



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

Programa de Doctorado
Biología Molecular y Celular

**IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE CALIDAD
EN LA CARNE DE VACUNO Y PORCINO
RELACIONADOS CON SITUACIONES DE ESTRÉS**

Fernando Díaz Martínez

Tesis doctoral, 2019



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE CALIDAD EN LA CARNE DE VACUNO Y PORCINO RELACIONADOS CON SITUACIONES DE ESTRÉS	Inglés: IDENTIFICATION OF BIOMARKERS OF MEAT QUALITY IN BEEF AND PORK INFLUENCED BY STRESS
2.- Autor	
Nombre: Fernando Díaz Martínez	DNI/Pasaporte/NIE: -N
Programa de Doctorado: Biología Molecular y Celular	
Órgano responsable: Universidad de Oviedo	

RESUMEN (en español)

Durante las últimas décadas, los científicos de la carne han centrado su interés en comprender el efecto que tienen distintos factores implicados en el manejo del animal y de la canal sobre la calidad del producto. Sin embargo, aún persiste un gran problema de variabilidad inexplicada en la calidad de la carne que podría deberse a diferencias individuales en la susceptibilidad de cada animal al estrés pre-sacrificio, lo cual afectaría al proceso de conversión del músculo en carne. Las líneas de estudio más recientes para abordar este problema se centran en la identificación de biomarcadores del metabolismo muscular post-mortem que permitan predecir la calidad final del producto.

El **Objetivo** de la presente Tesis Doctoral es **estudiar el efecto de distintos factores de manejo** del animal sobre el **estrés** que sufre en el momento del sacrificio y **su influencia** sobre los procesos implicados **en la conversión del músculo en carne**, tanto en ganado porcino como vacuno, con el fin de **identificar biomarcadores potenciales de calidad**.

Para ello, se estudió el efecto de distintos factores pre-sacrificio (sexo, genotipo, sesgo cognitivo o estado emocional, sistema productivo, mezcla con animales extraños) sobre el metabolismo post-mortem del músculo (procesos energéticos, daños oxidativos y proteolíticos, muerte celular programada, proteoma) y la calidad final del producto (pH, color, pérdidas de jugo, dureza) realizándose un total de cuatro experimentos. En ellos, se tomaron muestras de sangre o cerebro en el



momento del sacrificio, para detectar biomarcadores fisiológicos de estrés, y muestras de tejido muscular en la canal a distintas horas post-mortem, para el análisis de biomarcadores del metabolismo muscular.

Primer experimento: Efecto del sexo y del genotipo (mutación del gen RYR1) sobre el estrés al sacrificio, el metabolismo muscular post-mortem y la calidad de la carne en porcino. Se aplicó un diseño factorial 2x2: sexo (masculino/femenino) y genotipo RYR1 (NN/Nn). Los resultados mostraron que las hembras tenían niveles séricos más altos de glucosa, urea, proteína C-reactiva "PCR", Pig-MAP) y glutatión-peroxidasa "GPx" y niveles más bajos de lactato. Además, las hembras mostraron una disminución post-mortem más rápida del pH muscular y carne más exudativa. La mutación RYR1 produjo un aumento en sangre de la creatinina, de la creatina quinasa y de la PCR y un descenso de la GPx. El estudio proteómico reveló además un efecto significativo del sexo y del genotipo en proteínas relacionadas con la estructura miofibrilar y la regulación de la contracción muscular (Proteína C de unión a miosina "MyBP-C"), la defensa antioxidante (Anhidrasa carbónica-3 "CAIII"), la ruta glucolítica post-mortem (β -enolasa "ENO3", Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa "GAPDH", Fosfofructoquinasa 6 muscular "PFKM" y Fosfoglicerato mutasa-2 "PGM2"), así como el transporte y almacenamiento (Albúmina "ALB") y la homeostasis celular (Adenilato quinasa isoenzima-1 "AK1"), que se correlacionan con diferencias en la calidad de la carne. El conjunto de datos indica una mayor susceptibilidad de las hembras al estrés en el sacrificio, que influye negativamente sobre la calidad final de la carne.

