01 b B	77.41 c B	10.916	***
	24h	132.01 a AB	144.21 a C	89.77 b C	9.453	***
	Sign.	*	***	***		

En un tiempo de maduración dado, medias en la misma fila seguido por letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes con $p<0,05$.

En un tratamiento de mezcla y variable dado, medias en la misma columna seguido por letras mayúsculas diferentes son significativamente diferentes con $p<0,05$.

s.e.: pooled standard error; NS: No significativo; *: $p<0,05$; **: $p<0,01$; ***: $p<0,001$.

Autofagia

Nuestros resultados mostraron claramente que la actividad de la autofagia tiene lugar durante la maduración de la carne de cerdo, así como dos biomarcadores principales de autofagia (Beclin 1 y LC3-II) estuvieron presentes durante el periodo *post-mortem* bajo todas las condiciones estudiadas.

Beclin 1

Beclin 1 se detectó en todas las muestras de músculo analizadas, mostrando una expresión más alta en el tiempo *post-mortem* más temprano (4h) de los grupos de estrés en comparación con el grupo control. Se detectaron niveles significativamente mayores ($p<0,001$) de esta proteína en el grupo sometido a la mezcla de animales en la granja (MF-US), mientras que se encontraron niveles intermedios en el grupo de doble mezcla (MF-MS). Cuatro horas más tarde, es decir, a las 8h *post-mortem*, la expresión de Beclin 1 seguía siendo significativamente mayor ($p<0,001$) en el grupo MF-US. Sin embargo, los valores en el grupo control (UF-US) mostraron un aumento significativo ($p<0,001$) de 0,70 a 1,25 (D.O., en unidades arbitrarias), mientras que en los grupos mixtos se observaron disminuciones significativas, de 2,10 a 1,89 (D.O., en unidades arbitrarias) en MF-US ($p<0,01$) y de 1,21 a 1,06 (D.O., en unidades arbitrarias) en MF-MS ($p<0,05$). A las 24h, se manifestó una gran disminución ($p<0,001$) en la expresión de Beclin 1 en todos los tratamientos estudiados (Figura 13).

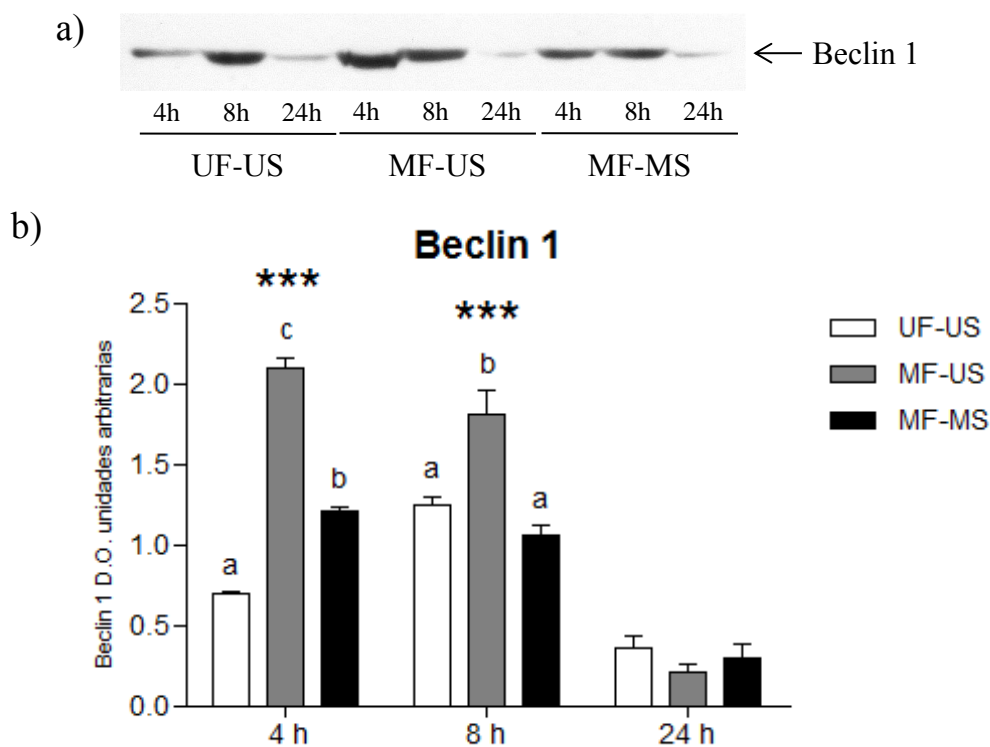


Figura 13. a) Análisis inmunoblot de la expresión de Beclin 1 en el músculo LD de animales de diferentes tratamientos de mezcla (UF-US, MF-US, MF-MS) durante el periodo *post-mortem* estudiado (4h, 8h, 24h). **b)** Efecto de los tratamientos de mezcla sobre Beclin 1 (D.O., en unidades arbitrarias) medidas a diferentes tiempos *post-mortem*. En un tiempo de maduración dado, letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de mezcla ($p<0,05$). Para el efecto general del tratamiento de mezcla: ***: $p<0,001$.

LC3-I

El valor máximo de LC3-I se observó a las 4h *post-mortem* en la carne de animales mezclados en la granja (MF-US = 1,09), cuyas diferencias fueron significativas ($p < 0,01$) con respecto a los otros grupos (0,84 y 0,82, UF-US y MF-MS, respectivamente). A las 8h, hubo un aumento significativo ($p < 0,05$) de LC3-I en el músculo de los animales del grupo control (UF-US), mientras que en los otros grupos, el nivel de LC3-I disminuyó ($p < 0,05$) (MF-US) o se mantuvo ($p > 0,5$) (MF-MS). A las 24h, el patrón de expresión era muy similar al de 4h, con valores más altos ($p < 0,001$) en MF-US que en los otros grupos (Figura 14b).

LC3-II

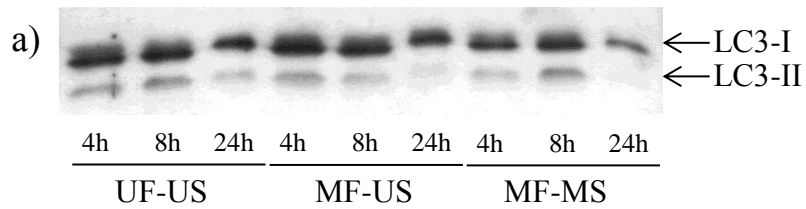
LC3-II siempre mostró valores más bajos que LC3-I, debido principalmente a la importante función que LC3-I (conocida como LC3) juega en el citoplasma de las células del músculo como una de las tres cadenas ligeras (LC1, LC2 y LC3) asociado a MAP1A purificada y MAP1B (Tanida *et al.*, 2008).

El patrón de expresión de LC3-II era análogo al de LC3-I a las 4h *post-mortem*, con diferencias significativas ($p < 0,01$) entre los distintos tratamientos, el músculo de los animales del grupo mezclado en la granja (MF-US) mostrando los valores más altos. Sin embargo, a las 8h *post-mortem*, los músculos de los animales en el tratamiento de doble mezcla (MF-MS) y sin mezclar (control) (UF-US) mostraron una mayor expresión de LC3-II, mientras que el del grupo MF-US presentó un patrón decreciente, mostrando los valores mínimos (0,15 vs 0,32/0,35 en MF-US vs MF-MS/UF-US, $p < 0,001$). A las 24horas, los valores LC3-II en la carne de todos los tratamientos fueron mínimos (Figura 14c).

