

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**“EFECTO DE LA MUTACIÓN EN EL
GEN HALOTANO SOBRE LOS
INDUCTORES DE CONTRACCIÓN
MUSCULAR A LO LARGO DE LA
TENDERIZACIÓN TEMPRANA. PAPEL
DEL GÉNERO”**

**TRABAJO FIN DE MASTER
POR
ZULEMA PÉREZ MARTÍNEZ**

JULIO, 2015



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, dar las gracias a mis tutoras, la Dra. Ana Coto-Montes por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por todas las cosas que me has enseñado, por todos los ánimos recibidos durante este proyecto. A Mamén por estar dispuesta ayudarme, por toda la información que me has proporcionado y porque siempre has estado dispuesta a enseñarme.

Al Dr. Jose Antonio Boga Riveiro, por todo lo que me has enseñado en el laboratorio, tanto de biología molecular como de la limpieza y orden, por todos tus consejos, por haber confiado en mí en que sacaría este proyecto adelante y porque siempre recordare las palabras que siempre me dices “tranquila, al final siempre sale”.

A mis compañeros de laboratorio Su, Bea, Yaiza, Fer, Adri y a Esther por haberme acogido tan bien y por todos los buenos ratos que hemos pasado. A Su por enseñarme los primeros días, a Bea porque siempre estas dispuesta ayudarme; a Yaiza por haberme ayudado tantas veces y por nuestra música que aunque estos piensen que no mola, mola y mucho jajaj, a Fer por todas las risas y porque siempre me ayudaste en todo, a Adri mi maestro jedy de los western, porque me has enseñado muchísimo, porque me has ayudado y animado siempre. A Esther muchas gracias por los ánimos que me has dado, y por esos desayunos geniales. Y por supuesto a Toli, porque eres la mejor, porque que haríamos sin ti en el laboratorio.

También quiero dar las gracias a los doctores Ignacio Vega-Naredo y a la doctora Beatriz Caballero por sus consejos y porque siempre estáis dispuesto ayudar.

A mis “incomprendidos” por todos los momentos vividos, los infinitos cafés, las innumerables veces de ¡a mí no me dio tiempo a terminarlo hoy!, ¡voy pilladísimo de tiempo!...por todos los ánimos que me habéis dado y porque con mejores personas no me habría encontrado.

También dar las gracias a los coordinadores y profesores del Máster en Biotecnología Alimentaria de la Universidad de Oviedo por todo lo que nos habéis enseñado este año.

Por último, y no por ello menos importante a mi familia que sin vuestro apoyo incondicional no hubiera podido llegar a conseguir mis metas. A mis padres por vuestra ayudada, confianza y por todo, muchísimas gracias. A mis abuelos donde quiera que estéis espero que estéis orgullosos de mí, a mis amigos, y a mi novio por las infinitas veces que me has dicho “tu puedes”.

Simplemente gracias a todos.

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
LISTA DE FIGURAS	4
LISTA DE TABLAS	6
1. INTRODUCCIÓN.....	8
2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y/O EXPERIMENTALES.	13
2.1 EL CERDO.....	13
2.2 TRANSFORMACIÓN DEL MÚSCULO EN CARNE	15
2.2.1 MECANISMOS QUE PARTICIPAN EN LA TRANSFORMACION DEL MÚSCULO EN CARNE	18
2.3 LA CONTRACCION MUSCULAR. SUS ELEMENTOS CLAVES.....	20
2.4 CALIDAD DE LA CARNE.....	23
2.4.1 PARÁMETROS INDICATIVOS DE CALIDAD.....	24
2.4.2 LOS FACTORES QUE AFECTAN A LA CALIDAD DE LA CARNE	25
3. MATERIALES UTILIZADOS	28
3.1 INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS QUÍMICOS EMPLEADOS	28
3.1.1 INSTRUMENTACIÓN.....	28
3.1.2. REACTIVOS Y MATERIALES.....	29
3.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	30
3.3 DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS	30
3.3.1 CUANTIFICACIÓN PROTEICA	30
3.3.2 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL (AAT).....	31
3.3.3 LIPOPEROXIDACIÓN (LPO).....	31
3.3.4 WESTERN BLOT	31
3.4 CUANTIFICACION DE LA EXPRESION GÉNICA	32
3.4.1 EXTRACCIÓN DE ARN.....	32
3.4.2 SÍNTESIS DE CDNA	33
3.4.3 MEDIDA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL (QPCR).....	33
3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	35
4. RESULTADOS.....	37
4.1 ESTRÉS OXIDATIVO.....	37
4.2CONTRACCIÓN MUSCULAR.....	41
4.3 MIOSTATINA VS. MYOD.....	46
5. DISCUSIÓN.....	51
6. CONCLUSIONES.....	58
7. BIBLIOGRAFÍA.....	63

RESUMEN Y ABSTRACT

RESUMEN

La carne de cerdo es uno de los alimentos más consumidos. Para ello es necesario asegurar que la carne tiene una buena calidad y que el animal haya mantenido un bienestar adecuado.

Para la realización de este proyecto se usaron 24 cerdos [(Large White x Landrace) x Pietrain], que fueron divididos en machos normales, machos portadores del gen halotano, hembras normales y hembras portadoras del gen halotano (6cerdos/grupo). Se criaron en una granja experimental donde fueron destetados a los 28 días, en condiciones de luz natural y una temperatura de 20°C. Durante el engorde comieron pienso comercial ad-libitum con un libre acceso a agua.

La transformación del músculo en carne es un proceso complicado. Al sector cárnico le preocupa la repercusión de dicho proceso en la calidad de la carne. Existe la posibilidad de que el estrés psicológico afecte a la calidad y su evolución *post-mortem*. El objetivo global de este proyecto es el estudio del papel de la mutación en el gen halotano o gen de estrés en ambos géneros, a lo largo de la tenderización temprana. Para ello se ha estudiado la lipoperoxidación (LPO), la actividad antioxidante total (AAT), la expresión génica de la contracción muscular (RyR, Calstabin, Serca) y los marcadores de diferenciación muscular (Miostatina y MyoD) para la predicción precoz de la calidad de la carne.

ABSTRACT

Pork is one of the most consumed foods. This requires ensuring that meat has a good quality and that the animal has maintained a good welfare.

To carry out this project 24 pigs have been used [(Large White x Landrace) x Pietrain], which were divided into normal males, males carrying the halothane gene, normal females and female carriers of the halothane gene (6 pigs / group). They were raised in an experimental farm where they were weaned at 28 days, in daylight conditions and a temperature of 20 ° C. While fattening, they ate commercial feed ad libitum with free access to water.

The transformation of muscle in meat is a complicated course. The meat sector is concerned about the impact of this process on the quality of meat. It is possible that psychological stress affects the quality and post-mortem evolution. The overall objective of this project is to study the role of mutation in the gene halothane or stress gene in both genders, along the early tenderizing.

So we've studied lipid peroxidation LPO, total antioxidant activity AAT gene expression in muscle contraction (RyR, Calstabin, Serca) and markers of muscle differentiation (myostatin and MyoD) for early prediction of meat quality.

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cerdo de raza Large White (Imagen obtenida de: www.aacporcinos.com)..	14
Figura 2: Cerdo de raza Landrace (Imagen obtenida de: cerdossusscrofa.blogspot.com).	14
Figura 3: Cerdo de raza Pietrain.(Imagen obtenida de: www.sabor-artsano.com)	15
Figura 4: Estructura muscular. (Imagen obtenida de: dataeca.unad.edu.co).....	16
Figura 5: Estructura del tejido muscular (Imagen obtenida de: datateca.unad.edu.co).	17
Figura 6: El retículo sarcoplásmico y sus principales componentes.....	22
Figura 7: Interconversiónredox de los pigmentos de la carne (Sierra V, 2010 Tesis Doctoral).....	25
Figura 8: Western Blot (Imagen tomada de BIORAD).....	32
Figura 9: Perfil térmico utilizado para la amplificación de los ARN de interés y el cálculo de la Tm del amplicón.....	34
Figura 10: Efecto del tiempo post-mortem sobre la lipoperoxidación ($\mu\text{mol MDA} + 4\text{-HNE} / \text{mg proteína}$) en machos medida en diferentes genotipos (libre y portador).	38
Figura 11: Efecto del tiempo post-mortem sobre la lipoperoxidación ($\mu\text{mol MDA} + 4\text{-HNE} / \text{mg proteína}$) en hembras medida en diferentes genotipos (libre y portadora).	39
Figura 12: Efecto del tiempo post-mortem sobre la AAT($\text{mg Trolox} / \text{mg proteína}$) en machos medida en diferentes genotipos (libre y portador).....	40
Figura 13: Efecto del tiempo <i>post-mortem</i> sobre la AAT($\text{mg Trolox} / \text{mg proteína}$) en hembras medida en diferentes genotipos (libre y portadora)..	41
Figura 14: Efecto del tiempo <i>post-mortem</i> sobre la AAT($\text{mg Trolox} / \text{mg proteína}$) en hembras medida en diferentes genotipos (libre y portadora).	41
Figura 15: Efecto del tiempo post-mortem mediante la expresión relativa del ARNm con el cebador RyR en machos medida en diferentes genotipos (libre y portador).	42

Figura 16: Efecto del tiempo post-mortem mediante la expresión relativa del ARNm con el cebador RyR en hembras medida en diferentes genotipos (libre y portador).....	43
Figura 17: Efecto del tiempo post-mortem mediante la expresión relativa del ARNm con el cebador Calstabín en machos medida en diferentes genotipos (libre y portador).	44
Figura 18: Efecto del tiempo post-mortem mediante la expresión relativa del ARNm con el cebador Calstabín en hembras medida en diferentes genotipos (libre y portador).	44
Figura 19: Efecto del tiempo post-mortem mediante la expresión relativa del ARNm con el cebador Serca en machos medida en diferentes genotipos (libre y portador).....	45
Figura 20: Efecto del tiempo post-mortem mediante la expresión relativa del ARNm con el cebador Serca en hembras medida en diferentes genotipos (libre y portador). ...	45
Figura 21: Análisis WB representativo de las pruebas realización con Miostatina (52kDa) y Myo D (45kDa). M: machos; H: hembras.....	47
Figura 22: Densitometría de los WB Miostatina (hembras) normalizados con Ponceau para los dos grupos experimentales (unidades arbitrarias).	48
Figura 23: Densitometría de los WB MyoD (machos) normalizados con Ponceau para los dos grupos experimentales (unidades arbitrarias).	49
Figura 24: Densitometría de los WB MyoD (hembras) normalizados con Ponceau para los dos grupos experimentales (unidades arbitrarias).	50

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Cebadores utilizados para cuantificar la expresión de los genes de interés.....	34.
Tabla 2: Efecto del sexo sobre el genotipo (libre y portador) sobre los biomarcadores de contracción muscular(RyR, Calstabin y Serca (expresión relativa de ARNm)) medidos en el músculo LD.....	46.
Tabla 3: Efecto del sexo sobre el genotipo (libre y portador) sobre los biomarcadores de diferenciación muscular(Miostatina y MyoD (unidades arbitrarias D.O.)) medidos en el músculo LD.....	51.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La carne de cerdo es, actualmente, la más consumida del mundo, representando en el año 2011, más del 37% de la producción total a nivel mundial (FAOSTAT 2013). Esto le convierte en uno de los campos de estudio más importantes en la industria alimentaria en general y en la cárnica en particular desde muy distintos puntos de vista. Por un lado, los ganaderos y las industrias cárnicas demandan la obtención de un producto de calidad, de amplia aceptación por parte del consumidor y con pocos costes de manejo. Por otro, la sociedad exige, también, un producto de calidad pero manteniendo el bienestar animal dentro de unos márgenes satisfactorios. En ocasiones, ambos puntos de vista son contradictorios, debiendo los investigadores tratar de seguir las peticiones de unos, sin por ello olvidar las exigencias de otros.

Así, el bienestar animal ha sido clásicamente una de las preocupaciones más importantes a las que se han enfrentado los investigadores del sector alimentario. En la Unión Europea (UE), existe una larga tradición en la lucha por salvaguardar el bienestar animal y la legislación en este sentido se remonta al siglo XIX en el que ya se comenzaron a imponer leyes que favoreciesen un trato lo más “humano” posible de los animales destinados a la industria cárnica (recogido en Amsterdam, 1997).

Sin embargo, todos los animales destinados a que su carne sea comercializada están en la actualidad expuestos a multitud de fenómenos susceptibles de causar estrés en el animal, desde la recogida de las reses, su traslado a los mataderos en viajes más o menos largos, con cabañas desconocidas y ante diferentes condiciones meteorológicas y, por último, el sacrificio en el matadero. Todos estos procesos producen estrés psicológico o emocional en el animal de una intensidad desconocida hasta la fecha, ya que la investigación cárnica carece de información sobre posibles marcadores de dicho estrés emocional que nos permitan estudiar mecanismos para reducirlo. Sin embargo, la relación entre estrés emocional y calidad final de la carne ha sido establecida firmemente.

Por otro lado, el sector cárnico está demandando, en la actualidad, productos que presenten características saludables y nutritivas. Desgraciadamente, durante años la carne de cerdo ha sido considerada como un alimento pesado, una carne con grasa, con un elevado contenido en calorías y un alimento asociado a enfermedades y parásitos (Eusse Gómez). En su defensa pesan mucho sus características particulares como su corto ciclo reproductivo, el gran número de crías que se obtienen por camada, su precocidad en la

reproducción y su gran capacidad transformadora de nutrientes, lo que le convierten en una fuente de alimentación importante (Klug, 2013).

Afortunadamente, estudios recientes han permitido establecer que el bienestar animal esta enlazado con la calidad final de la canal (Klauke *et al.* 2013), por lo que ambos campos de estudios tienen, a partir de ese momento, un objetivo común: disminuir el estrés emocional del animal.

Este estrés se hace especialmente importante en el caso del cerdo, animal extremadamente inteligente y sensible en el que condiciones adversas disparan tan altos niveles de estrés que provocan la mortalidad de un porcentaje importante de sus individuos (hasta el 20% de los animales que se trasladan al matadero pueden morir durante el trayecto si las condiciones se vuelven adversas). Este hecho afecta simultáneamente a los ganaderos, por las altas pérdidas económicas que estas muertes representan y a los defensores del bienestar animal que evidencian unas condiciones inadecuadas de manejo.

La enfermedad causante de tan alta mortalidad es el Síndrome de estrés porcino (PSE) o Hipertermia Maligna (MH). Es esta una enfermedad hereditaria monogénica recesiva con carácter de desorden neuromuscular, con un locus autosomal único, denominado gen halotano, ya que se descubrió que los portadores de dicha mutación fallecían al ser anestesiados con este gas, y que actualmente se sabe que corresponde al gen que codifica el receptor de la ryanodina “RyR ” (O’Brien, 1993). El síndrome estrés porcino se caracteriza por causar la muerte súbita en homocigotos recesivos, así como la aparición, en el caso específico de cerdos, de canales con carne pálida, blanda y exudativa (PSE) o, en ocasiones carne oscura, dura y seca (DFD), con menor frecuencia (Klug 2013).

Esta enfermedad se ve agravada por el hecho de que el cerdo posee una bajísima densidad de glándulas sudoríparas, por lo que apenas disipa el calor por la sudoración. Por lo que la hipertermia, inducida por el estrés psicológico que sufre el animal se convierte en un peligro mortal, causando mal funcionamiento en la síntesis de proteínas, en el metabolismo, en la proliferación celular y en las funciones celulares (Sonna *et al.* 2002). En último término, esto acaba provocando la muerte del animal.

Al mismo tiempo existen claras evidencias de que existe una relación entre el estrés psicológico que sufre el animal y el estrés oxidativo que este induce (Rubio-Gonzalez *et al.*,2015).