Segundo Experimento: Efecto del sesgo cognitivo (estado emocional) sobre el estrés psicológico del animal en el momento del sacrificio y sus consecuencias sobre el metabolismo post-mortem muscular en ganado porcino. Se utilizaron cerdos macho con sesgo positivo (positive bias, "PB") o negativo (negative bias "NB") clasificados según su capacidad de toma de decisiones. En este estudio se abordó el análisis de neurotransmisores cerebrales en diferentes áreas del cerebro. También se analizó la actividad del proteasoma muscular (20S), la defensa antioxidante (AAT), el daño oxidativo (peroxidación lipídica "LPO") y los procesos de muerte celular mediante el análisis de biomarcadores de autofagia (Beclin-1, LC3-I y LC3-II) en el tejido muscular durante la maduración post-mortem temprana (0 a 24 h). Los resultados mostraron un



efecto significativo del sesgo cognitivo sobre la susceptibilidad animal al estrés, de forma que los cerdos NB (más propensos al miedo frente a estímulos extraños) sufrieron más estrés al sacrificio, mostrando niveles más altos de serotonina en el hipocampo e inferiores de dopamina en la corteza prefrontal. Además, el músculo de los cerdos NB mostró mayor velocidad e intensidad en los mecanismos promotores de la supervivencia celular tras el sacrificio (defensa antioxidante, actividad del proteasoma y autofagia) en un intento de contrarrestar el estrés oxidativo del tejido producido por el mayor estrés en el momento del sacrificio.

Tercer experimento: Efecto de la mezcla con animales extraños en granja y durante el transporte y espera previos al sacrificio sobre el metabolismo post-mortem del músculo y la calidad de la carne en porcino. Se utilizaron cerdos macho de cruce [(Large White x Landrace) x Duroc] a los que se sometió a tratamientos que producen estrés, como la mezcla con animales extraños en granja y/o en el periodo de transporte y espera previos al sacrificio. La mezcla con animales extraños provocó estrés animal, que se tradujo en un incremento de la glucosa, la haptoglobina y la creatina quinasa en sangre según aumentó el nivel de mezcla de animales, así como de las moléculas relacionadas con el metabolismo de las grasas (LDL-colesterol y triglicéridos) en el tratamiento con doble mezcla (granja + transporte). Con respecto a las variables de calidad, se observó un descenso del pH muscular post-mortem (pH45) significativamente más rápido y mayor exudación en la carne procedente de animales sometidos a mezcla. Los cambios en el proteoma muscular afectaron a la proteína de choque térmico de 70 kDa "HSP70-1B", a proteínas del metabolismo glucolítico post-mortem (GAPDH y lactato deshidrogenasa-A "LDHA") y a proteínas relevantes en el mantenimiento de la homeostasis celular, como "AK1".

Cuarto experimento: Efecto del manejo en granja y de la mezcla con animales extraños como factores de estrés sobre el perfil proteómico muscular, la autofagia y el estrés oxidativo y su influencia en la calidad de la carne de vacuno. Se utilizaron terneros añejos macho de la raza "Asturiana de los Valles" que se distribuyeron en cuatro grupos en un diseño 2 x 2: manejo en granja (Intensivo/Semi-Extensivo) y mezcla con animales extraños antes del sacrificio (Mezcla/No-Mezcla). Los resultados indicaron mayor estrés al sacrificio en los animales criados en Intensivo y sometidos a



Mezcla con animales extraños (mayor concentración de haptoglobina en sangre, reducción rápida del ATP muscular post-mortem e incremento de la actividad antioxidante total). El manejo en granja influyó sobre la calidad de la carne de vacuno (más clara, roja y tierna en Intensivo) y sobre la susceptibilidad animal al estrés en el momento del sacrificio (mayor en Intensivo), observándose cambios en el proteoma muscular que afectaron a proteínas estructurales como Miomesina-2 “MYOM2” y otras relacionadas con la homeostasis celular (AK1), el transporte y almacenamiento (ALB), el metabolismo energético (Glucógeno fosforilasa “PYGM”, Fosfoglucomutasa-1 “PGM1”, ENO3, Creatina kinasa “CKM”, GAPDH, y Fructosa bifosfato aldolasa A “ALDOA”) y la autofagia (Beclin-1). La Mezcla con animales extraños produjo un agotamiento más rápido de la energía muscular y cambios en proteínas del metabolismo energético (Enzima desramificadora del glucógeno “GDBE”, PYGM, PGM1, Piruvato kinasa “PKM”, GAPDH, CKM, Triosa fosfato isomerasa “TPI”), proteínas de transporte (precursor de Serotransferrina “TF”) y autofagia (relación LC3-II/LC3-I).