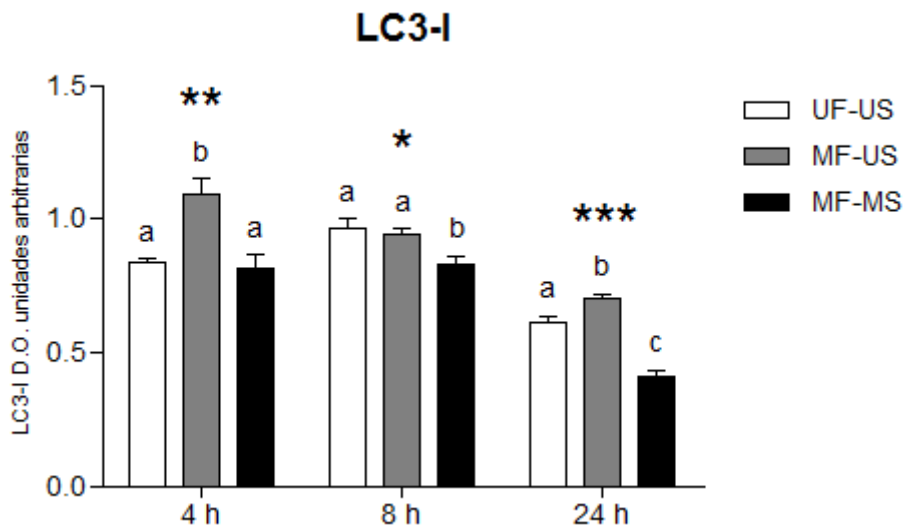
Flujo autofágico (LC3-II/LC3-I)

El flujo autofágico, controlado a través de la relación entre LC3-II y LC3-I, se mantuvo a las 4h *post-mortem*, sin diferencias entre los grupos. Sin embargo, a las 8h, este parámetro mostró diferencias significativas ($p < 0,001$), con valores máximos que se encuentran en el grupo MF-MS y valores mínimos que ocurren en el tratamiento MF-US (Figura 13d). Al final del período de estudio, es decir, a las 24horas *post-mortem*, la relación LC3-II/LC3-I no mostró diferencias significativas entre los tratamientos, pero

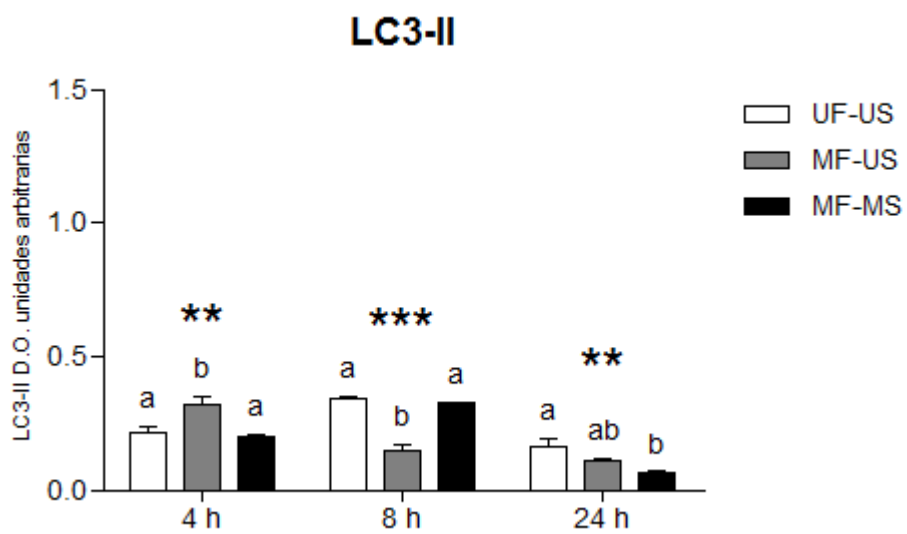
el tejido muscular de los animales del grupo control (UF-US) mantuvo un relativamente alto flujo autofágico ($p < 0,05$), mientras que el flujo se redujo en los dos tratamientos de mezcla, MF-US y MF-MS (Figura 14d).



b)



c)



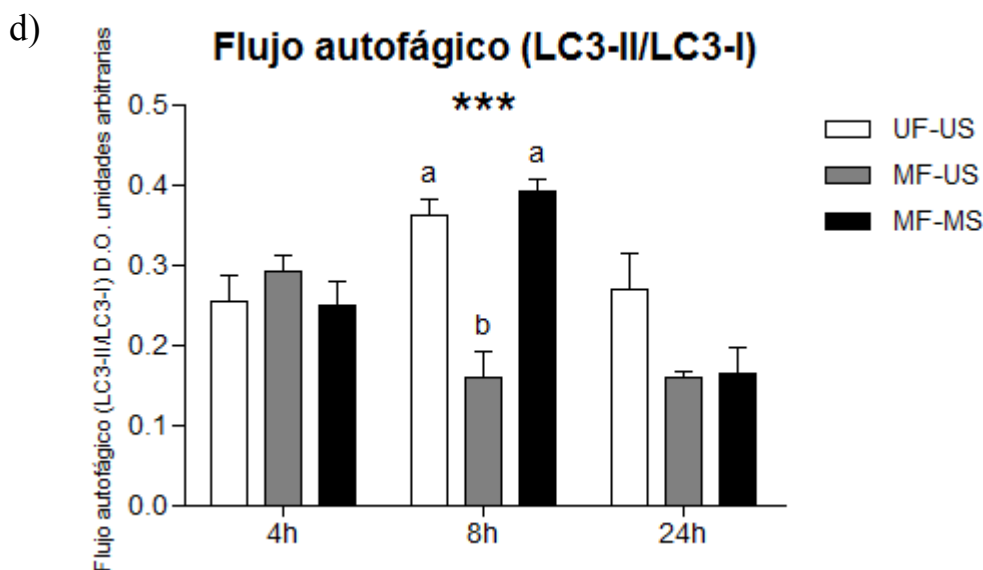


Figura 14. a) Análisis inmunoblot de la expresión de LC3-I y LC3-II en el músculo LD de animales de diferentes tratamientos de mezcla (UF-US, MF-US, MF-MS) durante el periodo *post-mortem* estudiado (4h, 8h, 24h). **b)** Efecto de los tratamientos de mezcla sobre LC3-I (D.O., en unidades arbitrarias) medidas a diferentes tiempos *post-mortem*. **c)** Efecto de los tratamientos de mezcla sobre LC3-II (D.O., en unidades arbitrarias) medidas a diferentes tiempos *post-mortem*. **d)** Efecto de los tratamientos de mezcla sobre el flujo autofágico (LC-II/LC3-I) (D.O., en unidades arbitrarias) medidas a diferentes tiempos *post-mortem*. En un tiempo de maduración dado, letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de mezcla ($p < 0,05$). Para el efecto general del tratamiento de mezcla: ***: $p < 0,001$.

Análisis multivariante

El análisis multivariante se aplicó para obtener una evaluación sintética de las complejas relaciones entre los biomarcadores de calidad de la carne (pH), autofagia (Beclin 1, LC3-I, LC3-II, flujo autofágico) y estrés oxidativo (AAT, SOD, CAT, LPO), junto con los diferentes tratamientos de mezcla (Figura 14). El biplot obtenido a través de la PCA mostró que PC1 y PC2 explican el 61% de la variabilidad en los datos. En el lado positivo, PC1 distinguió muestras de carne que muestran un descenso del pH *post-mortem* normal (pH más alto a los 45 minutos en el músculo LD), junto con una mayor capacidad antioxidante (SOD24, CAT24) a las 24h *post-mortem*, además de niveles de LC3-II más altos e incluso una relación LC3-II/LC3-I superior a las 24h. Estas muestras correspondieron a los animales del tratamiento UF-US, es decir, sin mezcla de animales, lo cual demuestra ningún efecto del estrés psicológico sobre el metabolismo muscular *post-mortem*. Sin embargo, en el lado negativo del biplot, había muestras de carne de

los tratamientos MF-US y MF-MS (Figura 15), que mostraron mayor actividad antioxidante (TAA, CAT, SOD) y los niveles de Beclin 1 en tiempos tempranos *post-mortem* (4h), mostrando así la activación temprana de la autofagia, muy probablemente debido a un mayor estrés pre-sacrificio debido al tratamiento de mezcla de los animales (en la granja o en la granja más en el sacrificio).