La elevación en la actividad de los animales sometidos al estrés, demanda una mayor producción de ATP, lo que deriva en un mayor gasto de O₂ en la mitocondria que conlleva, subsecuentemente, una mayor producción de radicales libres.

Recordamos brevemente, que la cadena de transporte de electrones de la mitocondria utiliza el O₂ en estado molecular como el último aceptor de electrones en la fosforilación oxidativa que tiene lugar en la membrana interna de la mitocondria para la síntesis de ATP. De su imperfecta reducción se generarán radicales libres, fundamentalmente las especies reactivas de O₂ (EROs).

Estas moléculas reactivas son radicales libres, inestables debido a que tienen en su órbita más externa uno o más electrones desapareados, que reaccionan con moléculas originando daños y modificaciones irreversibles.

Un sistema esencial e indispensable para el mantenimiento de la homeostasis celular, que previene y retarda la oxidación de otras moléculas es el denominado sistema antioxidante (Kregel y Zhang, 2007), el cual permite la eliminación de especies reactivas de O₂ y nitrógeno (EROs).

Cuando nos encontramos en una situación normal existe un equilibrio entre las moléculas antioxidantes y los radicales libres, que recibe el nombre de balance oxidativo. El problema ocurre cuando este balance oxidativo se ve alterado por incremento en los radicales libres, lo que se conoce como estrés oxidativo (Pierrefiche y Laborit, 1995), que desencadenan daños en los principales componentes celulares, como las proteínas, lípidos y ADN y, en último término, dan lugar al denominado daño oxidativo que puede inducir finalmente la muerte celular.

En base a ello, cuando el estrés psicológico se produce, la elevación abrupta de especies reactivas del oxígeno por encima de los niveles normales, provoca la activación del receptor de la rianodina, provocando de esta manera la relajación de los canales liberadores de calcio del retículo sarcoplásmico, al citoplasma de la célula muscular y aumentando así los niveles de calcio en el músculo (Prosser *et al.* 2013), que están directamente relacionados con el disparo de la contracción muscular.

Así, los animales altamente estresados o que portan la mutación en el gen halotano presentan contracciones musculares continuas, con un gasto excesivamente alto de ATP que provoca el agotamiento de las reservas, alta subida de temperatura y finalmente paro cardíaco.

Como sabemos los marcadores de diferenciación muscular son la miostatina y la MyoD, que son proteínas que actúan de manera opuesta en la diferenciación muscular.

La miostatina es una proteína que se conoce como el factor 8 de crecimiento y diferenciación que actúa limitando el crecimiento del tejido muscular, y por el contrario la MyoD es una proteína que regula la diferenciación del tejido muscular siendo unos de los marcadores más tempranos cuando se produce la miogénesis y es expresada en las células satélites activadas. Estas dos proteínas tienen funciones contrapuestas, una limita el crecimiento y la otra lo incrementa por ello es interesante su estudio.

Nuestro grupo de investigación ha demostrado en reiteradas ocasiones, el importante papel que el estrés oxidativo tiene en el desarrollo de una tenderización y posterior maduración adecuada de la carne. Este estrés oxidativo debe mantenerse en niveles muy concretos para que este proceso transcurra en condiciones idóneas, dando lugar a carnes de características organolépticas adecuadas. El efecto del estrés, tanto inducido por la mutación portada como por el sacrificio de los animales, va a afectar de forma significativa a las moléculas inductoras de la contracción muscular, alterando, por ello, los procesos de tenderización.

En base a los antecedentes del tema expuestos, nos hemos planteado para este trabajo el siguiente objetivo general:

Estudiar el papel de la mutación en el gen halotano o gen de estrés en ambos géneros, a lo largo de la tenderización temprana en moléculas esenciales para el funcionamiento muscular.

Este Objetivo General, a su vez se puede dividir en los siguientes objetivos parciales:

- Estudio del balance entre la miogénesis y la reducción de la masa muscular en función de la mutación del gen halotano y el género a lo largo de la tenderización.
- Estudio de la variación en estrés oxidativo debido a la mutación y al género en la tenderización temprana.
- Alteraciones en la transcripción a lo largo de la tenderización temprana de las moléculas claves en la contracción muscular en función de la mutación o el género.

**CONSIDERACIONES
TEÓRICAS
Y/O
EXPERIMENTALES**

2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y/O EXPERIMENTALES.

2.1 EL CERDO

El cerdo es un animal perteneciente a la clase Mammalia, cuya familia es Suidae y su nombre científico es *Scrofa domestica*. Es un animal doméstico, que se utiliza para el consumo humano sobre todo en la zona occidental.

Actualmente se encuentra distribuido por casi todo el mundo. Están adaptados a climas subtropicales y tropicales, encontrándose en países como China, Estados Unidos, México...

Su alimentación varía dependiendo de en qué situación se encuentre, puesto que en libertad, en estado salvaje es herbívoro y su mandíbula preparada para consumir vegetales. En cambio, en estado domesticado, es un animal omnívoro con una alimentación rica en carne, cereales y restos orgánicos.

Son animales de baja estatura, aunque con un cuerpo que oscila desde los 87 a los 180 centímetros, pesado y robusto, redondeado, con cabeza grande, un hocico alargado con una nariz achatada que es sensible al tacto, cola y patas cortas y una pezuña dividida en dos. Se trata de animales muy inteligentes y ágiles; con un sentido del oído y del olfato muy afinado. Tiene un periodo de gestación de aproximadamente 16 semanas y unas 10 crías por parto.

Existen múltiples razas de cerdo. Ya que para la realización de este proyecto se han usado cruces de *Large White x Landrace con Pietrain*, se describen estas brevemente a continuación.

- **Raza porcina *Large White*:** el origen de esta raza se centra en Inglaterra. La calidad de la carne mejora cuando esta raza es empleada para hacer cruces. Tiene color blanco, en ocasiones con una mancha negra. Su longitud es de media a larga, el pelo no es fuerte y la cabeza y las orejas de tamaño pequeño.

Esta raza destaca por su elevada fertilidad, el gran número de crías por camada y la buena aptitud y actitud maternal (Figura 1).

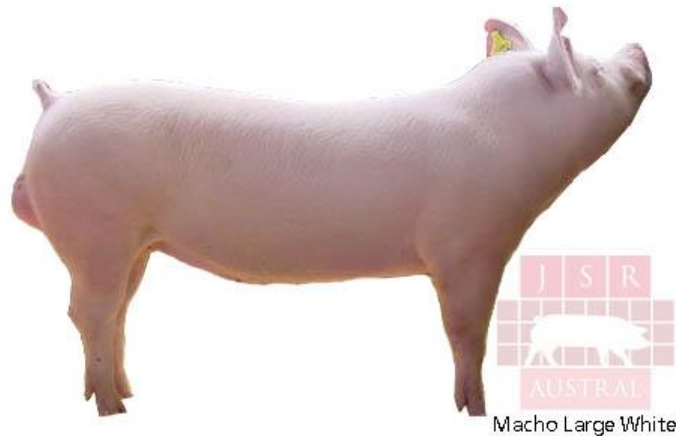


Figura 1: Cerdo de raza Large White (Imagen obtenida de: www.aacporcinos.com).

- **Raza porcina Landrace:** el origen de esta raza es de Dinamarca y es un pilar para los programas de hibridación. Es una raza muy versátil, y se utiliza como línea pura. Sus índices productivos son muy parecidos a la Yorkshire, aunque esta raza tiene un mayor rendimiento de la canal y una mayor longitud.

Es una raza blanca de buena musculatura, una alta calidad de su carne y un alto porcentaje de jamón y particularmente de tocino. Por otro lado, tienen una respuesta óptima bajo condiciones adversas (Figura 2).

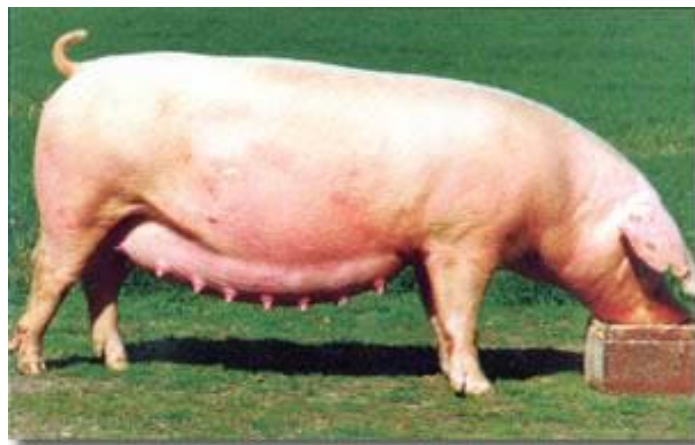


Figura 2: Cerdo de raza Landrace (Imagen obtenida de: cerdossusscrofa.blogspot.com).

A partir de estas dos razas anteriormente explicadas se obtiene un cruce de *Large White x Landrace* que da como resultado madres F1 que es la combinación perfecta gracias a la eficacia de producción, capacidad maternal, uniformidad... Este cruce tiene camadas de 14 nacidos vivos y 11.5 lechones destetados con un peso de unos 7 kilogramos, convirtiéndose así en la mejor opción para producir lechones de engorde.

- **Raza porcina *Pietrain*:** es originaria de un pueblo de Bélgica, siendo descubierta en 1950. Son cerdos con una mutación en el gen halotano, poseen un cuerpo corto, aunque con un dorso y una espalda muy musculada. Su pelo es duro y corto, con un reflejo rojizo sobre las manchas negras.

Tienen una cabeza corta, recta, cóncava y con un carrillo poco desarrollado; las orejas pequeñas dirigidas hacia adelante y con la punta ligeramente encorvada.

La virtud de esta raza es la calidad de la canal, es decir, el elevadísimo contenido magro y bajo contenido en grasa (Figura 3).



Figura 3: Cerdo de raza Pietrain. (Imagen obtenida de: www.sabor-artsano.com)

2.2 TRANSFORMACIÓN DEL MÚSCULO EN CARNE

El concepto de músculo se refiere al tejido muscular del animal *in vivo*, mientras que el resultado de una serie de transformaciones estructurales y reacciones bioquímicas que sufre el músculo tras la muerte del animal y que va a ser utilizado como producto alimenticio, es lo que se denomina carne. Aun partiendo del mismo tejido, aquellos acontecimientos que son útiles y hasta esenciales, para la obtención de un buen producto cárnico, pueden resultar dañinos en el musculo cuando este lo es tal y, por lo tanto, forma parte del animal. Este es un dato especialmente importante en este estudio.

El músculo es un tejido que ejecuta múltiples funciones mecánicas: el movimiento del cuerpo, la coordinación y mantenimiento del equilibrio. Además de estas funciones,

las células musculares permiten el mantenimiento de la temperatura corporal y la movilización tanto de la sangre como de la linfa.

Existen tres tipos de tejido muscular:

- **Tejido muscular estriado esquelético:** Lleva a cabo los movimientos denominados voluntarios. Cuenta con un gran número de sarcómeros estables que tienen la facultad de acortar o estirar dicho tejido muscular. Este tejido es estimulado mediante impulsos nerviosos procedentes del sistema nervioso.
- **Tejido muscular estriado cardíaco:** exclusivo del corazón, que permite así bombear la sangre al contraerse.
- **Tejido muscular liso:** Lleva a cabo los movimientos denominados involuntarios. Para ello, desarrolla sarcómeros de manera transitoria. Es el tejido más abundante en el cuerpo y forma parte del tracto gastrointestinal, encargado de los movimientos peristálticos, del aparato respiratorio, del aparato circulatorio...

En el trabajo que presentamos, el utilizado es el músculo estriado esquelético en el que, por lo tanto, nos centraremos. Este músculo está compuesto por un conjunto de fascículos formando así un conjunto de fibras musculares, que están rodeadas por tejido conjuntivo propio. Este tejido rodea tanto a las fibras individuales formando el endomisio, como a los fascículos componiendo el perimisio y, por último, al paquete muscular completo componiendo el epimisio (Figura 4).

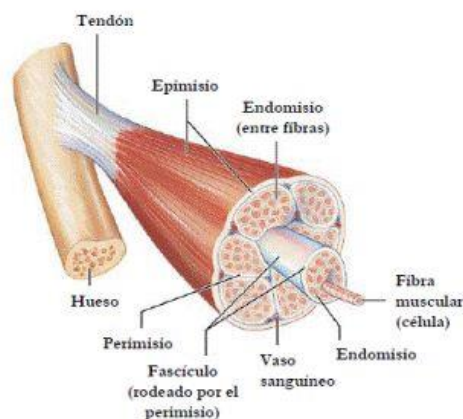


Figura 4: Estructura muscular. (Imagen obtenida de: dataeca.unad.edu.co)

La célula o fibra muscular es un sincitio multinucleado rodeado de membrana plasmática. Estas fibras están ocupadas por agrupaciones longitudinales, llamadas sarcómeros, que constituyen la maquinaria contráctil de la célula muscular. Dicho

sarcómero está formado por filamentos de miosina II, y de actina, que constituyen los elementos contráctiles.

El perfecto alineamiento que presentan los distintos sarcómeros en la fibra muscular es lo que le confiere la apariencia estriada a este músculo. Estas estriaciones aparecen alternando zonas proteicas densas, denominadas bandas A en la que coexisten los filamentos de actina y miosina, denominados estos últimos filamentos gruesos, con las zonas proteicas menos densas, filamentos finos, donde solo hay filamentos de actina, que reciben el nombre de bandas I. Tanto las bandas A como las bandas I están divididas en dos mitades por regiones estrechas de densidad contrastante, de esta manera 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 (Figura 5).

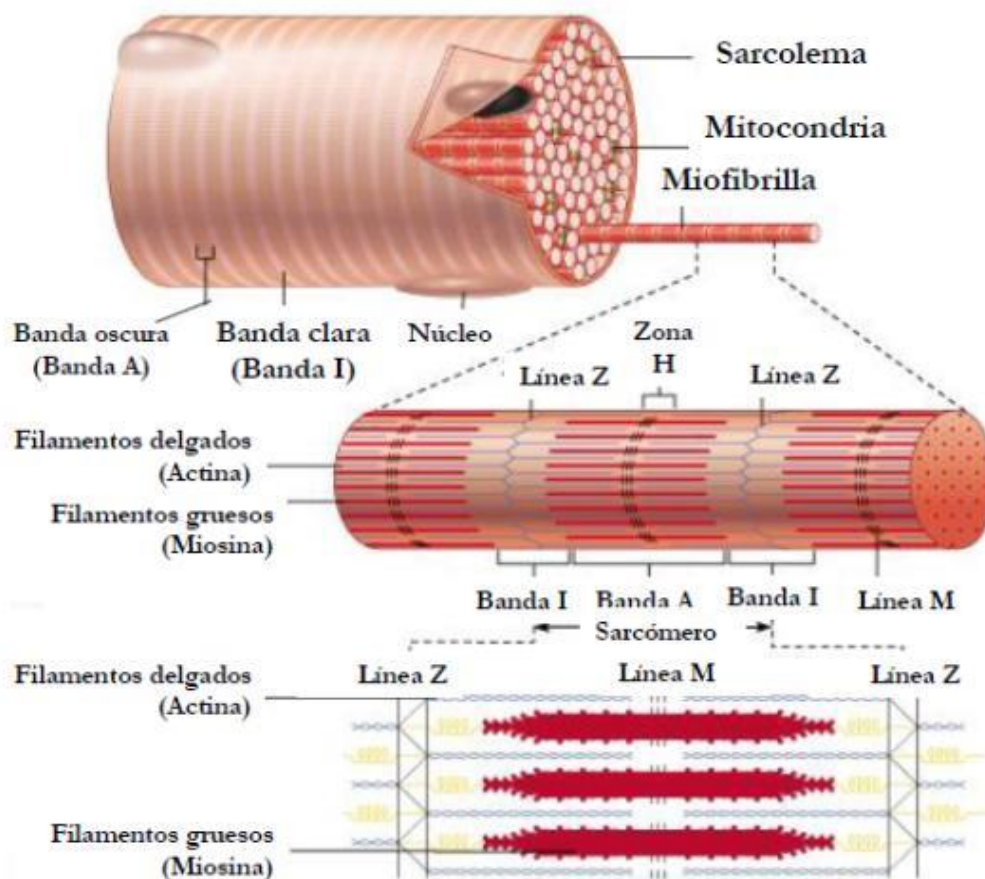


Figura 5: Estructura del tejido muscular (Imagen obtenida de: datateca.unad.edu.co).