En **global**, en los distintos estudios realizados se ha podido demostrar que tanto factores intrínsecos como ciertos factores de manejo pueden incrementar la susceptibilidad animal al estrés en el momento del sacrificio y producir cambios significativos en el metabolismo muscular post-mortem y por consiguiente, en la calidad de la carne. En este sentido, la aplicación de estudios proteómicos ha permitido identificar cambios significativos en proteínas y fragmentos peptídicos vinculados al metabolismo glucolítico post-mortem, la glucogenólisis, el mantenimiento de la homeostasis celular, el estrés oxidativo y la autofagia, además de cambios en algunas proteínas estructurales. Estos resultados indican la posibilidad de utilizar los biomarcadores de estos procesos celulares como biomarcadores potenciales del estrés peri-sacrificio y en definitiva de la calidad. No obstante, la gran variabilidad de situaciones de manejo y la propia variabilidad individual inherente a los animales no han permitido por el momento identificar un marcador universal para predecir la calidad final de la carne.



RESUMEN (en Inglés)

During the last decades, meat scientists have focused their interest in understanding the effect of different factors related to the animal management and carcasses conservation on the process of meat quality acquisition. However, there is still unexplained variability of meat quality that could be due to differences in the animal's individual susceptibility to stress at slaughter, which would affect the process of conversion of muscle into meat. The research in this field have been focused on the identification of biomarkers of the post-mortem muscle metabolism that allow to detect stress at slaughter and to predict the ultimate product quality.

The **objective** of this Thesis is to study the effect of different factors of animal management and their influence on the animal stress at slaughter and on the processes involved in the muscle-to-meat conversion, in pigs and cattle, in order to identify potential biomarkers of meat quality.

For this purpose, we studied the effect of different pre-slaughter factors (sex, genotype, cognitive bias or emotional state, productive system, mixing unfamiliar animals) on the post-mortem muscle metabolism (energetic, oxidative and proteolytic processes, programmed cell death, proteome changes) and meat quality traits (pH, color, drip loss, toughness) within a total of four experiments. For each of them, blood or brain samples were collected at slaughter in order to detect biomarkers of physiological stress, and muscle tissue were also taken from the carcasses at different post-mortem time, to analyze biomarkers of the muscle metabolism.

First experiment: Effect of sex and genotype (mutation of the RYR1 gene) of stress at slaughter, post-mortem muscle metabolism and meat quality in pigs. A 2x2 factorial design was applied: sex (male/female) and genotype RYR1 (NN/Nn). The results showed that the females had higher serum levels of glucose, urea, Protein C-reactive "PCR", Pig-MAP and glutathione-peroxidase "GPx" and lower levels of lactate. Furthermore, the females showed a faster post-mortem decrease in muscle pH and more exudative meat. RYR1 mutation increased serum creatinine, creatine kinase and PCR and decreased GPx. The proteomic study showed significant effect of sex and genotype on proteins related to the myofibrillar structure and regulation of the muscle contraction (myosin binding protein C "MyBP-C"), the antioxidant defense (Carbonic



anhydrase-3 "CAIII"), the post-mortem glycolytic pathway (β -enolase "ENO3", glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase "GAPDH", muscle Phosphofructokinase 6 "PFKM" and Phosphoglycerate mutase-2 "PGM2"), transport and storage (Albumin "ALB") and cell homeostasis (Adenylate kinase isoenzyme-1 "AK1"), that correlate with differences in meat quality. The data set showed a higher susceptibility of females to stress at slaughter with a negative impact on meat quality.