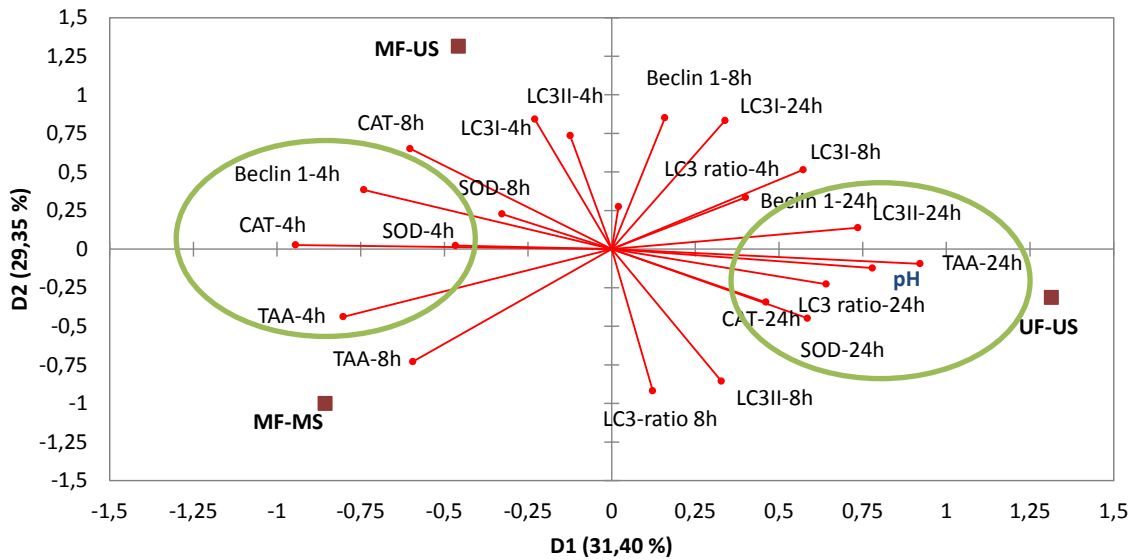


Figura 15. Análisis biplot de componentes principales de variables (pH, AAT, SOD, CAT, Beclin 1, LC3-I, LC3-II, LC3 ratio) y tratamientos (UF-US, MF-US, MF-MS). AAT: actividad antioxidante total; SOD: superóxido dismutasa; CAT: catalasa; LC3 ratio: LC3-II/LC3-I.

DISCUSIÓN

Las variaciones en las emociones animales y la percepción de estrés debido a las diferentes estrategias de manejo en la granja y en el matadero pueden tener un efecto importante sobre la calidad de la carne (Gispert *et al.*, 2000). Diferentes factores de estrés y las respuestas individuales de los animales ante estos factores estresantes parece que podrían explicar, al menos en parte, las altas variaciones de calidad de la carne que se encuentran en el mercado, especialmente en el caso de los cerdos, ya que es un animal muy sensible al estrés. En el proceso de conversión *post-mortem* de músculo en carne, el estrés puede llevar a cambios significativos en las características organolépticas de la carne que podría llevar a la producción de carnes PSE, que se consideran carnes de baja calidad. De una forma u otra, estos problemas causan importantes pérdidas económicas en el mercado de la carne que demandan respuestas de la comunidad científica a este problema.

El estrés es un término general que describe la inadecuada respuesta fisiológica de un organismo ante cualquier demanda mental, emocional o física, ya sea real o imaginaria (Selye, 1956, Schiavone *et al.*, 2013). Los mecanismos celulares que desencadenan el estrés son desconocidos, pero ya se ha descrito una relación entre el estrés y el estrés oxidativo ya que los cambios oxidativos se producen en situaciones tales como el transporte por carretera, el destete o el estrés por calor (Burke *et al.*, 2010). El incremento en la actividad de los individuos sometidos a estrés requiere una mayor producción de ATP, lo que resulta en un aumento de consumo de oxígeno por las mitocondrias, que a su vez conduce a una mayor producción de radicales libres. Ya que el estrés oxidativo y el estrés psicológico parecen estar implicados en la calidad de la carne, la determinación del nivel de implicación de ambos factores en este proceso puede tener importantes repercusiones en el mercado cárnico.

Es conocido que el estrés psicológico provoca daño oxidativo en el músculo (Li *et al.*, 2011). Nuestros datos apoyan esta conclusión, ya que se observó un incremento en los sistemas antioxidantes que era proporcional al estrés sufrido. Por lo tanto, durante el período de maduración *post-mortem*, se indujo un incremento de la AAT, así como de los enzimas antioxidantes en el tejido muscular para contrarrestar las EROs producidas por el estrés. Datos previos de nuestro grupo muestran que en las células musculares después del sacrificio, la actividad de varios enzimas puede ser inducida, principalmente

en el caso de los enzimas antioxidantes (Coto-Montes *et al.*, 2004, Caballero *et al.*, 2006) y las catepsinas (Caballero *et al.*, 2007) y, por lo tanto, se puede esperar el aumento de enzimas antioxidantes observado a las 4h y 8h. Este incremento de las actividades, en nuestro estudio, mostraron una evolución temporal con un correcto equilibrio oxidativo porque, aunque las actividades de CAT y SOD se expresaron en unidades diferentes, siguieron un patrón similar, manteniendo un equilibrio SOD/CAT delicado para la desintoxicación, como se ha observado anteriormente en estudios análogos al que presentamos (Pinho *et al.*, 2006). En nuestro caso, a las 24h, estas enzimas antioxidantes mostraron pruebas de degradación celular, perdiendo su capacidad de síntesis, algo que fue repetidamente observado en todas las proteínas estudiadas.

Incluso con el incremento de la actividad antioxidante, la LPO fue inevitable en todos los casos. Así, a las 4h, el tejido muscular de todos los animales estudiados mostró niveles similares de daño de lípidos, lo que implica que en el período temprano *post-mortem*, el sacrificio fue el principal factor de inducción de estrés. Sin embargo, a medida que avanzaba el período *post-mortem*, el incremento de la defensa antioxidante observado en el músculo de los animales sometidos a estresantes de mezcla *ante-* y *peri-mortem* tuvieron efectos claros sobre el daño inducido por los radicales libres con una disminución significativa en la LPO observada en MF-US y MF-MS a las 8h *post-mortem*, mientras la LPO se mantuvo baja en el grupo sometido a una doble mezcla (MF-MS) a las 24h *post-mortem*. Una vez más, la pérdida de la capacidad de síntesis celular a las 24h se manifestó en todas las condiciones estudiadas.