La estructura formada entre las dos líneas Z constituye el sarcómero. Además de la actina y la miosina muchas otras proteínas participan en la contracción muscular, entre ellas fundamentalmente la troponina y la tropomiosina (Ross, 2007). El calcio sale al citoplasma de la célula muscular se une directamente a la troponina e inicia así la contracción del músculo. La Troponina es el complejo proteínico regulador de la función contráctil del músculo estriado. Consta de tres componentes: polipeptídicos distintos: troponina C, que fija el Calcio (Ca), troponina T, que liga el complejo troponina a la tropomiosina y troponina I, que es la subunidad inhibidora del complejo troponina-tropomiosina.

2.2.1 MECANISMOS QUE PARTICIPAN EN LA TRANSFORMACION DEL MÚSCULO EN CARNE

El proceso de transformación del músculo en carne está compuesto por tres fases (Sentandreu, 2002) que se inician a partir del sacrificio del animal:

- **Fase *pre-rigor*:** en esta fase el músculo permanece excitable y se correspondería con la fase de supervivencia del sistema nervioso (Chrystall, 1985).
- **Fase *rigor*:** en la que los componentes energéticos (adenosíntrifosfato (ATP), fosfocreatinina, glucosa) se agotan.
- **Fase *post-rigor*:** de maduración o tenderización de la carne en la que se produce una desestructuración de la arquitectura muscular por la actividad lisosomal sobre los elementos proteicos celulares.

Tras el sacrificio del animal, debido al desangrado, existe una potente caída en el descenso del aporte de oxígeno y nutrientes a las células musculares, lo que provoca un descenso gradual, progresiva e inevitable de la energía disponible.

En estas circunstancias, el músculo se ve obligado a utilizar las reservas de glucógeno almacenadas para sintetizar ATP a partir de glucosa, con el objetivo de mantener su temperatura e integridad estructural, produciéndose un cambio del metabolismo pasando de aerobio a anaerobio, cuya duración varía con el tiempo y que se ve alterado por las reservas mitocondriales en cada caso.

A medida que disminuyen los niveles de ATP, el fosfato inorgánico se va acumulando y 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, y continuara 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 es el que mantiene la integridad estructural del músculo, provoca una lenta despolarización de las membranas, provocándose un incremento en la fuerza iónica, en parte debido a la incapacidad de funcionamiento de las bombas de Ca^{2+} /ATP-dependiente y Na^+ - K^+ /ATP-dependiente, lo que ocasiona la salida masiva 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, según indicamos anteriormente, provocando la modificación de su configuración, desbloqueando los sitios activos de la actina a los que se unía. Al quedar libre estos sitios, las cabezas de las miosinas se unen a la cola de las actinas, dando lugar a una unión irreversible entre ambas, justo en los puntos ocupados antes por la troponina (Paniagua, 1996). De esta manera, 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 solo 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 esta etapa comienza la tenderización, propiamente dicha, que produce la mejora de la terneza de la carne como consecuencia de la rotura de la estructura miofibrilar por parte de sistemas proteolíticos endógenos que juegan un papel determinante (Weaver *et al.*, 2009); (HuffLonergan *et al.*, 2010); (Sentandreu *et al.*, 2002); (Ouali, 1992).

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 musculo en carne y de las moléculas y los mecanismos implicados en dicho proceso..

La información obtenida en varios estudios relacionados con diferentes patologías como cáncer, Alzheimer, enfermedades neuromusculares, etc.(Tews, 2005); (Hengartner, 2000); (Majno and Joris 1995) que transcurren en condiciones similares de estrés e isquemia a las que tienen lugar 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 todavía no han sido explicados, podrían verse implicados diversos mecanismos celulares de supervivencia, como la autofagia (Hollunget al 2014) y/o 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 en primera instancia tratan de salvar la célula y, en el caso en que esto no sea posible, disparan el “suicidio” o muerte de algunas de sus células, con el objetivo de asegurar la supervivencia del tejido y de evitar daños mayores. Se han descrito diferentes tipos de muerte celular:

- La muerte celular programada (MCP): de las que las más importantes son la apoptosis y la autofagia.
- La muerte celular no programada (MCNP): q incluye fundamentalmente a la necrosis aunque últimamente se están definiendo muchos tipos mixtos de muerte celular.

Su prevalencia en el tejido muscular dependerá de las condiciones de 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 ternera y calidad óptimo.

Se desconocen en la actualidad las moléculas involucradas en el disparo de uno u otro mecanismo tras el desangrado del animal, pero este paso puede ser de crucial importancia, puesto que todos los cambios posteriores que contribuyen a la transformación del músculo en carne dependerán de estos eventos tempranos. Por tanto, es muy importante el estudio del periodo *pre-rigor* y, más concretamente, de los procesos que ocurren en momentos muy tempranos tras la muerte. Ya que los elementos implicados en la contracción muscular no han sido estudiados hasta el momento desde el punto de vista de su modificación durante la tenderización y en función fundamentalmente del estrés oxidativo imperante, serán estos los elementos clave de nuestro estudio.

2.3 LA CONTRACCION MUSCULAR. SUS ELEMENTOS CLAVES

La contracción muscular es un proceso que depende de la concentración de Ca^{2+} libre en el citoplasma. En el músculo se encuentra controlada esta concentración muy delicadamente por el retículo sarcoplásmico que almacena grandes de Ca^{2+} . El retículo sarcoplásmico (RS) es un conjunto de membranas intracelulares cada segmento del retículo sarcoplásmico inicia y termina en una cisterna, que junto con la estructura membranal llamada túbulo transversa (túbulo T) conforma las llamadas triadas.

La liberación del calcio desde el retículo provoca la contracción directa del sarcomero por su unión específica a la troponina. Para que posteriormente a la contracción se produzca la relajación muscular, existe otro canal de calcio también en el retículo pero, en este caso, con función de recaptación de calcio y dependiente de ATP. La recuperación de calcio por este canal provocara la desaparición de calcio del citoplasma y, por tanto, la posterior relajación del sarcómero.

De los elementos que conforman este sistema de liberación y recaptación de calcio en la célula muscular nos ocuparemos a continuación más profundamente por ser los elementos clave de este estudio

El canal de liberación del calcio (Calcium release channel CRC)

El canal de liberación de Ca^{2+} del retículo (RyR + calstabilina) es un elemento principal del acoplamiento excitación-contracción, que controla la salida de Ca^{2+} del RS, la que activa y regula la contracción muscular (Figura 6). A su vez, la regulación de este canal durante el estrés o el ejercicio es controlada por la activación de receptores adrenérgicos- β acoplados a proteínas G, que trabajan en la activación de la adenilato ciclasa, lo que resulta una elevación de AMPc, que deriva en una activación de la proteína quinasa A (PKA). Esta, a su vez, fosforila al RyR, provocando la disociación entre la proteína de canal, RyR y su molécula reguladora, la calstabilina lo que provoca una apertura del canal de RyR. Las fosfatasa 1 y 2 (PP1 y PP2) intervienen en la desfosforilación del RyR, para hacer que la calstabilina se una nuevamente al RyR y así restablecer las propiedades de apertura del canal (Reyes-Juarez and Zarain-Herzberg 2006).

El canal liberador del calcio (CRC) puede estar codificado por tres genes distintos que se expresan en diferentes tejidos que son los siguientes:

- **RyR 1:** se expresa en el musculo esquelético y en el cerebro.
- **RyR 2:** se expresa en el corazón, endotelio y mayoritariamente en el cerebro.
- **RyR 3:** se expresa en el musculo liso epitelios y también en el cerebro. (O' Brien, P.J., 1995).

La ATPasa de Ca^{2+}

La ATPasa de Ca^{2+} del retículo conocido como SERCA, son proteínas que pertenecen a la familia de enzimas altamente conservadas, dependientes de ATP que transportan el Ca^{2+} hacia el interior del retículo.

El gen SERCA1 (ATP2A1) se expresa en el músculo esquelético de contracción rápida y que codifica un pre-ARNm que produce dos isoformas cuya expresión se regula durante el desarrollo, la SERCA1a o isoforma adulta y la SERCA1b o isoforma neonatal (Dode *et al.* 1998).

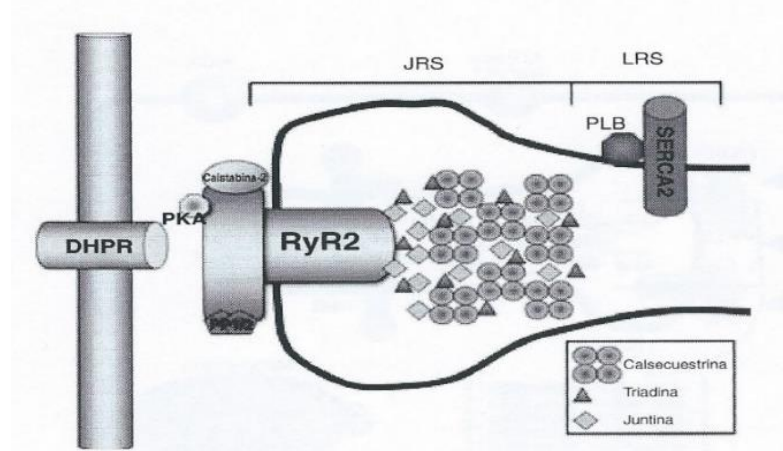


Figura 6: El retículo sarcoplásmico y sus principales componentes.

El canal de liberación de calcio (RyR), se encuentra en su conformación de homotetrámero en cercanía a los canales de calcio sensibles a voltaje (DHPR), en su superficie citoplásmica se encuentran los sitios de unión para calstabina 2, fosfatasa 1 y 2 (PP 1 y 2) y el sitio para fosforilación por proteína cinasa A (PKA), en su porción luminal el RyR se encuentra asociado a las proteínas de andamiaje triadina y juntina, que median la formación de un complejo multiproteico con la proteína calsecuestrina. En la porción longitudinal del RS se encuentra la ATPasa de Ca^{2+} del RS (SERCA), junto con la proteína reguladora fosfolamban (PLB), la cual también tiene un sitio de fosforilación por PKA. JRS, retículo sarcoplásmico de unión; LRS, retículo sarcoplásmico longitudinal. (José Luis Reyes-Juárez, Ángel Zarain-Herzberg, 2006).

En el caso de que existan fallos en la contracción, debido a mutaciones o situaciones patológicas, se puede producir una hiperfosforilación del RyR, y que provoque una apertura parcial del canal, lo que conllevarían una liberación continua de calcio, existiendo de esta manera un aumento excesivo en la concentración de Ca^{2+} del citoplasma. Otra posibilidad es que se produzcan problemas en el SERCA lo que evitaría la recaptación de calcio hacia el retículo plasmático y mantendría los excesivos niveles de calcio en el citoplasma de forma continua.

Su mutación consiste en la sustitución de una timina por una citosina en la posición 1843 de la secuencia de ADN complementario, que lleva consigo a la sustitución de una arginina por una cisteína en la posición 615 de la proteína en el músculo esquelético estriado del animal (Minkena D *et al.*, 1977).

La mutación del gen halotano o que codifica RyR, en condición homocigótica provoca la alteración en la liberación de calcio en el retículo sarcoplásmico del músculo esquelético estriado.

2.4 CALIDAD DE LA CARNE

La calidad es un término muy complejo de definir. El concepto que más se utiliza es que se 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:** es en la que no haya presente contaminación microbiana ni sustancias tóxicas.
- **Calidad nutritiva:** es la que aporta los nutrientes necesarios para satisfacer las necesidades del organismo.
- **Calidad organoléptica:** es la que ofrece durante su consumo una cierta cantidad de sensaciones satisfactorias de carácter sensorial.
- **Calidad tecnológica:** es la que hace que se mantengan las características necesarias para el desarrollo de determinados procesos de transformación en la industria y de manejo y conservación.
- **Calidad de servicio:** que tengan 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.

Para el caso concreto del proyecto que presentamos la calidad organoléptica del producto es la más relacionada, ya que si bien la calidad simbólica también sería importante no presenta diferencias entre los grupos de animales estudiados.

2.4.1 PARÁMETROS INDICATIVOS DE CALIDAD.

Atendiendo a las distintas formas de definir la 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 organoléptica de la carne 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 físico-químicas de la carne. Hemos explicado ya anteriormente como el músculo llega a sufrir un descenso de pH después del sacrificio del animal. Dicha variación de pH puede tener un profundo efecto sobre las propiedades sensoriales y tecnológicas de la carne, afectando al color, la textura y el grado de exudación, así como a la degradación proteolítica de la carne.
- **El color:** es una de las cualidades más importantes de la carne, ya que es el primer atributo que el consumidor puede apreciar a simple vista y por lo tanto motivara su aceptación o rechazo del producto. El color de la carne dependerá de la estructura y el tipo de músculo, de la concentración de pigmentos hemínicos como la mioglobina que contenga el músculo y del estado de oxidación de los mismos. El contenido de mioglobina en el músculo depende de diversos factores productivos, tales como la especie, raza, edad...mientras que su estado de oxidación o desnaturalización dependerá de procesos *post-mortem* que se ven afectados por la disminución de la temperatura y la tasa de descenso de pH, así como los tiempos de almacenamiento y las condiciones de comercialización. Dependiendo del estado de oxidación del átomo de hierro del grupo hemo podemos diferenciar tres formas diferentes del pigmento que proporcionarán distinta tonalidad a la carne (Figura 7).

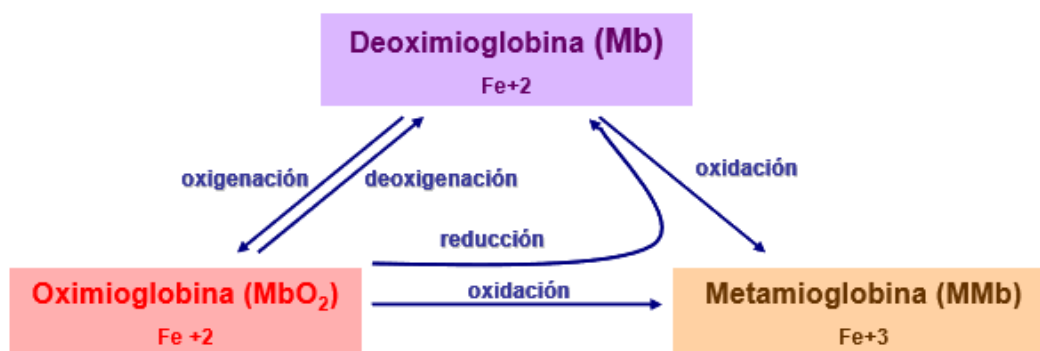


Figura 7: Interconversión redox de los pigmentos de la carne (Sierra V, 2010 Tesis Doctoral).

- **El estado oxidativo:** ya descrito anteriormente, son las modificaciones que se producen a lo largo de la maduración *post-mortem* en las biomoléculas musculares que incluyen un descenso de la defensa antioxidante y un incremento del grado de oxidación de lípidos y proteínas por la acción de los 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 en los fosfolípidos de membrana, debido principalmente a sistemas autocatalíticos de radicales libres en cadena (Grune *et al.* 1997).