Second Experiment: Effect of cognitive bias (emotional state) on the animal psychological stress at slaughter time and its consequences on post-mortem muscle metabolism in pigs. Male pigs with positive bias (positive bias, "PB") or negative (negative bias, "NB") were classified according to their own decision-making capacity. In this study, brain neurotransmitters were measured at different areas of the brain. Moreover, muscle proteasome activity (20S), total antioxidant defense (TAA), oxidative damage (lipid peroxidation "LPO") and autophagy biomarkers (Beclin-1, LC3- I and LC3- II) were analyzed in muscle tissue during early post-mortem maturation (0 to 24 h). The results showed a cognitive bias significant effect on the animal's susceptibility to stress, as NB pigs suffered more stress at slaughter, showing higher levels of serotonin in the hippocampus and lower levels of dopamine in the prefrontal cortex. Moreover, the muscle of the NB pigs showed quicker and more intense cell survival mechanisms after slaughter (antioxidant defense, proteasome activity and autophagy) as a response to counteract the greater oxidative stress of the tissue produced by the greater stress at slaughter.

Third experiment: Effect of mixing unfamiliar animals at farm and during the transport and lairage prior to slaughter on the muscle post-mortem metabolism and pork quality. Male crossbred pigs [(Large White x Landrace) x Duroc] were subjected to different treatments that produce stress such as mixing unfamiliar animals at farm and/or during the transport and lairage prior to slaughter. Mixing unfamiliar animals caused animal stress, which resulted in a marked increase of serum glucose, haptoglobin and creatine kinase, as the level of animal mixing increased, as well as the molecules related to the lipid metabolism (LDL-cholesterol and triglycerides) in the double mixing treatment (farm + transport). Regarding meat quality, meat from the mixing treatments showed faster decrease of post-mortem muscle pH (pH₄₅) and



higher exudation. Changes in the muscle proteome changes affected to the heat shock protein of 70 kDa "HSP70-1B", to proteins of the post-mortem glycolytic metabolism (GAPDH and lactate dehydrogenase-A "LDHA") and to proteins with a relevant role in the maintenance of cell energy homeostasis, like AK1.

Fourth experiment: Effect of farm management and mixing with unfamiliar animals as stressors on the muscle proteomic profile, autophagy and oxidative stress and its influence on beef quality. Yearling bulls of "Asturiana de los Valles" were divided into four groups in a 2x2 design: farm management (Intensive/Semi-extensive) and mixing with unfamiliar animals prior to slaughter (Mixing/Unmixing). The results indicated higher level of stress at slaughter in the Intensive-Mixing group (higher concentration of serum haptoglobin, faster reduction of post-mortem muscle ATP and increase of total antioxidant activity). Farm management affected to meat quality (meat was lighter, more red and more tender in Intensive) and to the animal's susceptibility to stress at slaughter (higher in Intensive), with changes in the muscle proteome affecting to structural proteins like Myomesin-2 (MYOM2) and others related to cell homeostasis (AK1), transport and storage (ALB), energy metabolism (Phosphorylase, glycogen "PYGM", Phosphoglucomutase-1 "PGM1", ENO3, Creatine kinase "CKM", GAPDH and Fructose-bisphosphate aldolase A "ALDOA") and autophagy (Beclin-1). Mixing treatment produced faster cell energy exhaustion and changes in proteins of the energy metabolism (Glycogen debranching enzyme "GDBE", PYGM, PGM1, Piruvate kinase "PKM", GAPDH, CKM, Triosephosphate isomerase "TPI"), proteins of transport (Serotransferrin precursor "TF") and autophagy (ratio LC3-II/LC3-I).