Sin embargo, la disminución en el daño observado en el músculo de los animales estresados podría estar relacionada no sólo con la eficacia antioxidante, sino también con otros procesos que podrían estar implicados. En este contexto, la autofagia desencadenada por el estrés oxidativo ha sido ampliamente documentada (Chen *et al.*, 2008). Aunque la relación entre el estrés psicológico y la autofagia es aún desconocida, nuestro grupo recientemente demostró que los procesos de autofagia que se producen en la carne de vacuno durante la maduración *post-mortem* de la carne están directamente relacionados con el estado de estrés oxidativo de las células (García-Macia *et al.*, 2014). Por lo tanto, la posibilidad de aparición de autofagia en el tejido muscular durante la maduración *post-mortem* temprana modulada por el estrés *ante-* o *peri-mortem* inducida

en el animal se podría esperar, ya que este estrés provoca alteraciones en el equilibrio oxidativo, como se muestra en el presente trabajo.

Como ruta metabólica, la autofagia es altamente sensible a los cambios en el entorno (Scherz-Shouval y Elazar, 2011). Por lo tanto, se puede ver activada ante condiciones de estrés, porque el estrés psicológico suele ir acompañado de un aumento de EROs, y la relación entre EROs y autofagia se ha documentado ampliamente (Azad *et al.*, 2009). Nuestros resultados están de acuerdo con estos datos ya que los principales marcadores de autofagia estudiados, Beclin 1 y LC3, mostraron un aumento en su actividad. Sin embargo, estos incrementos se deben interpretar con cuidado, ya que podría ser el resultado de dos estímulos muy diferentes que tienen que ser considerados de forma independiente: el estrés por el sacrificio y el estrés inducido por la mezcla ante o *peri-mortem* de los animales.

El estrés del sacrificio junto con las condiciones anóxicas causadas por el corte repentino del flujo de sangre es capaz de inducir la expresión de ambos marcadores de autofagia, pero esta situación debería observarse en todos los animales de nuestro estudio, incluso los del grupo control sin mezcla de animales (UF-US), además de los sometidos a diferentes factores estresantes de mezcla animal (MF-US y MF-MS). La autofagia se ha demostrado que es un mecanismo de supervivencia para el tejido muscular en el período temprano *post-mortem* de toros de un año (García-Macia *et al.*, 2014). Este proceso ha sido descrito como una respuesta a la hipoxia brusca sufrida por las células musculares después del sacrificio, porque la hipoxia siempre está acompañada por una inducción de EROs. Pero en base a los datos presentados en este trabajo, debe ser considerado un cierto componente de estrés psicológico involucrado en la inducción de la autofagia, ya que se han observado diferencias significativas entre los grupos estudiados. Así, ambas condiciones experimentales que muestran el estrés causado por la mezcla de animales desconocidos (en la granja o en la granja más en el sacrificio) dio lugar a un incremento significativo en Beclin 1 en el tejido muscular durante un período *post-mortem* muy corto (4h-8h). Este ortólogo en mamíferos de Atg6 de levaduras desempeña un papel central en la autofagia como contribuyente principal a la iniciación de la autofagia (Kang *et al.*, 2011). En el presente estudio, su valor fue aún mayor en el grupo MF-US (mezcla de animales en la granja), en comparación con MF-MS (mezcla de animales en la granja más en el sacrificio). Este mayor incremento en el grupo sometido a la mezcla de animales en la granja, donde se puede esperar un nivel

intermedio de estrés inducido debido a la mezcla de animales en comparación con el grupo de tratamiento de doble mezcla (en la granja más en el sacrificio) parece reflejar una alta variabilidad interindividual en la susceptibilidad de los animales al estrés, lo cual demuestra que la activación de la autofagia depende en gran medida del nivel de estrés psicológico en cada animal individual.

Por lo tanto, la respuesta de la autofagia observada en el músculo *post-mortem* no fue proporcional al nivel del factor estresante de mezcla como, sin embargo, se observó de forma general en la respuesta antioxidante.

De hecho, las respuestas conductuales, fisiológicas y metabólicas a situaciones adversas dependen de los antecedentes genéticos y la experiencia previa de los animales (Terlouw, 2005). Es importante señalar que los niveles de estrés de los animales dependen indirectamente de la situación y directamente de la evaluación de los animales de dicha situación. Cada individuo es único, y su evaluación de la situación y los niveles de estrés potencialmente resultantes son, por lo tanto, subjetivos, es decir, dependen del individuo (Terlouw, 2005). Es por esta razón que los científicos deberían trabajar en el desarrollo de medidas individuales para evaluar el bienestar animal en los animales de granja.

Dado el papel de las EROs en la inducción de la autofagia, los antioxidantes pueden servir como reguladores a la baja (down-regulators) naturales de este proceso (Scherz-Shouval y Elazar, 2011). Varios trabajos recientes han mostrado la modulación de la autofagia mediante antioxidantes. La glucólisis inducida por TP53 y el regulador de la apoptosis (TIGAR), que modula la vía glucolítica y disminuye los niveles de EROs intracelulares, son capaces de inhibir la autofagia través de la actividad constitutiva del sistema celular de defensa antioxidante (Bensaad *et al.*, 2009). Del mismo modo, bajo condiciones de inanición prolongada o privación de glucosa, la sobreexpresión de SOD y CAT son capaces de inhibir la autofagia (Chen *et al.*, 2009). La privación de glucosa y la hipoxia brusca muestran varios efectos comunes, incluyendo incrementos de EROs. En nuestros resultados, se observó que los enzimas antioxidantes se incrementaron bajo ambos tipos de estrés (estrés en el sacrificio y estrés inducido por la mezcla de animales), pero al mismo tiempo estos incrementos fueron proporcionales al estrés inducido a las 4h, mientras que a las 8h esta tendencia cambió. Esta actividad antioxidante significativa parece que fue capaz de inhibir la

autofagia, si tenemos en cuenta el papel esencial en la autofagia desempeñado por el flujo autofágico, medido como la relación LC3-II/LC3-I.

En el presente estudio, se estimó el flujo autofágico teniendo en cuenta todas las posibles transformaciones de LC3, y se observó que LC3-I estaba incrementado de forma consecuente con el incremento también observado para Beclin 1. Sin embargo, LC3-II mostró una disminución a las 8h en el grupo de animales mezclados en la granja (MF-US) cuando SOD y CAT se produjeron en exceso. Esta disminución podría ser una consecuencia de la baja formación de LC3-II debido a una disminución de la autofagia provocada por la actividad antioxidante, así como por el incremento de la degradación debido a la mayor actividad lisosomal. Ambas acciones son posibles e incluso podrían ser acumulativas.

Sin embargo, después de 8h de maduración de la carne, la más alta actividad antioxidante se observó en términos de actividad de SOD y de CAT, lo que puede inducir una reducción drástica de la formación de LC3-II. Serán necesarios más estudios para aclarar qué factor tiene una mayor influencia en cuanto a la inhibición de la autofagia.

La mezcla de cerdos no familiarizados deriva habitualmente en peleas (D'Souza *et al.*, 1999) y ha demostrado que acelera el metabolismo muscular *ante-mortem*, que conduce a disminuir las reservas de glucógeno muscular pre-sacrificio. Por otra parte, se sabe que los efectos *post-mortem* del ejercicio o del estrés inmediatamente antes del sacrificio inducen una temperatura y un contenido de ácido láctico más altos en el músculo lo que conlleva una disminución de pH más rápida (Terlouw, 2005). Esta situación es similar a la que se encontró en el presente estudio, en las muestras de carne procedentes de animales mezclados, que mostraron un descenso del pH *post-mortem* más rápido. Por otra parte, la velocidad y el grado de disminución del pH afectan sensorial y tecnológicamente a la calidad de la carne de forma significativa (Terlouw, 2005). Un descenso rápido del mismo provoca la desnaturalización de las proteínas musculares, debido a la asociación de un pH bajo y una temperatura relativamente alta del músculo, por lo que la carne producida bajo tales condiciones tendría altas posibilidades de ser pálida, blanda y exudativa (PSE) y al mismo tiempo tendería a una mayor dureza de masticación.