2.4.2 LOS FACTORES QUE AFECTAN A LA CALIDAD DE LA CARNE

La calidad de la carne viene marcada por diversos factores intrínsecos del propio animal como pueden ser la raza, sexo, edad y genotipo; y por los factores extrínsecos o ligados al proceso productivo (alimentación, castración). A estos ha de añadirse también los relacionados con el manejo de animal y la canal en los momentos previos y posteriores al sacrificio como son el ayuno, los tiempos de espera, el transporte, el estrés, los métodos de aturdimiento, el sangrado, el tiempo de maduración, el envasado...).

La raza es un factor muy importante y se engloba en factores *ante-mortem* que nos informa de las características de los animales, y la calidad de la carne como ya hemos descrito profusamente en el apartado de razas del cerdo.

Estos factores tienen un gran efecto sobre los diferentes atributos de la calidad de la carne, como son el pH (Warner, 2005), el color, la ternura, la capacidad de retener agua, así como sobre la maduración de la carne (Gregory, 2003) y pueden determinar la

aparición de carnes oscuras, duras y secas (DFD en inglés), con un pH alto y unas características como el color, la capacidad de retención de agua o textura no deseables (Beriaín and Lizaso, 1998);(Ahn *et al.* 2001); (Viljoen *et al.* 2002); (Wulf, 2002) o bien carnes pálidas, blandas y exudativas (PSE) que tampoco serían valoradas por el consumidor.

En la fase *post-mortem* el tiempo de maduración es un factor importantísimo para poder obtener un grado de ternura deseable, ya que a lo largo del mismo se produce una degradación de la estructura de las miofibrillas por la acción de enzimas proteolíticas. También en el proceso de maduración se contribuye al aroma de la carne por la degradación de grasas y proteínas (Touraille and Girard, 1985).

En base a lo expuesto anteriormente, son muchos los aspectos de la maduración afectados por los procesos que suceden antes de la muerte del animal. Debido a ello, sería muy aconsejable el descubrimiento de aquellos posibles marcadores que pudieran informar *a priori* de la calidad de la carne que se obtendrá después del todo el proceso de tenderización. Estos marcadores serían de tanta más utilidad cuanto más temprano en la tenderización fuese posible detectarlos. Por ello, nuestro trabajo se ha centrado en el estudio a lo largo del periodo temprano de maduración, de las proteínas implicadas en el proceso de contracción muscular y del papel que ocupa durante la tenderización la mutación conocida como el gen halotano que implicaría el disparo del estrés maligno que induce carnes de pobre calidad. El conocimiento de su evolución durante el pre rigor mortis podría ayudar a clarificar el camino para mejorar las características organolépticas de dichas canales.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIALES UTILIZADOS

3.1 INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS QUÍMICOS EMPLEADOS

3.1.1 INSTRUMENTACIÓN

- Ultra-turrax T-25 (JANKE & KUNKEL IKA-Labortechnik) para la homogeneización del tejido.
- Balanza de precisión Mettler Toledo AB54-S para pesar el tejido
- Balanza Sauter RE 2012 para pesar los reactivos de las disoluciones correspondientes.
- Centrifugas 5810 R Eppendorf y Biotage pico Heraeus para la centrifugación de las muestras.
- Agitador IKA KS 130 basic para la mezcla de las muestras.
- pHmetro Mettler Toledo MP 220 para llevar a cabo las medidas de pH correspondientes.
- Baño termostático para desnaturalizar las proteínas de las muestras a 100°C.
- Campana de flujo laminar vertical CRUMA 870 FL. El flujo pasa por un filtro HEPA H-14 a una velocidad constante, en un régimen laminar y en dirección vertical y de esta manera genera un área estéril. El sistema de filtración es para partículas de 0,3µm y con una extracción del 100% del flujo de aire hasta el exterior.
- Fuente de alimentación Biorad Power/Pac 300 que proporciona voltaje o amperaje a los instrumentos utilizados en la electroforesis y en la transferencia.
- Máquina de revelado de membranas G:Box Syngene que revela las membranas de los Western-Blot y permite observar las proteínas detectadas por los anticuerpos utilizados.
- Espectrofotómetro para microplacas BioTek PowerWave Xs que junto con el software Gen5 permite cuantificar la cantidad de proteína total de las muestras
- Nanodrop 3000 Thermo Scientific para medir la cantidad y la pureza del ARN extraído de las muestras.
- Thermo Px 2 Thermal Cycle para realizar la retrotranscripción (copia en forma de ADNc) de los ARN extraído de las muestras.
- StepOne Real-Time PCR System que junto con el StepOne software permite la amplificación de los ADNc de interés y posterior análisis de la expresión de los genes de donde provienen estos ADNc.

3.1.2. REACTIVOS Y MATERIALES

- KH_2PO_4 : potassium dyhydrogen phosphate. PROLABO-VWR.
- K_2HPO_4 : di-potassium hydrogen phosphate. PROLABO-VWR.
- NaCl: cloruro de sodio. SIGMA-ALDRICH 57653.
- Triton: PROLABO-VWR 28817295.
- Bradford: SIGMA B6916.
- Albumina: MERCK 1120180100.
- Tris HCl 1,5M pH 8,8: BIORAD 161-0799.
- Tris HCl 0.5M pH 6.8: BIORAD 161-0798.
- Acrilamida/Bis 30%: BIORAD 1610156.
- SDS: sodio dodecil sulfato SIGMA-ALDRICH 52378.
- APS: SACHARLAUB AM371.
- Temed: SIGMA-ALDRICH T9281.
- Isopropilo: propan-2-ol PROLABO-VWR.
- Tris: trizma SIGMA-ALDRICH T1503.
- Glicina: MERCK 104169.
- Metanol: PROLABO-VWR.
- Laemmli: BIORAD.
- Ponceau: SIGMA ALDRICH P3504.
- Ácido acético: PROLABO-VWR 20104298.
- Ácido clorhídrico 35%: PROLABO-VWR 20248295.
- Tween-20: SIGMA-ALDRICH P5927.
- Leche en polvo desnatada: NESTLE.
- Ázida sódica: SIGMA-ALDRICH 58032.
- Cloroformo: PANREAC.
- Etanol: PROLABO-VWR.
- DEPC: APPLICHEM A0088100.
- Trizol: SIGMA T9424
- ABTS: ácido 2, 2'-azido-bis (3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) SIGMA A. 3219.
- H_2O_2 : peróxido de hidrógeno FLUKA 95294.
- HRP: peróxidasa de rábano SIGMA P. 6782.
- 1-metil-2-fenilindol SIGMA 404888.

- Acetonitrilo: SIGMA-ALDRICH 60004.
- Ácido metasuifónico MERCH 806022.
- MDA: malonildialdehido.
- 4- HNE: 1,1,3,3-Tetrametoxipropane SIGMA 108383
- High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, Reino Unido).
- Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies).

3.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Para este estudio se utilizaron 24 cerdos [(Large White x Landrace) x Pietrain], que fueron divididos en machos normales, machos portadores del gen halotano, hembras normales y hembras portadoras del gen halotano (6 cerdos/grupo). Los animales fueron destetados a los 28 días, siendo criados a partir de los dos meses en una granja experimental del Instituto de Investigación y Tecnología Alimentaria (IRTA-Monells) (Girona, España) en condiciones de luz natural y a una temperatura de 20°C. Durante el engorde comieron pienso comercial ad-libitum y tuvieron acceso libre a los bebederos. A los 5 meses y medio fueron sacrificados.

Se utilizó el lado izquierdo de cada carcasa para evaluar la calidad de la carne. A posteriori, se midió el pH a los 45 minutos y 24 horas *post-mortem* en el semimembrano (SM) y Longissimus dorsi (LD), utilizando un pHmetro portátil Crison equipado con un electrodo Xerolyt.

Muestras musculares tomadas del LD de cada animal a las 0, 4, 8 y 24 horas *post-mortem* fueron congeladas mediante nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta que fueron analizadas.

3.3 DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

Para la determinación bioquímica, 500mg de tejido se homogeneizaron en 4,5 ml de tampón potasio 10mM (pH 7,4), NaCl 50mM y tritón 0,1% en un polytron Ultra-Turrax T25 (JANKE & KUNKEL IKA-Labortechnik, USA).

3.3.1 CUANTIFICACIÓN PROTEICA

El homogeneizado del tejido se centrifugó a 3000 rpm durante 6 minutos a 4°C. En las muestras que se observó precipitado, este fue eliminado para no interferir en el proceso, recogiendo los sobrenadantes para realizar el cálculo de proteínas.

Para ello, se añadieron a los pocillos de una placa diluciones 1:1000 y 1:2000 de estos sobrenadantes, así como diluciones en base 10 con concentraciones conocidas de albumina partiendo de un stock de 10mg/ml. Tras añadir 200µl de Bradford a todos los pocillos, e incubar 5 minutos a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 595nm.

Extrapolando las absorbancias medidas en las muestras con las obtenidas con la recta patrón de albumina, se calculó la concentración de proteína total que tiene cada muestra.

3.3.2 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL (AAT)

La AAT es un parámetro medible que nos proporciona la información sobre la cantidad de sustancias antioxidantes que hay disueltas, y es considerada como un indicador útil de la capacidad del sistema para impedir el daño causado por la EROs.

La valoración de la AAT del homogeneizado se efectuó mediante una modificación en nuestro laboratorio de la técnica de Arnao (Arnao et al., 2001, de Gonzalo-Calvo *et al.*, 2010).

3.3.3 LIPOPEROXIDACIÓN (LPO)

La lipoperoxidación da lugar a la producción de peróxidos de lípidos y sus derivados como MDA y 4-HNE que proveen un índice conveniente de la peroxidación lipídica (Esterbauer et al., 1990).

Para llevar a cabo esta determinación se utiliza el kit Bioxytech LPO-568 kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). El kit contiene un reactivo cromógeno (N-metil-2-fenilindol) que reacciona con MDA y 4-HNE a 45°, midiendo la absorbancia a 586nm.

3.3.4 WESTERN BLOT

Para la realización de este método, alícuotas de muestras previamente homogeneizado conteniendo 100µg de proteína total se diluyeron en el tampón de lisis comercial Laemmli (Biorad Laboratories, Inc; Hercules, CA, E.E.U.U) y se desnaturalizaron a 100°C durante 5 minutos. Posteriormente se analizaron mediante electroforesis en un gel de de poliacrilamida y dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) donde se separan según su peso molecular. Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Immobilon TM-P;

Millipore Corp., Bedford, MA, E.E.U.U.). Finalizado este paso las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con leche desnatada al 5%. A continuacion se incubaron durante toda la noche con un anticuerpo primario diluido en 5ml de tampón Tris salino (TBS) (Tris/HCl 50 mM, pH 7,4 y NaCl 150 mM), leche desnatada al 2% y 0.04% de ázida sódica. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-MyoD (M-318) (sc-760, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) y anti-Miostatina (GDF-8/11) (sc-34781, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Despues de tres lavados de 10 minutos con TBS-T (Tampón Tris salido que contiene Tween-20, Tris/HCL 20mM, pH 7,4, NaCl 150mM y Tween-20 0.05%), las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) diluido en tampón TBS que contiene leche desnatada al 2% durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti-rabbit y anti-goat. Tras tres lavados de 10 minutos con TBS-T, la presencia de las proteínas de interes se revelo usando un sustrato quimioluminiscente de rábano picante (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA). 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.



Figura 8: Western Blot (Imagen tomada de BIORAD).

3.4 CUANTIFICACION DE LA EXPRESION GÉNICA

3.4.1 EXTRACCIÓN DE ARN

La extracción de ARN se realizo utilizando Trizol (SIGMA T9424). Para ello a 100 mg de muestra se añadieron 1 ml de trizol y se incubaron a a temperatura ambiente

durante 5min. Tras añadir 200µl de cloroformo, se mezcló durante 15 segundos en un vortex, se incubó a temperatura ambiente durante 2-3 minutos, se centrifugó 15 minutos a 13000g. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo, se le añadió 500 µl de isopropil y se incubó 10min a temperatura ambiente. Tras centrifugar 15 minutos a 13000g el ARN precipita, por lo que se eliminó el sobrenadante con cuidado de no tocar el precipitado. Este se lavó mediante adición de 1 ml de etanol al 75% y posterior centrifugación (15 minutos a 13000g). Se eliminó el etanol y se dejaron secar bien los tubos para evitar que el etanol interfiriera en las reacciones de amplificación genómica. El ARN se disolvió en 20 µl de agua DEPC y se midió su concentración y pureza usando un Nanodrop 3000.

3.4.2 SÍNTESIS DE CDNA

El ARN extraído se sometió a un proceso de retrotranscripción para la obtención de una copia en forma de ADNc de los distintos ARN mensajeros presentes en la muestra. Para ello, se utilizó el preparado comercial High CapacityDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, Reino Unido) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.4.3 MEDIDA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL (QPCR)

La qPCR es una modificación de la PCR convencional utilizada para amplificar y poder cuantificar al mismo tiempo el producto de la amplificación de ADN, permitiendo conocer la cantidad de ADN presente en la muestra de partida. Una variante de esta técnica, el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, es utilizada para medir cambios relativos en la expresión de genes de interés. Para ello se compara la concentración relativa de un ARNm bajo ciertas condiciones experimentales con la de una condición control, debiendo normalizarse frente a un gen de referencia, cuya expresión debe ser estable en todas las condiciones.

La expresión de los genes RyR1, SERCA 1 y Calstabin, así como del gen GAPDH utilizado como referencia, se analizó mediante esta técnica.

Para ello, el ADNc(20 µl) obtenido a partir del ARN total extraído fue sometido a una qPCR utilizando el preparado comercial Power SYBR Green PCR Master Mix (LifeTechnologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Como cebadores se utilizaron los reflejados en la tabla 1 y que fueron diseñados usando el programa Primer Express software (Life Technologies) a partir de las secuencias de los ARNm obtenidas de la página web de Ensembl Project [<http://www.ensembl.org>]. Para asegurar que la

amplificación no provenga del ADN genómico, los cebadores fueron diseñados flanqueando una secuencia intrón.

Tabla 1. Cebadores utilizados para cuantificar la expresión de los genes de interés.

Gen	Nombre	Secuencia (5'>3')*
Ryanodine Receptor	RyR-F	AAGGCGAAGACGAGGTCCA
	RyR-R	TTCTGCGCGTTGCTAGTGG
Sarco/EndoplasmicReticulum Ca ²⁺ -ATPase 1	SERCA 1-F	CTGACCGCAAGTCAGTGCAA
	SERCA 1-R	GGATGGACTGGTCAACCCG
Calstabin 1	CALS 1-F	GGGGATGCTTGAAGATGGAA
	CALS 1-R	TTGGCTCTCTGACCCACACTC
GlycerAldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	GAPDH-F	CAATGACCCCTTCATTGACC
	GAPDH-R	TGGAAGATGGTGATGGGATT

*Diseñados usando el programa Primer Express software (Life Technologies, Reino Unido).

Las reacciones de amplificación así como el paso final para calcular la T_m del amplicón se llevaron a cabo en un termociclador StepOne Real-Time PCR System (Life Technologies) usando el perfil térmico mostrado en la Figura 9. La adquisición de los datos, así como el análisis de los resultados, se llevó a cabo usando el programa StepOne Software. Las variaciones en los niveles de ARNm se han expresado mediante los valores $2^{-\Delta\Delta C_t}$, siendo C_t el número de ciclo de amplificación en que la fluorescencia emitida supera el valor umbral establecido, $\Delta C_t = C_t \text{ gen interés} - C_t \text{ gen GAPDH}$ y $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ en la condición a estudiar - ΔC_t en la condición control (Livak and Schmittgen, 2001).