En este trabajo, la mezcla de animales desconocidos llevó a un estrés ante- y peri-sacrificio en los cerdos y tuvo un efecto sobre el metabolismo muscular *post-mortem*, lo que provocó una disminución de pH más rápida, lo que debería afectar negativamente a la calidad final de la carne. Además, en el análisis multivariante resalta una correlación de los tratamientos de mezcla de los animales y, por lo tanto, el resultante estrés inducido por la mezcla, con una activación temprana *post-mortem* de la defensa antioxidante y la ruta autofágica-lisosomal en el tejido muscular. Esta respuesta es una estrategia adaptativa para mantener la supervivencia celular bajo condiciones de estrés y puede tener efectos importantes en la calidad de la carne obtenida.

Finalmente, la autofagia parece, nuevamente, para jugar un papel importante en la regulación del metabolismo muscular *post-mortem* y la tenderización de la carne. Por otra parte, el seguimiento de la evolución temporal de los enzimas antioxidantes y de los biomarcadores autofágicos (Beclin 1 y la relación LC3-II/LC3-I) en el músculo en las primeras horas *post-mortem* podría proporcionar buenos biomarcadores de la influencia del estrés de los animales en la conversión del músculo en carne.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- Existe una alta variabilidad interindividual en la susceptibilidad de los animales al estrés.
- El estrés psicológico genera estrés oxidativo y, éste a su vez, activa la autofagia.
- La defensa antioxidante es proporcional al estrés inducido.
- La mezcla de animales provoca un incremento del estrés oxidativo acelerando la tenderización.

SÍMBOLOS

SÍMBOLOS

4-HNE: 4-Hidroxi-2-(E)-NonEnal.

AAT: Actividad Antioxidante Total.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

ANOVA: en inglés, ANalysis Of VAriance; en español, análisis de las varianzas.

Atg: en inglés, Autophagy-related genes; en español, genes relacionados con autofagia.

ATP: en inglés, Adenosine TriPhosphate; en español, adenosín trifosfato.

CAT: CATalasa.

CMA: en inglés, Chaperone-Mediated Autophagy; en español, autofagia mediada por chaperonas.

DFD: en inglés, Dark, Firm, Dry; en español, oscura, dura y seca.

EROs: Especies Reactivas de Oxígeno.

GSH: glutatión reducido.

GSSG: glutatión oxidado.

GSH-Px/GSH-R: tándem glutatión peroxidasa/reductasa.

H₂O₂: peróxido de hidrógeno.

H-FABP: en inglés, Heart-type Fatty Acid Binding Protein; en español, proteína de unión de ácidos grasos cardíaca.

IMP: en inglés, Inosine MonoPhosphate; en español, inosín monofosfato.

IRTA: en catalán, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries; en español, instituto de investigación y tecnología agroalimentarias.

kDa: kiloDalton.

LAMP-2A: en inglés, **L**ysosome-**A**sociated **M**embrane **P**rotein type **2A**; en español, proteína asociada a la membrana lisosomal tipo 2A.

LD: *Longissimus dorsi*.

LPO: Lipo**P**er**O**xidación.

MCP: Muerte Celular **P**rogramada.

MDa: Mega**D**alton.

MDA: Malon**D**i**A**ldéhid**o**.

MF: en inglés, **M**ixed group at the **F**arm; en español, grupo mezclado en la granja.

MS: en inglés, **M**ixed group at **S**laughter; en español, grupo mezclado en el sacrificio.

MF-US: en inglés, **M**ixed at the **F**arm - **U**nmixed at **S**laughter; en español, grupo mezclado en la granja, pero no en el sacrificio.

MF-MS: en inglés, **M**ixed at the **F**arm - **M**ixed at **S**laughter; en español, grupo mezclado en la granja y en el sacrificio.

mTOR: en inglés, **m**ammalian **T**arget **O**f **R**apamycin; en español, diana de rapamicina en mamíferos.

NADPH: en inglés, **N**icotinamide **A**denine **D**inucleotide **P**hosphate; en español, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, en su forma reducida.

NO: óxido nítrico.

O₂[•]: Radical superóxido.

•OH: radical hidroxilo.

PCA: en inglés, **P**rinciple **C**omponent **A**nalysis; en español, análisis de componentes principales.

PGM: en inglés, **P**hospho**G**luco**M**utase; en español, fosfoglucomutasa.

PI3K: en inglés, **P**hospho**I**nositide-**3**-**K**inase; en español, fosfoinositol-3-quinasa.

PSE: en inglés, **P**ale, **S**oft and **E**xudative; en español, pálida, blanda y exudativa.

PVDF: en inglés, **P**oly**V**inylidene **D**i**F**luoride; en español, difluoruro de polivinilideno.

ROO[•]: radical peróxido.

SDS-PAGE: en inglés, **S**odium **D**odecyl **S**ulfate **P**oly**A**crylamide **G**el **E**lectrophoresis; en español, electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

SOD: SuperÓxido Dismutasa.

SOD1: SOD citosólica.

SOD2: SOD mitocondrial.

SOD3: SOD extracelular.

TBARS: en inglés, **T**hio**B**arbituric **A**cid **R**eactive **S**ubstances; en español, índice de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico.

TBS: en inglés, **T**ris-**B**uffered **S**aline; en español, tampón Tris salino.

TBS-T: en inglés, **T**ris-**B**uffered **S**aline – **T**ween-20; en español, tampón Tris salino con Tween-20.

UF: en inglés, **U**nmixed group at the **F**arm; en español, grupo no mezclado en la granja.

US: en inglés, **U**nmixed group at **S**laughter; en español grupo no mezclado en el sacrificio.

UF-US: en inglés, **U**nmixed at the **F**arm - **U**nmixed at **S**laughter, en español, grupo no mezclado en la granja ni en el sacrificio.

PGM: en inglés, **P**hospho**G**luco**M**utase; en español, fosfoglucomutasa.

H-FABP: en inglés, **H**eat-type **F**atty **A**cid **B**inding **P**rotein; en español, proteína de unión de ácidos grasos cardíaca.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Adzitey F and Nurul H 2011. Pale Soft Exudative (PSE) and Dark Firm Dry (DFD) Meats: Causes and measures to reduce these incidences. *International Food Research Journal*.
- Apple JK, Kegley EB, Galloway DL, Wistuba TJ and Rakes LK 2005. Duration of restraint and isolation stress as a model to study the dark-cutting condition in cattle. *J Anim Sci* 83, 1202-1214.
- Arnao MB, Cano A and Acosta M 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry* 73, 239-244.
- Arthington JD, Eichert SD, Kunkle WE and Martin FG 2003. Effect of transportation and commingling on the acute-phase protein response, growth, and feed intake of newly weaned beef calves. *J Anim Sci* 81, 1120-1125.
- Azad MB, Chen Y and Gibson SB 2009. Regulation of autophagy by reactive oxygen species (ROS): implications for cancer progression and treatment. *Antioxid Redox Signal* 11, 777-790.
- Bee G, Biolley C, Guex G, Herzog W, Lonergan SM and Huff-Lonergan E 2006. Effects of available dietary carbohydrate and preslaughter treatment on glycolytic potential, protein degradation, and quality traits of pig muscles. *J Anim Sci* 84, 191-203.
- Behrend L, Henderson G and Zwacka RM 2003. Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem Soc Trans* 31, 1441-1444.
- Bensaad K, Cheung EC and Vousden KH 2009. Modulation of intracellular ROS levels by TIGAR controls autophagy. *EMBO J* 28, 3015-3026.
- Beriaín MJ and Lizaso G 1998. *Vacuno de Carne: Aspectos Claves*. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Bernard C, Cassar-Malek I, Le Cunff M, Dubroeuq H, Renand G and Hocquette JF 2007. New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. *J Agric Food Chem* 55, 5229-5237.

- Boissy A 1995. Fear and fearfulness in animals. *Q Rev Biol* 70, 165-191.
- Bouley J, Chambon C and Picard B 2004. Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 4, 1811-1824.
- Bouley J, Meunier B, Chambon C, De Smet S, Hocquette JF and Picard B 2005. Proteomic analysis of bovine skeletal muscle hypertrophy. *Proteomics* 5, 490-500.
- Burke G, Fiehn O and Moran N 2010. Effects of facultative symbionts and heat stress on the metabolome of pea aphids. *ISME J* 4, 242-252.
- Caballero B and Coto-Montes A 2012. An insight into the role of autophagy in cell responses in the aging and neurodegenerative brain. *Histol Histopathol* 27, 263-275.
- Caballero B, Sierra V, Vega-Naredo I, Tomás-Zapico C, Rodríguez-Colunga MJ, Tolivia D, Hardeland R, Oliván M and Coto-Montes A 2006. Enzimas antioxidantes en la maduración de carne de vacuno procedente de dos cabañas autóctonas asturianas. *ITEA* 102, 288-303
- Caballero B, Sierra V, Oliván M, Vega-Naredo I, Tomás-Zapico C, Álvarez-García O, Tolivia D, Hardeland R, Rodríguez-Colunga MJ and Coto-Montes A 2007. Activity of cathepsins during beef aging related to mutations in the myostatin gene. *J Sci Food Agric* 87, 192-199.
- Caballero B, Vega-Naredo I, Sierra V, Huidobro-Fernandez C, Soria-Valles C, De Gonzalo-Calvo D, Tolivia D, Pallas M, Camins A, Rodríguez-Colunga MJ and Coto-Montes A 2009. Melatonin alters cell death processes in response to age-related oxidative stress in the brain of senescence-accelerated mice. *J Pineal Res* 46, 106-114.
- Caballero B, Vega-Naredo I, Sierra V, Huidobro-Fernandez C, Soria-Valles C, De Gonzalo-Calvo D, Tolivia D, Gutierrez-Cuesta J, Pallas M, Camins A, Rodríguez-Colunga MJ and Coto-Montes A 2008. Favorable effects of a prolonged treatment with melatonin on the level of oxidative damage and

- neurodegeneration in senescence-accelerated mice. *J Pineal Res* 45, 302-311.
- Calvo JH, Osta, R., García-Muro, E., Zaragoza, P. 1997. Síndrome de estrés porcino: aplicación y ventajas de la PCR para su diagnóstico. *Med. Vet.* 14, 110-113.
- Campo MM, Sanudo C, Panea B, Alberti P and Santolaria P 1999. Breed type and ageing time effects on sensory characteristics of beef strip loin steaks. *Meat Sci* 51, 383-390.
- Coto-Montes A, Boga JA, Rosales-Corral S, Fuentes-Broto L, Tan DX and Reiter RJ 2012. Role of melatonin in the regulation of autophagy and mitophagy: a review. *Mol Cell Endocrinol* 361, 12-23.
- Coto-Montes A, Caballero B, Sierra V, Vega-Naredo I, Tomás-Zapico C, Hardeland R, Tolivia D, Ureña F and Rodríguez Colunga MJ 2004. Actividad de los principales enzimas antioxidantes durante el periodo de oreo de culones de la raza asturiana de los valles. *ITEA* 1, 43-55.
- Cuervo AM 2004. Autophagy: many paths to the same end. *Mol Cell Biochem* 263, 55-72.
- Cuervo AM and Dice JF 1996. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* 273, 501-503.
- Chatgililoglu C and O'Neill P 2001. Free radicals associated with DNA damage. *Exp Gerontol* 36, 1459-1471.
- Chen Y, Azad MB and Gibson SB 2009. Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell Death Differ* 16, 1040-1052.
- Chen Y, McMillan-Ward E, Kong J, Israels SJ and Gibson SB 2008. Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. *Cell Death Differ* 15, 171-182.
- Chrystall BB and Devine CE 1985. Electrical stimulation: its early development in New Zeland. *Advances in Meat Research* 1, 73-119.

- De Duve C and Baudhuin P 1966. Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev* 46, 323-357.
- de Gonzalo-Calvo D, Neitzert K, Fernandez M, Vega-Naredo I, Caballero B, Garcia-Macia M, Suarez FM, Rodriguez-Colunga MJ, Solano JJ and Coto-Montes A 2010. Differential inflammatory responses in aging and disease: TNF-alpha and IL-6 as possible biomarkers. *Free Radic Biol Med* 49, 733-737.
- Dean RT, Fu S, Stocker R and Davies MJ 1997. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 324 (Pt 1), 1-18.
- Esterbauer H and Cheeseman KH 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 186, 407-421.
- Fàbrega E, Puigvert, X., Soler, J., Tibau, J., Dalmau, A. 2013. Effect of on farm mixing and slaughter strategy on behaviour, welfare and productivity in Duroc finished entire male pigs. *Applied Animal Behaviour Science* 143, 31-39.
- FAOSTAT 2013. In.
- Ferguson DM and Warner RD 2008. Have we underestimated the impact of pre-slaughter stress on meat quality in ruminants? *Meat Sci* 80, 12-19.
- Fraterman S, Zeiger U, Khurana TS, Wilm M and Rubinstein NA 2007. Quantitative proteomics profiling of sarcomere associated proteins in limb and extraocular muscle allotypes. *Mol Cell Proteomics* 6, 728-737.
- Garcia-Macia M, Sierra V, Palanca A, Vega-Naredo I, de Gonzalo-Calvo D, Rodriguez-Gonzalez S, Oliván M and Coto-Montes A 2014. Autophagy during beef aging. *Autophagy* 10, 137-143.
- Gardner GE and Thompson JM 2003. Muscle glycogen repletion in 3 breeds of young cattle is not affected by energy intake. *Asia Pac J Clin Nutr* 12 Suppl, S38.
- Geay Y, Bauchart D, Hocquette JF and Culioli J 2001. Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in

ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. *Reprod Nutr Dev* 41, 1-26.

Gispert M, Faucitano L, Oliver MA, Guardia MD, Coll C, Siggens K, Harvey K and Diestre A 2000. A survey of pre-slaughter conditions, halothane gene frequency, and carcass and meat quality in five Spanish pig commercial abattoirs. *Meat Sci* 55, 97-106.

Green DR 2005. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* 121, 671-674.

Gregory NG 2003. *Animal welfare and meat science*. CABI Publishing, USA.

Grune T, Reinheckel T and Davies KJ 1997. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J* 11, 526-534.

Hambrecht E, Eissen JJ, Newman DJ, Smits CH, Verstege MW and den Hartog LA 2005. Preslaughter handling effects on pork quality and glycolytic potential in two muscles differing in fiber type composition. *J Anim Sci* 83, 900-907.

Hemsworth PH and Barnett JL 2001. *The biology of animal stress*. CABI Publishing, Oxon, Reino Unido.

Hengartner MO 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.

Hoffman DE, Spire MF, Schwenke JR and Unruh JA 1998. Effect of source of cattle and distance transported to a commercial slaughter facility on carcass bruises in mature beef cows. *J Am Vet Med Assoc* 212, 668-672.