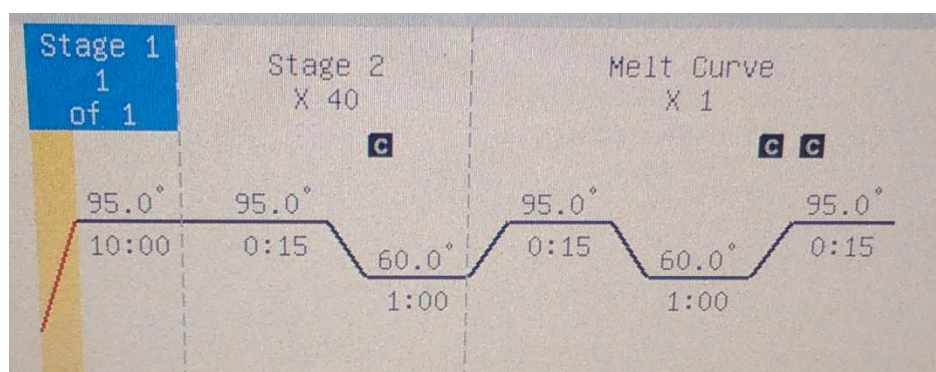


Figura 9: Perfil térmico utilizado para la amplificación de los ARN de interés y el cálculo de la T_m del amplicón.

Al igual que en una PCR clásica, todos estos ensayos de PCR se realizaron con las medidas habituales para evitar contaminaciones. Se usaron puntas de pipeta con filtro. Los lugares en donde se procedía a la extracción de la muestra, en donde se preparaba la mezcla de reacción y en donde se realizaba la amplificación estaban físicamente separados.

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se analizaron mediante un programa estadístico utilizando la media y la desviación, en el que se empleo un (ANOVA) de dos factores usando el software GraphPad Prism 5.

En este modelo utilizamos como características el sexo, la condición de si era portador o no del gen mutado y el tiempo post-mortem (0h, 4h, 8h y 24h).

Para ello se utilizó el test post-hoc Bonferroni. De esta manera obtuvimos las gráficas que se mostraran a continuación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS

La Industria Cárnica es el cuarto sector industrial de nuestro país, aunque en 2013 sufrió un considerable freno en su ascenso ininterrumpido desde el 2009. Como ya se indicó en la introducción existe un fenómeno que preocupa a la sociedad en este momento y es el bienestar animal y la calidad de los productos que vamos a consumir, factores ambos muy implicados entre si y necesarios para que la industria cárnica recupere valores máximos de mercado (Buller, 2009).

Ya que el estrés animal está íntimamente asociado al estrés oxidativo como se explicó en la introducción, nuestro primer paso fue la caracterización del estrés oxidativo en estos individuos: controles y portadores de la mutación, de ambos sexos y a lo largo de 4 puntos temporales durante la maduración temprana.

4.1 ESTRÉS OXIDATIVO

Comenzamos estudiando el daño de lípidos que muestra indirectamente el exceso de radicales libres en el tejido que provocan el daño oxidativo. En ambas gráficas se ven diferencias significativas de $p < 0.001$ salvo en el caso de los machos libres de la mutación entre las 4 y las 8 horas que no existe ningún tipo de variación y en el caso de los portadores de la mutación se ve una disminución en las diferencias con $p < 0.05$ entre las 4 y las 24 horas, aunque luego vuelve ascender las diferencias significativas con un $p < 0.001$.

Los machos controles muestran un altísimo nivel de daño de lípidos a las 0h con diferencias significativas con un $p < 0.001$, lo que ha sido observado en diversos estudios previos y que muy probablemente se deba al estrés provocado por el sacrificio. Posteriormente ese estrés desciende abruptamente y con el daño de lípidos. El incremento observado a las 24h parece esperable a la vista del excesivo tiempo pasado desde la muerte del animal. Los resultados observados para los machos portadores son distintos, lo que indica que la mutación está influyendo en la producción de este estrés. Todos los grupos se mantienen en valores muy similares. Así, muestran un incremento significativo a las 0h con unas diferencias significativas de $p < 0.001$ por la misma razón que los controles pero lejos de caer abruptamente, en el caso de los portadores desciende solo ligeramente manteniéndose en valores altos durante todo el tiempo de estudio. Incluso a las 24h se produce un breve descenso del daño a los lípidos. Estas claras diferencias entre el daño de lípidos de controles y portadores tendrá lógicamente una importante

repercusión en la calidad de la carne ya que el daño de lípidos provoca cambios importantes en el sabor que pueden contribuir rápidamente al enranciamiento de la canal (Figura 10).

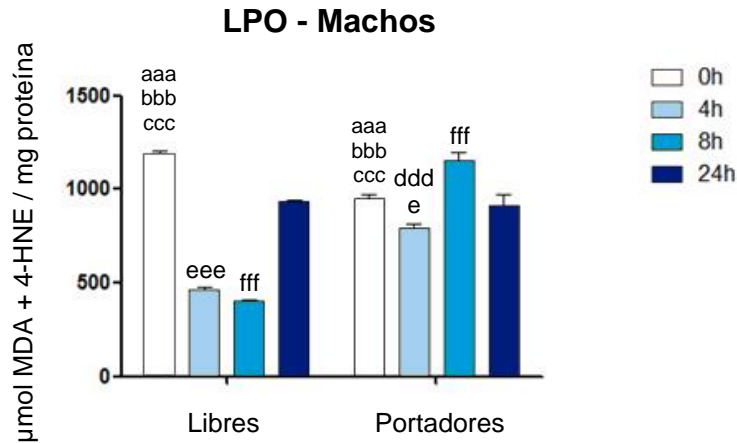


Figura 10: Efecto del tiempo post-mortem sobre la lipoperoxidación ($\mu\text{mol MDA} + 4\text{-HNE} / \text{mg proteína}$) en machos medida en diferentes genotipos (libre y portador).
a: 0h vs. 4h; b: 0h vs. 8h; c: 0h vs. 24h; d: 4h vs. 8h; e: 4h vs. 24h; f: 8h vs. 24h. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

Las hembras en general muestran un daño de lípidos muy inferior al observado en machos. En general, las hembras se encuentran más protegidas del estrés oxidativo de lo que se hayan los machos debido a sus altos niveles de estrógenos, lo que probablemente este influyendo en este caso. Pero además, las gráficas obtenidas (Figura 11) tanto en controles como en portadores difieren significativamente de las observadas en machos (Figura 10). Así, se ve como las hembras mantienen unos niveles bajos y sin grandes variaciones entre puntos temporales de maduración. Las diferencias estadísticas sobre todo sirven para demostrar lo constantes que son los resultados obtenidos y su alta reproductibilidad que da lugar a muy bajas desviaciones típicas. Sin embargo, en el caso de las portadoras, el nivel de estrés oxidativo va incrementándose de forma significativa $p < 0.001$ con el tiempo hasta alcanzar a las 24 horas niveles incluso superiores a los observados en machos.

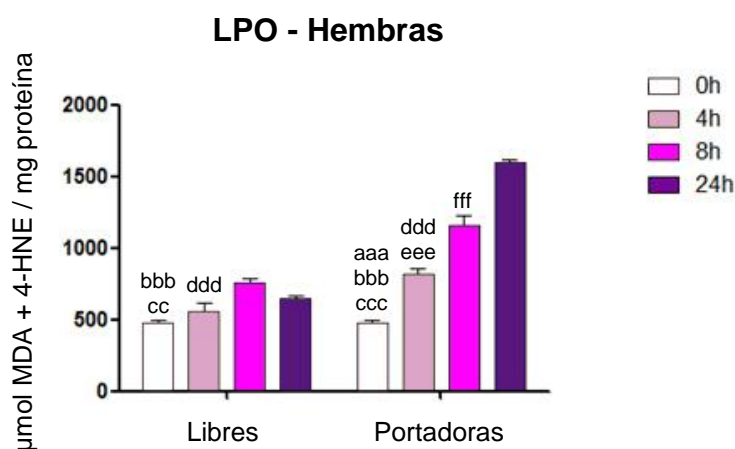


Figura 11: Efecto del tiempo *post-mortem* sobre la lipoperoxidación ($\mu\text{mol MDA} + 4\text{-HNE} / \text{mg proteína}$) en hembras medida en diferentes genotipos (libre y portadora).

a: 0h vs. 4h; b: 0h vs. 8h; c: 0h vs. 24h; d: 4h vs. 8h; e: 4h vs. 24h; f: 8h vs. 24h. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

La AAT es un muy buen indicador de los niveles antioxidantes que dispone el animal para luchar contra el estrés oxidativo. No son solo los enzimas antioxidantes de todos los niveles, sino también los antioxidantes administrados en la dieta y que son iguales para los cuatro grupos estudiados. Los resultados muestran a primera vista dos datos claros. Por un lado, los machos presentan niveles superiores a las hembras, lo cual es esperable a la vista de los datos de daño de lípidos que mostraban un mayor nivel de estrés oxidativo que, por ello, debía haber inducido una mayor respuesta antioxidante. Y por otra parte, la respuesta antioxidante se ha visto poco influenciada por la mutación portada (y por lo tanto por el incremento generalizado de los niveles de calcio citosólicos) ya que en general los perfiles de respuesta son muy similares tanto en libres como en portadores.

Así, en machos controles se observa una respuesta completamente pareja a los datos de daño lipídico, observándose una subida inicial a las 0h fruto, presuntamente, del incremento abrupto de estrés por el sacrificio y una caída posterior, primero, a las 4 h con un $p < 0.01$ por un descenso del estrés imperante y en las horas sucesivas porque el paso del tiempo va impidiendo el mantenimiento de la defensa antioxidante (Figura 13). La

prueba más evidente se observa a las 24h donde se encontraba el mayor daño oxidativo que se corresponde con la menor defensa antioxidante. En el caso de los portadores, la evolución es similar: un pico abrupto a las 0h con un $p < 0.001$, que se continua con niveles más o menos mantenidos hasta las 24h.

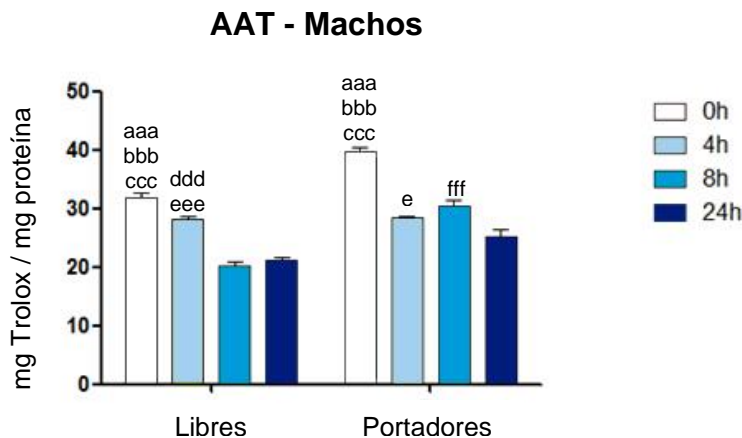


Figura 12: Efecto del tiempo post-mortem sobre la AAT (mg Trolox / mg proteína) en machos medida en diferentes genotipos (libre y portador).
a: 0h vs. 4h; b: 0h vs. 8h; c: 0h vs. 24h; d: 4h vs. 8h; e: 4h vs. 24h; f: 8h vs. 24h. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

Las hembras muestran unos niveles inferiores de defensa antioxidante, lo que unido al menos estrés oxidativo observado afianza la hipótesis del papel protector antioxidante que tienen los estrógenos en este caso. Nuevamente, como ya anteriormente se había observado en el daño de lípidos, en ambas grupos parece que el estrés psicológico en el sacrificio ha tenido una menor influencia en las hembras que en los machos, observándose en la AAT menores niveles de protección antioxidante en el momento del sacrificio que a los demás momentos temporales (con diferencias significativas solo en el caso de las controles con ($p < 0.01$)). Por lo demás, ambas gráficas, (Figura 12) tanto de controles como portadoras siguieron un perfil muy similar al observado en este mismo sexo para el daño de lípidos, mostrando las controles niveles más o menos mantenidos a lo largo del periodo temprano, incrementándose ligeramente en los últimos momentos con un $p < 0.001$, probablemente por el acumulo de radicales libres en horas tardías después del sacrificio. Y en el caso de las portadoras un incremento

paulatino en su defensa que crece paralelo al daño de lípidos estudiado anteriormente ($p < 0.01$ a las 24h).

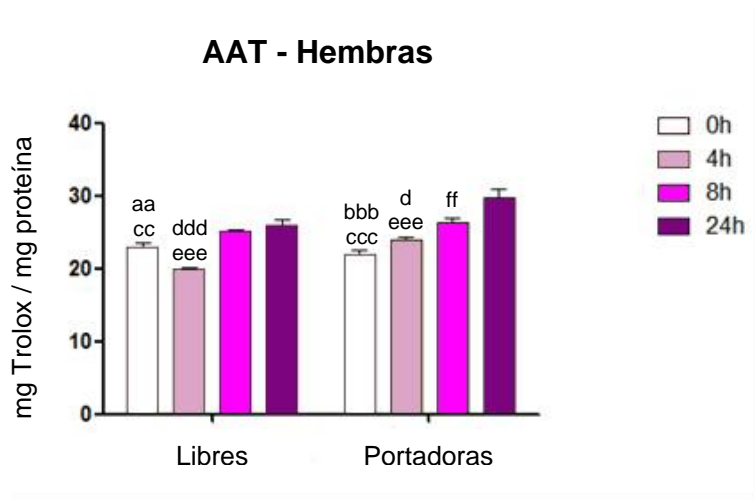


Figura 14: Efecto del tiempo *post-mortem* sobre la AAT(mg Trolox / mg proteína) en hembras medida en diferentes genotipos (libre y portadora).

a: 0h vs. 4h; b: 0h vs. 8h; c: 0h vs. 24h; d: 4h vs. 8h; e: 4h vs. 24h; f: 8h vs. 24h. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$

4.2 CONTRACCIÓN MUSCULAR

Hemos estudiado mediante PCR cuantitativa como varia la expresión génica de los principales moléculas implicadas en el disparo de la contracción muscular mediante la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (RyR, y su regulador la calstábina que constituyen el canal de liberación del calcio) y posterior recuperación de dichos iones por el retículo sarcoplásmico (SERCA) en los 4 grupos de estudio.

Estudiando la expresión primeramente en machos, observamos nuevamente claras diferencias entre los controles y los mutados, pareciendo que la expresión en ambos casos es una respuesta en cierta medida al estrés oxidativo anterior. Por ello, nuestro estudio mostro diferencias importantes en la expresión de los individuos controles y los mutados. Así, los individuos portadores mostraron una muy superior producción de RyR en los primeros momentos de la tenderización que se vio abruptamente reducida a partir de las 8 horas, probablemente por la pérdida de capacidad de transcripción de la célula muscular ya que la excesiva liberación de calcio induciría rápidamente una pérdida de ATP. Sin embargo, los machos controles presentaron unos bajos niveles de RyR inicialmente yendo incrementándose sucesivamente a lo largo de la tenderización lo que se corresponde con

aumentos progresivos de niveles de Ca^{2+} en el citoplasma a tiempos mucho más largos de lo que sucede en individuos mutados.

En el caso de las hembras, vemos perfiles opuestos a los observados en el daño de lípidos, lo que indica una respuesta diferencial al estrés oxidativo cuyo incremento para actuar directamente reduciendo la expresión de dicho gen tanto en las hembras controles como en las portadoras con claras diferencias significativas en un $p < 0.01$ entre puntos temporales. Es interesante además su bajo nivel transcripcional en comparación con los machos que provocara una menor liberación de calcio al citoplasma,

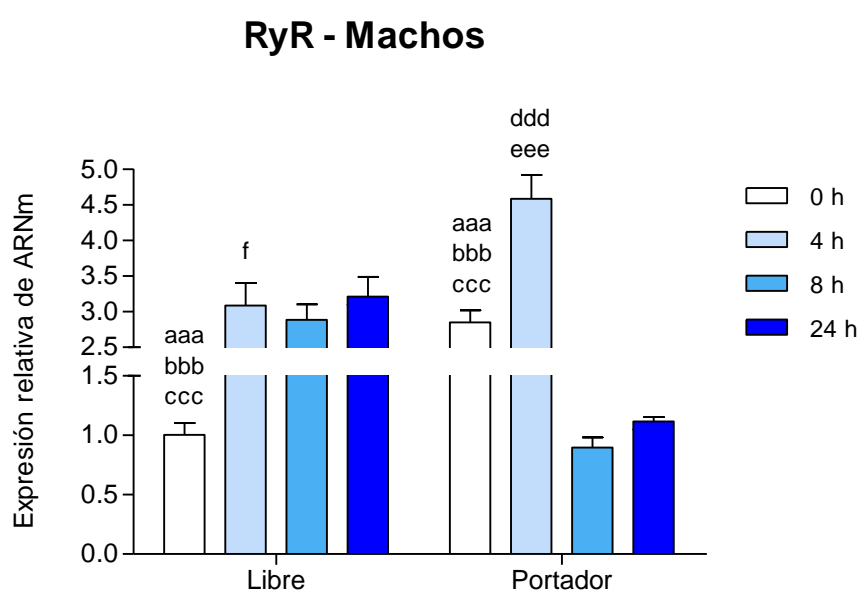


Figura 15: Efecto del tiempo *post-mortem* mediante la expresión relativa del ARNm con el cebador RyR en machos medida en diferentes genotipos (libre y portador).
a: 0h vs. 4h; b: 0h vs. 8h; c: 0h vs. 24h; d: 4h vs. 8h; e: 4h vs. 24h; f: 8h vs. 24h. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$

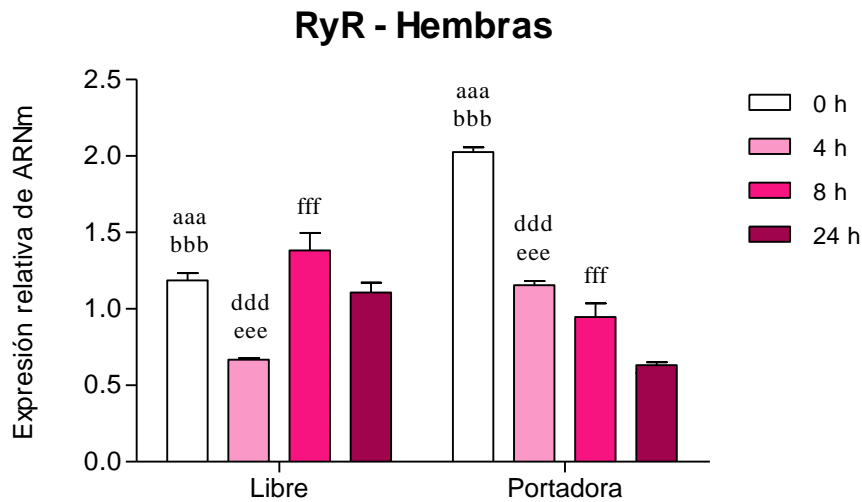


Figura 16: Efecto del tiempo *post-mortem* mediante la expresión relativa del ARNm con el cebador RyR en hembras medida en diferentes genotipos (libre y portador). a: 0h vs. 4h; b: 0h vs. 8h; c: 0h vs. 24h; d: 4h vs. 8h; e: 4h vs. 24h; f: 8h vs. 24h. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$

La calstabilina es otro gen que codifica para una proteína imprescindible en el canal liberador de calcio es la calstabilina cuya función es regular la liberación de este catión, de modo que cuando el RyR se desfosforila hace que la calstabilina se una al RyR y así se recuperen las características de reposo del canal. Lógicamente la liberación de gran cantidad de calcio al citoplasma debe enviar la señal de necesidad de cierre del canal lo que provoca el incremento en la expresión de calstabilina de forma creciente a lo largo del tiempo. Este efecto se observa tanto en los animales controles como en los portadores, siendo destacable que su expresión se mantiene en los animales mutados mucho más tiempo de lo que sucedía con RyR. (Figura 14)

Por su parte, las hembras también mostraron resultados opuestos para la calstabilina de lo observado para RyR. Sin embargo, los niveles de expresión fueron muy inferiores de los observados en machos y con diferencias más abruptas ($p < 0.001$) de las observadas en los machos. Estos datos se correlacionan correctamente con los menores niveles observados en la expresión de RyR, por lo que la regulación del canal, al menos en las hembras normales podría mantenerse de forma correcta durante un largo periodo de tiempo después del sacrificio (Figura 17)

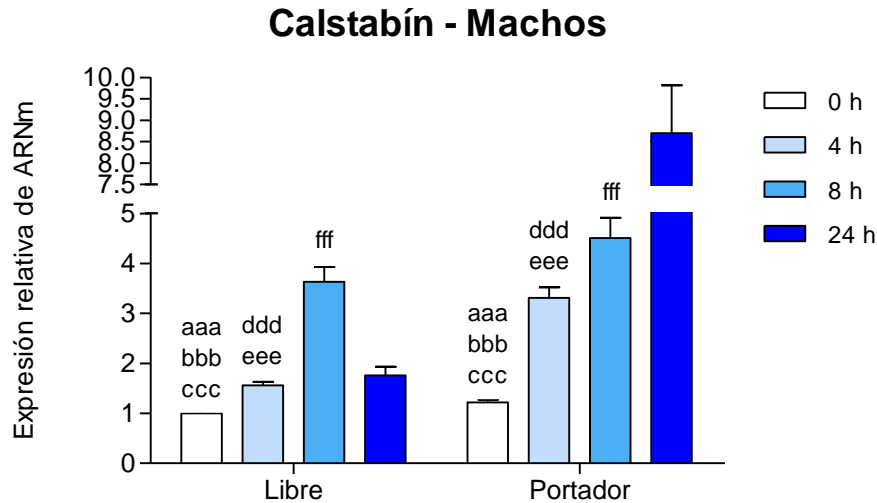


Figura 17: Efecto del tiempo *post-mortem* mediante la expresión relativa del ARNm con el cebador Calstabín en machos medida en diferentes genotipos (libre y portador).
a: 0h vs. 4h; b: 0h vs. 8h; c: 0h vs. 24h; d: 4h vs. 8h; e: 4h vs. 24h; f: 8h vs. 24h. *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p< 0.001

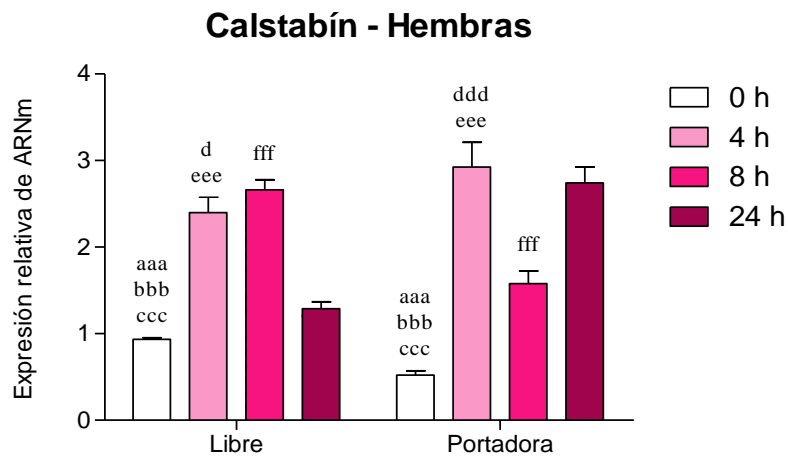


Figura 18: Efecto del tiempo *post-mortem* mediante la expresión relativa del ARNm con el cebador Calstabín en hembras medida en diferentes genotipos (libre y portador).
a: 0h vs. 4h; b: 0h vs. 8h; c: 0h vs. 24h; d: 4h vs. 8h; e: 4h vs. 24h; f: 8h vs. 24h. *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p< 0.001

Finalmente, los datos obtenidos para la ATPasa recuperadora de calcio para el retículo sarcoplásmico o SERCA mostraron una baja actividad a lo largo de todo el periodo estudiado en ambos animales, observándose una caída en los controles a las 24 horas probablemente debido a una reducción generalizada en la capacidad de transcripción. En los portadores, por el contrario, los niveles se mantuvieron bajos, con

una depresión a las 4h con una $p < 0.01$ que se recuperó posteriormente, a las 24 horas se observa una subida altamente significativa de la transcripción de dicho gen, difícilmente explicable (Figura 18).

Nuevamente las hembras, como ya había quedado de manifiesto en el caso de las calstabina mantienen bajos niveles de expresión de SERCA, siendo más activa en el caso de las portadoras en las primeras horas posteriores al sacrificio ($p < 0.001$) aunque menos de la mitad de lo observado en machos (Figura 19).

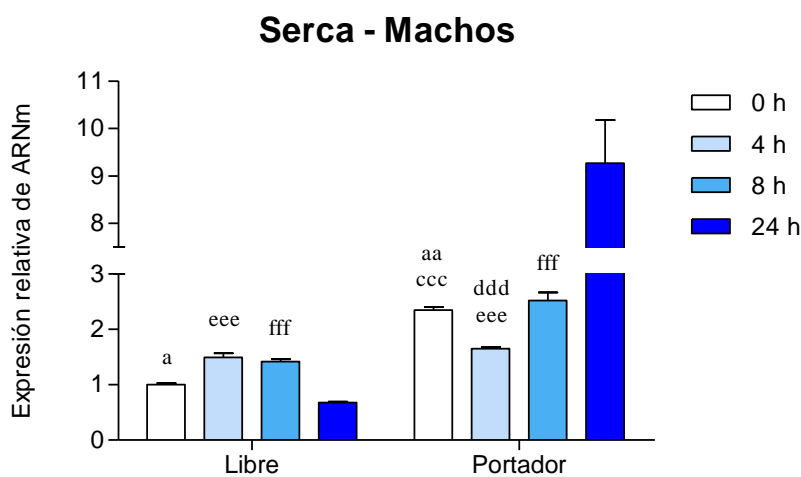


Figura 19: Efecto del tiempo *post-mortem* mediante la expresión relativa del ARNm con el cebador Serca en machos medida en diferentes genotipos (libre y portador).

a: 0h vs. 4h; b: 0h vs. 8h; c: 0h vs. 24h; d: 4h vs. 8h; e: 4h vs. 24h; f: 8h vs. 24h. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$

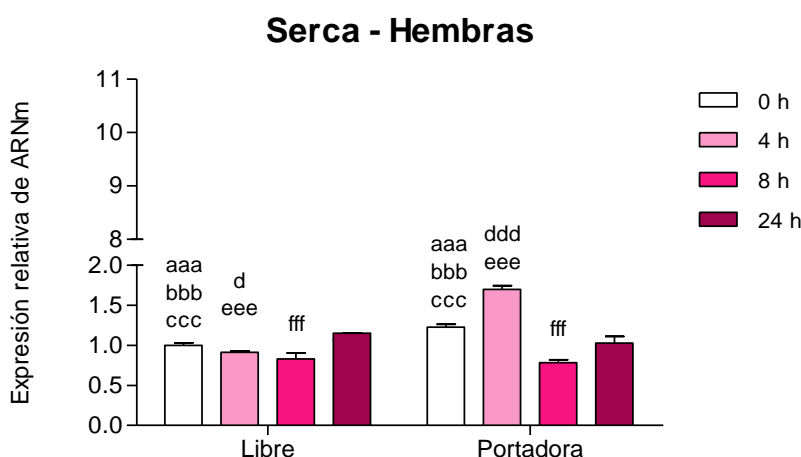


Figura 20: Efecto del tiempo *post-mortem* mediante la expresión relativa del ARNm con el cebador Serca en hembras medida en diferentes genotipos (libre y portador).

a: 0h vs. 4h; b: 0h vs. 8h; c: 0h vs. 24h; d: 4h vs. 8h; e: 4h vs. 24h; f: 8h vs. 24h. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$

Finalmente, comparando globalmente hembras con machos (Tabla 2) se puede observar como claramente el RyR se expresa mucho más en machos que en las hembras en los primeros tiempos de tenderización y en ambos casos vemos diferencias significativas ($p < 0.001$). Este incremento puede provocar una salida de calcio superior en los machos que, podría disparar procesos de muerte de forma más rápida. Sin embargo, la transcripción del resto de proteínas implicadas se ajustan bastante bien a la primera, observándose siempre niveles muy inferiores de expresión en hembras, pero aparentemente correlacionada en ambos sexos, por lo que parece que la capacidad de transcripción se mantiene durante la tenderización temprana.

Tabla 2. Efecto del sexo sobre el genotipo (libre y portador) sobre los biomarcadores de contracción muscular (RyR, Calstabin y Serca (expresión relativa de ARNm)) medidos en el músculo LD.

	Tiempo <i>post-mortem</i>	Machos Libres	Hembras Libres	Sign .	Machos Portadores	Hembras Portadoras	Sign .
RyR	0 h	1,00 ± 0,10	1,19 ± 0,05	ns	2,85 ± 0,17	2,03 ± 0,03	***
	4 h	3,09 ± 0,31	0,67 ± 0,01	***	4,58 ± 0,33	1,16 ± 0,03	***
	8 h	2,89 ± 0,22	1,38 ± 0,11	***	0,90 ± 0,09	0,95 ± 0,09	ns
	24 h	3,21 ± 0,27	1,11 ± 0,07	***	1,12 ± 0,04	0,63 ± 0,02	***
Calstabin	0 h	1,00 ± 0,05	0,94 ± 0,02	ns	1,22 ± 0,05	0,52 ± 0,05	**
	4 h	1,56 ± 0,07	2,40 ± 0,18	***	3,31 ± 0,22	2,92 ± 0,29	ns
	8 h	3,63 ± 0,30	2,66 ± 0,12	***	4,51 ± 0,41	1,58 ± 0,14	***
	24 h	1,76 ± 0,18	1,29 ± 0,08	ns	8,70 ± 1,12	2,74 ± 0,18	***
Serca	0 h	1,00 ± 0,03	1,00 ± 0,03	ns	2,35 ± 0,05	1,23 ± 0,04	***
	4 h	1,50 ± 0,07	0,91 ± 0,02	***	1,65 ± 0,03	1,70 ± 0,05	ns
	8 h	1,42 ± 0,04	0,83 ± 0,08	***	2,52 ± 0,15	0,78 ± 0,04	***
	24 h	0,68 ± 0,01	1,15 ± 0,00	**	9,27 ± 0,91	1,03 ± 0,08	***

Los datos se presentan como media ± DS. ns: no significativo. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

4.3 MIOSTATINA VS. MYOD

Como hemos explicado en la introducción la miostatina provoca la inhibición del crecimiento, mientras que la MyoD es esencial para la miogénesis. Son por tanto proteínas contrapuestas en el crecimiento muscular que deben mantenerse en equilibrio a lo largo de la vida del animal. Sin embargo, después del sacrificio poco se sabe de lo que les sucede a estas proteínas.

Miostatina - Machos



ML 0 MP 0 ML 4 MP 4 ML 8 MP 8 ML 24 MP 24

Miostatina - Hembras



HL 0 HP 0 HL 4 HP 4 HL 8 HP 8 HL 24 HP 24

MyoD - Machos



ML 0 MP 0 ML 4 MP 4 ML 8 MP 8 ML 24 MP 24

MyoD - Hembras



HL 0 HP 0 HL 4 HP 4 HL 8 HP 8 HL 24 HP 24

Figura 21: Análisis WB representativo de las pruebas realización con Miostatina (52kDa) y Myo D (45kDa). M: machos; H: hembras.