Hollung K, Grove H, Faergestad EM, Sidhu MS and Berg P 2009. Comparison of muscle proteome profiles in pure breeds of Norwegian Landrace and Duroc at three different ages. *Meat Sci* 81, 487-492.

Huff-Lonergan E and Lonergan SM 1999. *Quality attributes of muscle foods.*, New York.

Huff-Lonergan E, Parrish FC and Robson RM 1995. Effects of postmortem aging time, animal age, and sex on degradation of titin and nebulin in bovine longissimus muscle. *J Anim Sci* 73, 1064-1073.

- Huff-Lonergan E, Mitsuhashi T, Parrish FC and Robson RM 1996. Sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis and western blotting comparisons of purified myofibrils and whole muscle preparations for evaluating titin and nebulin in postmortem bovine muscle. *J Anim Sci* 74.
- Huff Lonergan E, Zhang W and Lonergan SM 2010. Biochemistry of postmortem muscle - lessons on mechanisms of meat tenderization. *Meat Sci* 86, 184-195.
- Immonen K and Puolanne E 2000. Variation of residual glycogen-glucose concentration at ultimate pH values below 5.75. *Meat Sci* 55, 279-283.
- Kang R, Zeh HJ, Lotze MT and Tang D 2011. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ* 18, 571-580.
- Kaushik S and Cuervo AM 2006. Autophagy as a cell-repair mechanism: activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Mol Aspects Med* 27, 444-454.
- King DA, Schuehle Pfeiffer CE, Randel RD, Welsh TH, Jr., Oliphint RA, Baird BE, Curley KO, Jr., Vann RC, Hale DS and Savell JW 2006. Influence of animal temperament and stress responsiveness on the carcass quality and beef tenderness of feedlot cattle. *Meat Sci* 74, 546-556.
- Kreikemeier KK, Unruh JA and Eck TP 1998. Factors affecting the occurrence of dark-cutting beef and selected carcass traits in finished beef cattle. *J Anim Sci* 76, 388-395.
- Lametsch R, Roepstorff P and Bendixen E 2002. Identification of protein degradation during post-mortem storage of pig meat. *J Agric Food Chem* 50, 5508-5512.
- Lametsch R, Roepstorff P, Moller HS and Bendixen E 2004. Identification of myofibrillar substrates for mu-calpain. *Meat Sci* 68, 515-521.
- Lardone PJ, Alvarez-Garcia O, Carrillo-Vico A, Vega-Naredo I, Caballero B, Guerrero JM and Coto-Montes A 2006. Inverse correlation between endogenous

- melatonin levels and oxidative damage in some tissues of SAM P8 mice. *J Pineal Res* 40, 153-157.
- Lawrence RA and Burk RF 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 71, 952-958.
- Levine B and Klionsky DJ 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6, 463-477.
- Levine RL and Stadtman ER 2001. Oxidative modification of proteins during aging. *Exp Gerontol* 36, 1495-1502.
- Li Q, Zhang M, Chen YJ, Wang YJ, Huang F and Liu J 2011. Oxidative damage and HSP70 expression in masseter muscle induced by psychological stress in rats. *Physiol Behav* 104, 365-372.
- Li Y, Zheng Y, Qian J, Chen X, Shen Z, Tao L, Li H, Qin H, Li M and Shen H 2012. Preventive effects of zinc against psychological stress-induced iron dyshomeostasis, erythropoiesis inhibition, and oxidative stress status in rats. *Biol Trace Elem Res* 147, 285-291.
- Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H and Levine B 1999. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 402, 672-676.
- Loschen G, Azzi A, Richter C and Flohe L 1974. Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett* 42, 68-72.
- Lubinsky S and Bewley GC 1979. Genetics of Catalase in *DROSOPHILA MELANOGASTER*: Rates of Synthesis and Degradation of the Enzyme in Flies Aneuploid and Euploid for the Structural Gene. *Genetics* 91, 723-742.
- Mach N, Bach A, Velarde A and Devant M 2008. Association between animal, transportation, slaughterhouse practices, and meat pH in beef. *Meat Sci* 78, 232-238.
- Majno G and Joris I 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146, 3-15.

- Manteca X 1998. Bienestar animal. In XIX Symposium ANAPORC. EXPOAVIGA. 265-272.
- Marino R, Albenzio M, Girolami A, Muscio A, Sevi A and Braghieri A 2006. Effect of forage to concentrate ratio on growth performance, and on carcass and meat quality of Podolian young bulls. *Meat Sci* 72, 415-424.
- Martin JP, Jr., Dailey M and Sugarman E 1987. Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autoxidation. *Arch Biochem Biophys* 255, 329-336.
- Massey AC, Kaushik S, Sovak G, Kiffin R and Cuervo AM 2006. Consequences of the selective blockage of chaperone-mediated autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5805-5810.
- Melody JL, Lonergan SM, Rowe LJ, Huiatt TW, Mayes MS and Huff-Lonergan E 2004. Early post-mortem biochemical factors influence tenderness and water-holding capacity of three porcine muscles. *J Anim Sci* 82, 1195-1205.
- Mounier L, Dubroeuq H, Andanson S and Veissier I 2006. Variations in meat pH of beef bulls in relation to conditions of transfer to slaughter and previous history of the animals. *J Anim Sci* 84, 1567-1576.
- Napolitano F, Carlucci A, Braghieri A, Cifuni GF, Riviezzi AM, Monteleone E and Girolami A 2001. Influenza della lunghezza del periodo di frollatura su alcune caratteristiche sensoriali della carne di vitelloni Podolici. *Zootec. Nutr. Anim.* 27, 85-89.
- Nockels CF, Odde KG and Craig AM 1996. Vitamin E supplementation and stress affect tissue alpha-tocopherol content of beef heifers. *J Anim Sci* 74, 672-677.
- O'Brien PJ 1995. The causative mutation for porcine stress syndrome. *Food Animal*, 257-269.
- Olson DG and Parrish FC 1977. Relationship of myofibril fragmentation index to measures of beefsteak tenderness. *J Food Sci* 42, 506-509.

- Ouali A 1992. Proteolytic and physicochemical mechanisms involved in meat texture development. *Biochimie* 74, 251-265.
- Ouali A, Herrera-Mendez CH, Coulis G, Becila S, Boudjellal A, Aubry L and Sentandreu MA 2006. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Sci* 74, 44-58.
- Paniagua R, Nistal M, Sesma P, Álvarez-Uría M and Fraile B 1996. *Biología de la células y tejidos animales y vegetales.*, Madrid, España.
- Pierrefiche G and Laborit H 1995. Oxygen free radicals, melatonin, and aging. *Exp Gerontol* 30, 213-227.
- Pinho RA, Andrades ME, Oliveira MR, Pirola AC, Zago MS, Silveira PC, Dal-Pizzol F and Moreira JC 2006. Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell Biol Int* 30, 848-853.
- Prändl O, Fischer A, Schmidhofer T and Sinell HJ 1994. *Tecnología e higiene de la carne.* Acribia, España.
- Reiner G 1993. A new physiological pathway controlling muscle growth and its potencial relevance for pig production. *Pig News and Information*. 14, 123-125.
- Renerre M, Poncet K, Mercier Y, Gatellier P and Metro B 1999. Influence of dietary fat and vitamin E on antioxidant status of muscles of turkey. *J Agric Food Chem* 47, 237-244.
- Riediger S, Behrends A, Croll B, Vega-Naredo I, Hanig N, Poeggeler B, Boker J, Grube S, Gipp J, Coto-Montes A, Haldar C and Hardeland R 2007. Toxicity of the quinalphos metabolite 2-hydroxyquinoxaline: growth inhibition, induction of oxidative stress, and genotoxicity in test organisms. *Environ Toxicol* 22, 33-43.
- Robson RM 1989. Intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol* 1, 36-43.
- Robson RM, Huff-Lonergan E, Parrish FC, Ho CT, Stromer MH, Huiatt TW, Bellin RM and Sernett SW 1995. Postmortem changes in the myofibrillar and

other cytoskeletal proteins in muscle. In 50th Annual Reciprocal Meat Conference, pp. 43-52. Ames, Iowa, USA.