Para el caso de miostatina vemos como los niveles de dicha proteína se van elevando a lo largo del periodo de maduración en ambos grupos experimentales pero más en el caso de los portadores, siendo en ambos casos las diferencias significativas para las 0h ($p < 0.001$) y las 24h ($p < 0.001$). Este incremento en la proteína inhibidora del crecimiento se corresponde con los niveles de calcio y de estrés oxidativo que se van incrementando en el tejido a los cuales esta proteína es receptiva. Los datos presentados muestran, asimismo, que la capacidad no solo transcripcional sino traduccional se mantienen correctamente en el musculo durante el periodo de tenderización estudiado.

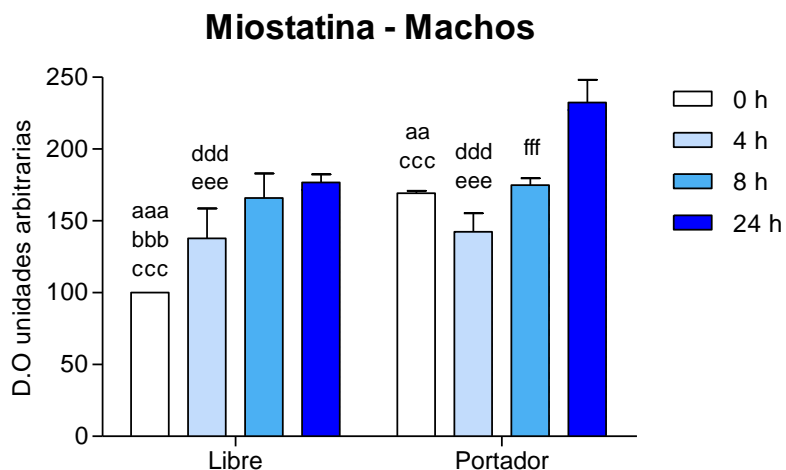


Figura 21: Densitometría de los WB Miostatina (machos) normalizados con Ponceau para los dos grupos experimentales (unidades arbitrarias). Representación gráfica según la evolución post-mortem a distintas horas, 0h, 4h, 8h y 24h. a: 0h vs. 4h; b: 0h vs. 8h; c: 0h vs. 24h; d: 4h vs. 8h; e: 4h vs. 24h; f: 8h vs. 24h. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

Las hembras siguen un patrón muy similar al de los machos con incrementos en los niveles de miostatina con el tiempo. Asimismo, la producción de la proteína es superior en el caso de los portadores que en el caso de los controles, por lo que su relación con los incrementos en los niveles de calcio parece evidente.

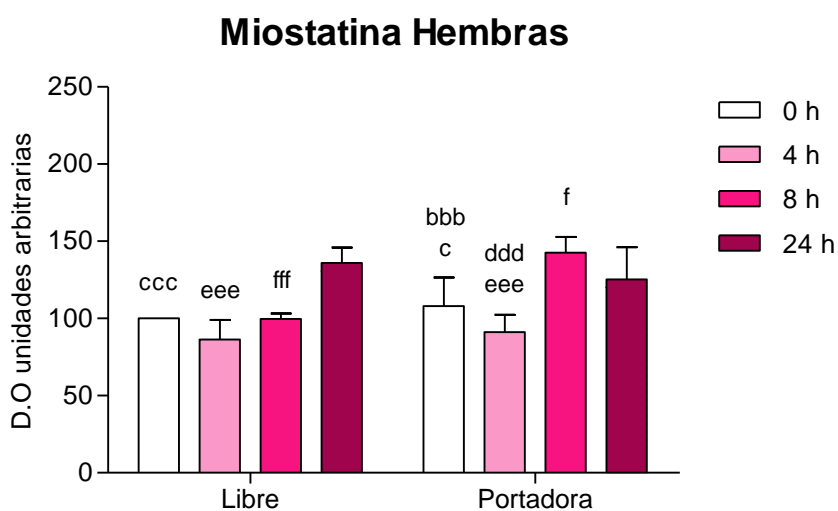


Figura 22: Densitometría de los WB Miostatina (hembras) normalizados con Ponceau para los dos grupos experimentales (unidades arbitrarias).

0h, 4h, 8h y 24h. a: 0h vs. 4h; b: 0h vs. 8h; c: 0h vs. 24h; d: 4h vs. 8h; e: 4h vs. 24h; f: 8h vs. 24h. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

Comparando los machos con las hembras podemos ver que como recoge en la (Tabla 3) que se expresan mucho más en los machos que en las hembras lo que se correlaciona con lo que anteriormente había quedado de manifiesto con la transcripción, Respecto a la proteína MyoD, es esta un proteína que favorece la miogénesis, siendo un indicador de la célula satélite activada.

Estudiando los resultados obtenidos en machos vemos como en el caso de los portadores esta proteína va incrementándose significativamente en el caso de los machos portadores, lo que parece indicar la necesidad de una regeneración de las células del musculo. Sin embargo los controles no muestran un patrón tan evidente, ya que presenta altos niveles a las 0h ($p < 0.001$) pero que decaen a continuación elevándose ligeramente al final del periodo estudiado

En el caso de las hembras el patrón es más evidente en ambos casos. Las portadoras siguen un incremento temporal como anteriormente se había observado en machos, mientras que las hembras control solo incrementan su traducción hasta las 8h sufriendo un descenso a las 24h. Este mismo patrón había sido ya observado en el caso de la miostatina.

Ya que ambas proteínas son contrapuestas, el hecho de que se repita el mismo patrón en ambas solo puede implicar que la capacidad de síntesis de proteínas en las hembras solo se mantiene hasta las 8h viéndose reducida considerablemente a las 24h.

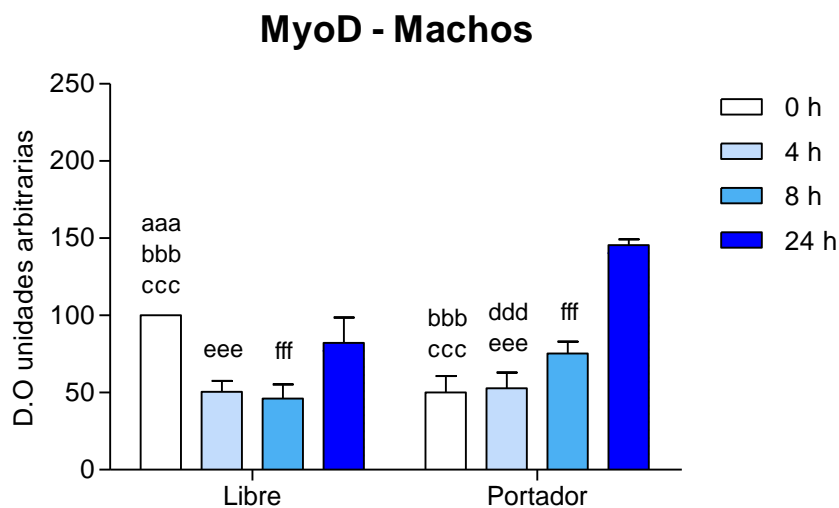


Figura 23: Densitometría de los WB MyoD (machos) normalizados con Ponceau para los dos grupos experimentales (unidades arbitrarias).

a: 0h vs. 4h; b: 0h vs. 8h; c: 0h vs. 24h; d: 4h vs. 8h; e: 4h vs. 24h; f: 8h vs. 24h. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$

Cuando analizamos la gráfica de las hembras vemos que se expresa más en libres de la mutación, donde no vemos diferencias significativas en las 0 h, las 4h y las 24h. Pero si apreciamos diferencias a las 8 horas.

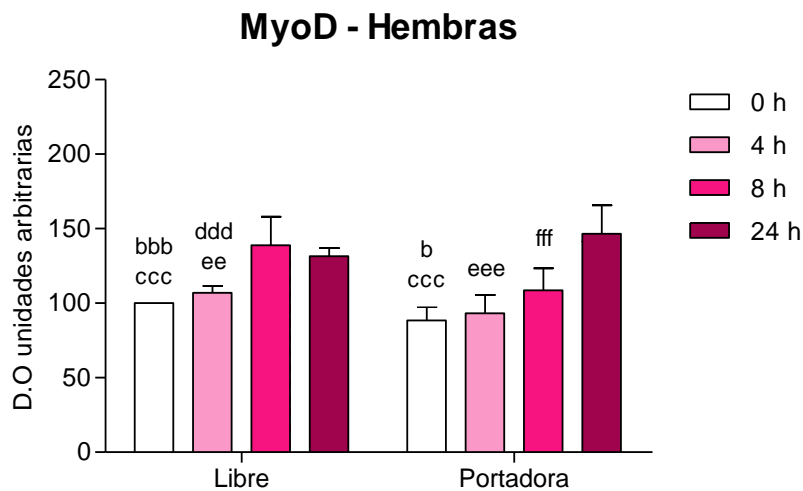


Figura 24: Densitometría de los WB MyoD (hembras) normalizados con Ponceau para los dos grupos experimentales (unidades arbitrarias).

a: 0h vs. 4h; b: 0h vs. 8h; c: 0h vs. 24h; d: 4h vs. 8h; e: 4h vs. 24h; f: 8h vs. 24h. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$

Comparando ambos sexos su producción proteica observamos que si bien la miostatina se produce en superiores concentraciones en machos que en hembras, en el caso de la proteína MyoD sucede lo contrario, tanto para controles como para individuos mutados, por lo que el comportamiento en ambos sexos es distinto favoreciéndose la inhibición del crecimiento en el caso de los machos y viéndose favorecida la miogénesis en el caso de las hembras de forma, en ambos casos altamente significativa.

Tabla 3. Efecto del sexo sobre el genotipo (libre y portador) sobre los biomarcadores de diferenciación muscular(Miostatina y MyoD (unidades arbitrarias D.O.)) medidos en el músculo LD.

	Tiempo <i>post- mortem</i>	Machos Libres	Hembras Libres	Sign.	Machos Portadores	Hembras Portadoras	Sign.
Miostatina	0 h	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	ns	169,19 ± 1,67	108,04 ± 18,44	***
	4 h	137,75 ± 20,93	86,30 ± 12,74	***	142,48 ± 12,79	91,22 ± 11,20	***
	8 h	166,04 ± 17,02	99,63 ± 3,62	***	174,92 ± 4,77	142,57 ± 10,18	***
	24 h	176,80 ± 5,64	135,94 ± 9,97	***	232,39 ± 15,74	125,22 ± 20,97	***
Myo D	0 h	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	ns	50,13 ± 10,60	88,44 ± 9,19	***
	4 h	50,45 ± 7,25	106,97 ± 4,68	***	52,76 ± 10,22	93,31 ± 12,25	***
	8 h	46,13 ± 9,11	138,84 ± 19,20	***	75,37 ± 7,65	108,74 ± 14,79	***
	24 h	82,26 ± 16,30	131,61 ± 5,45	***	145,61 ± 3,70	146,62 ± 19,09	ns

Los datos se presentan como media ± DS. ns: no significativo. *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001.

5. DISCUSIÓN

La carne porcina que se comercializa actualmente debe reunir características idóneas tanto en lo que respecta a bienestar animal hasta el sacrificio como niveles óptimos de productividad. En muchas ocasiones ambas demandas son contrapuestas. El caso que ocupa nuestro trabajo es uno de estos ejemplos en los que una canal de alta producción muscular da lugar a carne que no cumple las características organolépticas que el consumidor solicita, dando lugar a carne más pálida, blandas y exudativa de lo que sería deseable. Solo el conocimiento de las moléculas implicadas en provocar dicho efecto en las canales, permitirá mejorar sus condiciones y acercar dos aspectos de esta industria que en muchos casos parecen irreconciliables: la demanda del consumidor y las necesidades productivas del porcicultor.

El Síndrome del Gen Halotano o Hipertermia maligna provoca, como ya vimos en la introducción de este trabajo, una alta sensibilidad al estrés en estos animales y una alta mortalidad subsecuente. Son múltiples los trabajos científicos que han relacionado el estrés emocional con el estrés oxidativo (Moberg, 2001; Puppelet *al.*, 2015), ya que el estrés oxidativo se dispara ante condiciones fisiológicas inevitables y adversas.

Los individuos estudiados en este trabajo han sufrido por igual distintos tipos de estrés emocional siendo, sin lugar a dudas, el más extremo el sufrido en el momento del sacrificio. Este estrés emocional que induce estrés oxidativo parece tener un efecto muy

diferente en individuos controles y portadores a la vista de las gráficas obtenidas de daño de lípidos. Así, en el caso de los machos, vemos como los controles sufren un pico a las 0h que se reduce de forma significativa pasado en las horas siguientes y que solo vuelve a verse incrementado por el daño celular paulatino que se va produciendo en las canales y que se refleja a las 24h. Los portadores, sin embargo, mantienen niveles altos de daño a lo largo de toda la tenderización. En cuanto a las hembras, también presentan diferencias significativas entre los dos grupos experimentales, con niveles bajos y mantenidos en los controles mientras que las portadoras ven su daño oxidativo incrementarse paulatinamente a medida que la tenderización avanza, debido a las transformaciones celulares que el musculo va sufriendo, hasta alcanzar el máximo a las 24 h de tenderización con niveles incluso superiores a los obtenidos en machos. Estos resultados muestran que los portadores sufren un estrés oxidativo mayor y corroboran los observados en humanos que, portando la misma mutación, presentaban altos niveles de radicales libres debido a su miopatía (Dowling *et al.*, 2012). Pero además, el estrés parece provocar efectos dependientes de género. Y es que aunque el estrés del sacrificio afecta a todos los individuos estudiados, parece provocar un efecto más acentuado en machos que en hembras. Así, se observa que en machos, tanto controles como portadores sufren un claro estrés agudo por el sacrificio evidenciado a las 0h. Sin embargo, las hembras parecen no responder en modo alguno a ese estrés, siendo, de hecho, el punto 0 el que presenta el menor grado de estrés de todos los estudiados tanto en controles como en portadoras. El disparo del estrés psicológico parece estar regulado de forma diferencial en ambos sexos e incluso la respuesta oxidativa a dicho estrés también es distinta dependiendo del género estudiado. Esto está relacionado con el receptor de glucocorticoides presente en la mitocondria que regula la fosforilación oxidativa y que, a su vez, puede ser modulado de forma parcial por efectores de estrés (Adzic *et al.*, 2013). Esto indica que, a su vez, la actividad mitocondrial basada en ese estrés emocional e implicada en el disparo del estrés psicológico es, a su vez, diferencial en ambos sexos.

La actividad mitocondrial y, con ella, el aporte de energía, es de extrema importancia sobre todo en el caso de los portadores de la mutación del gen halotano por su especial susceptibilidad al estrés y la implicación de éste en el metabolismo celular. Así, cuando se genera un estrés, se produce un elevado aumento del metabolismo, con gran producción de calor y lactato, activándose las contracciones de la musculatura esquelética (Klug, 2013). Si esta es la respuesta habitual al estrés, éste debe ser el camino celular seguido después del sacrificio. Como el elevado metabolismo induce el

incremento del estrés oxidativo (Puppel *et al.*, 2015), es esta la razón de que veamos, tanto en machos como en hembras, mayores niveles globales de daño oxidativo en portadores comparados con sus respectivos controles, ya que los niveles totales de defensa antioxidante no se vieron significativamente incrementados, aun cuando claramente siguieron los patrones observados en el daño lipídico en todos los casos, lo que implica que el individuo aún mantiene a nivel tisular y orgánico, intactos los mecanismos de protección en respuesta al estrés oxidativo.

A su vez, si el estrés induce un incremento en la actividad metabólica que lleva acompañado un aumento de la contracción muscular, los elementos esenciales que regulan la contracción debían ser estudiados en este trabajo. Más aún si recordamos que esta mutación afecta de forma específica a la proteína esencial del canal de liberación de calcio del retículo sarcoplásmico (RyR).

Nuestro estudio a nivel transcripcional de las principales proteínas involucradas en la regulación de la liberación de calcio al citoplasma mostró niveles muy superiores en todas las proteínas estudiadas en machos en comparación con hembras, independientemente de portar o no la mutación. Esto es debido a que la producción proteica, en general, en las células musculares de los machos es superior de forma significativa a la de las hembras (Glenmark *et al.*, 2004), en las que el poder de protección de los estrógenos también afecta a una menor potencia muscular observada en ese sexo. Asimismo, los machos son capaces de producir una mayor contractibilidad de sus fibras musculares (Glenmark *et al.*, 2004), lo cual está directamente relacionado con nuestros resultados que muestran una mayor expresión de RyR en los machos tanto controles como portadores de la mutación en comparación con las hembras. En función de esta proteína que es la clave de la liberación de calcio al citoplasma, se transcriben el resto de las estudiadas. Así, se puede ver como para cada grupo experimental y cada género, la calstabilina se transcribe de forma inversa a la ryanodina (o RyR), ya que es la proteína encargada de regular la apertura y cierre de este canal. Y estos resultados, debe recalcarlos, son evidenciados tanto en controles como en experimentales, lo que implica que aunque en portadores la apertura del canal de RyR es mantenida y no regulada, su regulador se transcribe de forma correcta, aun cuando no sea capaz de inducir su cierre. Y esto es igual en hembras que en machos. Otro hecho patente a la vista de los resultados obtenidos es que la capacidad transcripcional, como antes observamos en los mecanismos protectores tisulares, se mantiene funcional en los individuos sacrificados 24 horas después de que este hecho se hubiese producido.

Sin embargo, es evidente que los individuos portadores sufren la mutación desde el punto de vista energético mucho más que los controles. Así, se puede observar muy claramente en la expresión de RyR, como, si bien se comienza a altos niveles de transcripción a las 0h, esta va cayendo, de forma abrupta en los machos y paulatinamente en el caso de las hembras, hasta niveles inferiores a sus controles respectivos a las 24h.

El caso de la transcripción de SERCA debe ser estudiado de forma aislada, ya que esta proteína, encargada de recuperar calcio para el retículo sarcoplásmico tiene una particularidad y es su necesidad de ATP para funcionar. Así, se observa como su transcripción es muy inferior en los individuos macho portadores que en las hembras, muy probablemente debido a que la reserva energética de los machos se reduce mucho más rápidamente que la de las hembras. No solo debido al papel protector de los estrógenos, ya citado anteriormente, sino y sobre todo a la reserva mitocondrial (Adzic *et al.*, 2013) que la hembra aún posee debido a su menor contractibilidad y actividad metabólica (Glenmark *et al.*, 2004)

Esta mutación que incrementa la susceptibilidad al estrés y provoca la liberación masiva de calcio al citoplasma tiene varios efectos sumatorios desde el punto de vista metabólico y energético. Por un lado, estos animales sensibles al estrés sufren caídas bruscas en sus niveles de reservas de glucógeno (Nockels *et al.*, 1996; Inmonen and Puolanne, 2000), por otro el calcio sale al citoplasma de la célula muscular uniéndose a los finos filamentos de troponina e induciendo la contracción del músculo a la vez que se une a una fosforil quinasa activando las vías glucolíticas y de síntesis de ATP necesarias para la contracción muscular. Al portar la mutación, la salida ininterrumpida de calcio provoca una contracción constante que exige reservas ilimitadas de glucógeno y actividad excesiva de la mitocondria. Esto, en el caso de los machos es más evidente que en el de las hembras, al ser su contractibilidad superior y exigir, por tanto, mayor actividad de la mitocondria (Adzic *et al.*, 2013), disminuyendo antes su capacidad de síntesis de ATP y perdiendo la posibilidad de utilizar canales dependientes de ATP como es SERCA más rápidamente que las hembras. Si bien nuestros resultados e hipótesis no pueden corroborarse en base a otros estudios realizados en tenderización ya que es el primero de este tipo en llevarse a cabo, nuestros resultados si coinciden con los realizados en pacientes portadores de esta mutación que mostraron como los hombres son más sensibles que las mujeres al daño provocado por esta mutación en los miocitos (Islander *et al.*, 2007).

La destrucción de las mitocondrias junto con la altísima tasa metabólica induce el desarrollo de vías anaerobias de consumo de glucosa dando lugar como producto final al ácido láctico. Junto con este se acumulan dióxido de carbono y potasio lo cual provoca el descenso generalizado del pH observado en estas canales de individuos portadores que es uno de los causantes de la mala calidad de la carne. Otro inductor de mala calidad es el calor que sufre el musculo debido a la alta tasa metabólica que provoca una acumulación de agua en la célula y un efecto vasodilatador. Esto último provoca la pérdida de sangre de la muestra y todo en conjunto da lugar a carnes pálidas por la dicha falta de sangre en la muestra, exudativas por el exceso de agua en su interior y excesivamente blandas debido a la rápida destrucción celular por el descenso brusco de pH.

Pero no debemos olvidar la razón primera por la que el porcicultor decidió mantener esta mutación: la hipertrofia muscular. Esta hipertrofia muscular, se debe a esta contracción constante de las fibras que debido a la dificultad por obtener energía precisa del incremento de tamaño dando lugar a la hipertrofia celular. Es superior en el caso de los machos que en las hembras en base a las razones presentadas anteriormente que indicaban la menor tasa metabólica en estas últimas. Pero esta hipertrofia enlaza directamente con las últimas dos proteínas estudiadas en este trabajo: la miostatina y la Myo D siendo ambas dos brazos esenciales de la regulación del crecimiento muscular. El crecimiento de un músculo es el resultado de un balance delicado entre los factores activadores y los inhibitorios. Entre los primeros estaría la proteína Myo D y entre los segundos la miostatina.

Nuestros resultados mostraron niveles superiores de miostatina en machos y hembras portadores en comparación con sus controles. Esto es debido a dos factores sumatorios. Por un lado, el exceso de contracción muscular, estudiado en múltiples artículos en función del ejercicio, se sabe que induce la producción de miostatina (Wilborn *et al.*, 2009) y por otro, un exceso de liberación de calcio al citoplasma vía IP3 e inducidos por IGF-1 provocan un incremento en los niveles de miostatina (Valdes *et al.*, 2013). Ambas razones, presentes en las células musculares mutadas provocan esa subida de miostatina observada.

Sin embargo, en lo que respecta a Myo D, los resultados mostraron un incremento de dicha proteína en machos portadores que no se vio reflejado en las hembras portadoras que mostraban niveles inferiores a sus controles. Parece ser que los la contractibilidad puede regular la producción no sólo de miostatina sino también de Myo D de forma dependiente a la intensidad de la contracción (Wilborn *et al.*, 2009). Así, solo grandes

intensidades de contracción son capaces de inducir a la vez miostatina y Myo D, mientras que bajas o moderadas sólo producen la expresión de miostatina. Estos resultados publicados recientemente coinciden perfectamente con nuestros datos que muestran que solo los machos con mayor contractibilidad e hipertrofia inducen ambas proteínas, mientras que las hembras con niveles medios solo ven incrementada su miostatina.

Finalmente, múltiples publicaciones han mostrado el equilibrio del crecimiento muscular que de forma fisiológica se produce entre los inductores de miogénesis y los inhibidores del crecimiento como la miostatina (Kim *et al.*, 2005). Nuestros resultados han corroborado esta información en cerdos y durante la tenderización, observándose como la miostatina regula el ciclo celular actuando sobre los niveles de Myo D de forma que se observa cómo altos niveles de miostatina se acompañan de bajos de Myo D y viceversa, en ambos grupos experimentales y ambos géneros.

En definitiva, las primeras 24 horas después del sacrificio del animal, la célula muscular es capaz de mantener sus mecanismos protectores y transcripcionales en perfecto funcionamiento, incluso en los cerdos portadores de la mutación del gen halotano que mostraron una clara susceptibilidad al estrés con incrementos dependientes de género en la transcripción de sus proteínas reguladoras de la contractibilidad que mantuvieron su balance. Solo el canal dependiente de ATP, SERCA, se vio afectado por la alta tasa metabólica que las células mutadas sufrían viéndose reducida su expresión de forma más acentuada en los machos por ser los que sufrían un gasto energético superior. Por último, el balance entre miostatina y Myo D se mantuvo en ambas condiciones y géneros aunque la síntesis de Myo D se vio regulada por los niveles de contractibilidad.

Los resultados mostrados en este trabajo permitieron explicar la razón del descenso de calidad de la carne procedente de cerdos portadores del gen halotano.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

De los resultados presentados y discutidos en el presente trabajo se han podido obtener las siguientes conclusiones:

- 1.- Las primeras 24 horas después del sacrificio la célula muscular mantiene sus capacidades fisiológicas de protección y transcripción intactas.
- 2.-La mutación en el gen halotano provoca un incremento en la tasa metabólica y en la contractibilidad de las células musculares de los machos portadores y en menor medida de las hembras portadoras en comparación con sus controles que afecta directamente a su capacidad energética.
- 3.-La razón de la baja calidad de la carne de individuos portadores del gen halotano es metabólica.
- 4.-La miostatina y la proteína Myo D se hayan reguladas en el cerdo en función de la contractibilidad.

SÍMBOLOS

SÍMBOLOS

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

AAT: Actividad Antioxidante Total.

ADN: Ácido DesoxirriboNucleico.

ADNc: Ácido DesoxirriboNucleicocomplementario.

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

AMPc: AdenosínMonofosfatoCíclico.

ARN: Ácido RiboNucléico.

ARNm: ARNmensajero.

ATP: en inglés, AdenosineTriPhosphate; en español, adenosíntrifosfato.

CRC: en inglés CalciumReleaseChannel; en español el canal de liberación del calcio

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

EROs: Especies Reactivas de Oxígeno

GAPDH:Gliceraldehido-3-Fosfato Deshidrogenasa..

kDa: kiloDalton.

LD: *Longissimusdorsi*.

LPO: LipoPerOxidación.

MCNP: Muerte Celular No Programada.

MCP: Muerte Celular Programada.

MH: Hipertermia Maligna.

NO: óxido nítrico.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

PKA: Proteína Kinasa A.

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.

qPCR: PCR cuantitativa.

RS: Retículo Sarcoplásmico.

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.

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.

WB: Western Blot

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adzic M, Lukic I, Mitic M, Djordjevic J, Elaković I, Djordjevic A, Krstic-Demonacos M, Matic G, Radojic M. 2013. Brain region- and sex-specific modulation of mitochondrial glucocorticoid receptor phosphorylation in fluoxetine treated stressed rats: effects on energy metabolism. *Psychoneuroendocrinology*: 2914-24.
- Ahn DU, Nam KC, Du M, and Jo S. 2001. Volatile production in irradiated normal, pale soft exudative (PSE) and dark firm dry (DFD) pork under different packaging and storage conditions. *Meat science* 57: 419-426.
- Arnao MB, Cano A and Acosta M 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry* 73, 239-244.
- Beriaín MJ and Lizaso G 1998. *Vacuno de Carne: Aspectos Claves*. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Buller HR, E. 2009. What can we tell consumers and retailers? In Paper to the wealfare quality final conference. Uppsala, Sweden.
- Chrystall BB and Devine CE 1985. Electrical stimulation: its early development in New Zeland. *Advances in Meat Research* 1, 73-119
- 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.
- Dode L, De Greef C, Mountain I, Attard M, Town MM, Casteels R et al:1998. Structure of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 3 gene. Promoter analysis and alternative splicing of the SERCA 3 pre-mRNA. *J BiolChem*; 273: 13982-13994.
- Dowling JJ, Arbogast S, Hur J, Nelson DD, McEvoy A, Waugh T, Marty I, Lunardi J, Brooks SV, Kuwada JY, Ferreiro A. 2012. Oxidative stress and successful antioxidant treatment in models of RYR1-related myopathy. *Am J PhysiolEndocrinolMetab*. 1115-27.
- Esterbauer H and Cheeseman KH 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 186, 407-421.
- Eusse Gómez, J. S. "La carne de cerdo. Guía para su comercialización".

- FAOSTAT 2013. In.
- Glenmark B, Nilsson M, Gao H, Gustafsson JA, Dahlman-Wright K, Westerblad H. 2004. Difference in skeletal muscle function in males vs. females: role of estrogen receptor-beta. *Am J PhysiolEndocrinolMetab*: 1125-31.
- 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.
- Hengartner MO 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.
- Hollung K, Timperio AM, Oliván M, Kemp C, Coto-Montes A, Sierra V, Zolla L. 2014 Systems biology: a new tool for farm animal science. *Curr Protein Pept Sci*. 2014 100-17.
- 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.
- Islander G, Rydenfelt K, Ranklev E, Bodelsson M. 2007. Male preponderance of patients testing positive for malignant hyperthermia susceptibility. *ActaAnaesthesiolScand*: 614-20.
- Kim JS, Cross JM, Bamman MM. 2005. Impact of resistance loading on myostatin expression and cell cycle regulation in young and older men and women. *Am J PhysiolEndocrinolMetab*: E1110-9.
- Klauke, T.N., Pineiro M, Schulze- Geisthovel S, Plattes S, Selhorst T, and Petersen B. 2013. Coherence of animal health, wealfare and carcass quality in pork production chains. *MeatScience*
- Klug E. 2013. Efecto del gen halotano sobre la calidad de la carne porcina.
- Kregel KC, and Zhang H.J. 2007 An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. 292: R18-36.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(- Delta Delta C (T)) Method. 402-8
- Majno G and Joris I 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146, 3-15.

- Minkena D., Eikeleboom G., Van Eldik P. 1977. Inheritance of MHS- susceptibility in pigs. Proceedings of the Third International Conference on Production Disease in Farm Animals, Wageningen, Netherlands, Pudoc. 203-220.
- Moberg GPM, JA. 2001. The biology of animal stress. Basic principles and implications for animal welfare. UK CABI Publishing, Oxon.309-336.
- 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, Shen H, Cory CR, and Zhang 1993. Use of a DNA-based test for the mutation associated with porcine stress syndrome (malignant hyperthermia) in 10.000 breeding swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 203: 842-851.
- O'Brien PJ 1995. The causative mutation for porcine stress syndrome. *Food Animal*, 257-269.
- 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
- Prosser BL, Khairallah RJ, Ziman AP, Ward CW, and Lederer WJ. 2013. X-ROS signaling in the heart and skeletal muscle: stretch-dependent local ROS regulates [Ca(2)(+)]_i. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 58:72-181.
- Puppel K, Kapusta A, Kuczyńska B. 2015. The etiology of oxidative stress in various of animals, a review. *J.Sci Food Agric*.2179-84.
- 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.
- Reyes-Juárez JL, and Zarain-Herzberg A. 2006. Función del retículo sarcoplásmico y su papel en las enfermedades cardiacas. *Mediagraphic*.

- 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. 2015. Effect of animal mixing as a stressor on biomarkers of autophagy and oxidative stress during pig muscle maturation. 1188-94.
- 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.
- 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.
- Tews DS 2005. Muscle-fiber apoptosis in neuromuscular diseases. *Muscle Nerve* 32, 443-458.
- Touraille T and Girard JP 1985. *Bull. Tech. C. R. Z. V. INRA, Theix.*
- Valdés JA, Flores S, Fuentes EN, Osorio-Fuentealba C, Jaimovich E, Molina A. 2013. IGF-1 induces IP3 -dependent calcium signal involved in the regulation of myostatin gene expression mediated by NFAT during myoblast differentiation. *J Cell Physiol*: 1452-63.
- 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, 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.
- Weaver AD, Bowker BC and Gerrard DE 2009. Sarcomere length influences μ -calpain mediated proteolysis of bovine myofibrils. *J Anim Sci* 87, 2096-2103.
- Wilborn CD, Taylor LW, Greenwood M, Kreider RB, Willoughby DS. 2009. Effects of different intensities of resistance exercise on regulators of myogenesis. *J. Strength Cond Res.* 2179-87.
- 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.