Rosenvold K and Andersen HJ 2003. Factors of significance for pork quality-a review. *Meat Sci* 64, 219-237.

Ross MH and Pawlina W 2007. *Texto y atlas color con Biología Celular y Molecular*.

Rowe LJ, Maddock KR, Lonergan SM and Huff-Lonergan E 2004a. Influence of early postmortem protein oxidation on beef quality. *J Anim Sci* 82, 785-793.

Rowe LJ, Maddock KR, Lonergan SM and Huff-Lonergan E 2004b. Oxidative environments decrease tenderization of beef steaks through inactivation of I-calpain. *J Anim Sci* 82.

Rubinsztein DC, Cuervo AM, Ravikumar B, Sarkar S, Korolchuk V, Kaushik S and Klionsky DJ 2009. In search of an "autophagometer". *Autophagy* 5, 585-589.

Sayre LM, Smith MA and Perry G 2001. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Curr Med Chem* 8, 721-738.

Schaefer AL, Jones SD and Stanley RW 1997. The use of electrolyte solutions for reducing transport stress. *J Anim Sci* 75, 258-265.

Scherz-Shouval R and Elazar Z 2011. Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends Biochem Sci* 36, 30-38.

Schiavone S, Jaquet V, Trabace L and Krause KH 2013. Severe life stress and oxidative stress in the brain: from animal models to human pathology. *Antioxid Redox Signal* 18, 1475-1490.

Selye H 1956. *The stress of life*. McGraw-Hill.

Sentandreu MA, Coulis G and Ouali A 2002. Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends in Food Science and Technology* 13(12), 400-421.

- Shackelford SD, Koohmaraie M, Wheeler TL, Cundiff LV and Dikeman ME 1994. Effect of biological type of cattle on the incidence of the dark, firm, and dry condition in the longissimus muscle. *J Anim Sci* 72, 337-343.
- Silva JA, Patarata L and Martins C 1999. Influence of ultimate pH on bovine meat tenderness during ageing. *Meat Sci* 52, 453-459.
- Skop V, Cahova M, Papackova Z, Palenickova E, Dankova H, Baranowski M, Zabielski P, Zdychova J, Zidkova J and Kazdova L 2012. Autophagy-lysosomal pathway is involved in lipid degradation in rat liver. *Physiol Res* 61, 287-297.
- Smith RF and Dobson H 1990. Effect of preslaughter experience on behaviour, plasma cortisol and muscle pH in farmed red deer. *Vet Rec* 126, 155-158.
- Sonna LA, Fujita J, Gaffin SL and Lilly CM 2002. Invited review: Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *J Appl Physiol* (1985) 92, 1725-1742.
- Stadtman ER, Starke-Reed PE, Oliver CN, Carney JM and Floyd RA 1992. Protein modification in aging. *EXS* 62, 64-72.
- Stoier S, Aaslyng MD, Olsen EV and Henckel P 2001. The effect of stress during lairage and stunning on muscle metabolism and drip loss in Danish pork. *Meat Sci* 59, 127-131.
- Tanida I, Ueno T and Kominami E 2008. LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol* 445, 77-88.
- Terlouw C 2005. Stress reactions at slaughter and meat quality in pigs: genetic background and prior experience. A brief review of recent findings. *Livestock Production Science* 94, 125–135.
- Tews DS 2005. Muscle-fiber apoptosis in neuromuscular diseases. *Muscle Nerve* 32, 443-458.

- Tomas-Zapico C, Caballero B, Sierra V, Vega-Naredo I, Alvarez-Garcia O, Tolivia D, Rodriguez-Colunga MJ and Coto-Montes A 2005. Survival mechanisms in a physiological oxidative stress model. *FASEB J* 19, 2066-2068.
- Touraille T and Girard JP 1985. *Bull. Tech. C. R. Z. V. INRA, Theix.*
- Trefan L, Bungler L, Bloom-Hansen J, Rooke JA, Salmi B, Larzul C, Terlouw C and Doeschl-Wilson A 2011. Meta-analysis of the effects of dietary vitamin E supplementation on alpha-tocopherol concentration and lipid oxidation in pork. *Meat Sci* 87, 305-314.
- Turrens JF 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552, 335-344.
- Uchida K 2000. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med* 28, 1685-1696.
- Vega-Naredo I, Poeggeler B, Sierra-Sanchez V, Caballero B, Tomas-Zapico C, Alvarez-Garcia O, Tolivia D, Rodriguez-Colunga MJ and Coto-Montes A 2005. Melatonin neutralizes neurotoxicity induced by quinolinic acid in brain tissue culture. *J Pineal Res* 39, 266-275.
- Viljoen HF, de Kock HL and Webb EC 2002. Consumer acceptability of dark, firm and dry (DFD) and normal pH beef steaks. *Meat Sci* 61, 181-185.
- Warner RD, Bond JJ and Kerr MG 2000. Meat quality traits in lamb M. Longissimus thoracis et lumborum: The effect of pre-slaughter stress and electrical stimulation. In 46th International congress of meat science and technology., pp. 154–155. Buenos Aires, Argentina.
- Warner RD, Ferguson DM, McDonagh MB, Channon HA, Cottrell JJ and Dunshea FR 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* 45, 553-560.
- Warriss PD 2003. Optimal lairage times and conditions for slaughter pigs: a review. *Vet Rec* 153, 170-176.

- Weaver AD, Bowker BC and Gerrard DE 2009. Sarcomere length influences μ -calpain-mediated proteolysis of bovine myofibrils. *J Anim Sci* 87, 2096-2103.
- Weaver AD, Jouault L, Bowker BC, Grant AL and Gerrard DE 2007. Sarcomeric thick and thin filament overlap influences postmortem proteolysis. *J Anim Sci* 85, 81-91.
- Webb AJ 1996. Future challenges in pig genetics. *Pig News and Information*. 17, 11-16.
- Wulf DM, Emmett RS, Leheska JM and Moeller SJ 2002. Relationships among glycolytic potential, dark cutting (dark, firm, and dry) beef, and cooked beef palatability. *J Anim Sci* 80, 1895-1903.
- Yen WL and Klionsky DJ 2008. How to live long and prosper: autophagy, mitochondria, and aging. *Physiology (Bethesda)* 23, 248-262.
- Yen WL, Shintani T, Nair U, Cao Y, Richardson BC, Li Z, Hughson FM, Baba M and Klionsky DJ 2010. The conserved oligomeric Golgi complex is involved in double-membrane vesicle formation during autophagy. *J Cell Biol* 188, 101-114.
- Young JF, Bertram HC and Oksbjerg N 2009. Rest before slaughter ameliorates pre-slaughter stress-induced increased drip loss but not stress-induced increase in the toughness of pork. *Meat Sci* 83, 634-641.
- Zeece MG, Robson RM, Lusby ML and Parrish FC 1986. Effect of calcium activated protease (CAF) on bovine myofibrils under different conditions of pH and temperature. *J Food Sci* 51, 797-803.
- Zhang WG, Lonergan SM, Gardner MA and Huff-Lonergan E 2006. Contribution of postmortem changes of integrin, desmin and μ -calpain to variation in water holding capacity of pork. *Meat Sci* 74, 578-585.