Overall, the different studies have shown that genetic and management factors can increase animal susceptibility to stress at slaughter and promote changes in the post-mortem muscle metabolism and the ultimate meat quality. In this way, the application of proteomic studies has allowed the identification of significant changes in proteins and peptide fragments related to the post-mortem glycolytic metabolism, glycogenolysis, maintenance of the cell homeostasis, oxidative stress and autophagy, as well as changes in some structural proteins. These results indicate the possibility of using the biomarkers of these cell processes as potential biomarkers of peri-slaughter stress and ultimately as biomarkers of meat quality. However, the great variability of management situations and the individual inherent animal variability have not allowed



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

yet to identify a universal biomarker to predict the ultimate meat quality.

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO
EN _____



Universidad de Oviedo

Universidá d'Uviéu

University of Oviedo

IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE CALIDAD EN LA CARNE DE VACUNO Y PORCINO RELACIONADOS CON SITUACIONES DE ESTRÉS

Fernando Díaz Martínez

Tesis realizada en el Área de Sistemas de Producción Animal del SERIDA y en el Departamento de Morfología y Biología Celular de la Universidad de Oviedo

Directoras:

Dra. María del Carmen Oliván García

Investigadora

Área de Sistemas de Producción Animal

Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA)

Dra. Verónica Sierra Sánchez

Investigadora

Área de Sistemas de Producción Animal

Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA)

Financiación:

El autor de esta Tesis ha tenido un contrato en prácticas de dos años de duración (2016-2017) en el Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario del Principado de Asturias (SERIDA), financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (Ayudas para la Promoción de empleo Joven e Implantación de la Garantía Juvenil en I+D+I), con el título “Refuerzo en la Implementación de metodologías innovadoras para la aplicación de la Proteómica en la Investigación Agroalimentaria” con código PEJ-2014-P-01094.

Este contrato le ha permitido desarrollar su Tesis Doctoral en el marco de varios proyectos de investigación:

-“Identificación de Biomarcadores de Estrés en distintas razas autóctonas de VACuno (IBERVAC) asociados con la calidad de la carne”, financiado por el INIA (Instituto de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria) con código RTA2014-00034-C04-01.

-“Identificación de biomarcadores de calidad en la carne relacionados con el estrés ante- y peri-sacrificio”, financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación, con código AGL2011-30598-C03-03.

-“Identificación de biomarcadores de calidad en la carne relacionados con el estrés celular ante- y peri-sacrificio”, financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación, con código AGL2010-21578-C03-02.

El autor de esta Tesis agradece al SERIDA y a la Universidad de Oviedo por poner a su disposición los medios materiales y humanos necesarios para el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

Publicaciones generadas:

Comunicaciones a congresos:

Díaz, F., Díaz-Luis, A., Sierra, V., Diñeiro, Y., González, P., Sentandreu, M. A. and Oliván, M. (2018). Effect of farm management and mixing animals as stressors on the muscle biomarkers of autophagy and oxidative stress in beef. En: International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST), Melbourne (Australia).

Sierra, V., Díaz, F., Diñeiro, Y., Franco, D., Zapata, C., García-Torres, S., Tejerina, D., Sentandreu, M. A. and Oliván, M. (2018). Optimization of sampling time for the detection of proteomic changes related to beef quality. En: International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST), Melbourne (Australia).

Díaz, F., Potes, Y., González, J., Arroyo, L., Peña, R., Bassols, A., Coto-Montes, A., Carreras, R., Velarde, A., Oliván, M. (2016). Effect of post-mortem time on the muscle proteome and its relationship to meat quality and animal welfare. En: 6th Congress of the Spanish Proteomics Society (P 144) Cádiz (España).

Artículos científicos:

Díaz, F., Díaz-Luis, A., Sierra, V., Diñeiro, Y., González, P., García-Torres, S., Tejerina, D., Cabeza de Vaca, M., Coto-Montes, A., Oliván, M. (2018). Effect of farm management and mixing animals as stressors on muscle biomarkers of autophagy and oxidative stress and on the ultimate beef quality of Asturiana de los Valles breed. *Journal of Proteomics* (in press).

Oliván, M., González, J., Bassols, A., Díaz, F., Carreras, R., Mainau, E., Velarde, A. (2018). Effect of sex and RYR1 gene mutation on the muscle proteomic profile and main physiological biomarkers in pigs at slaughter. *Meat Science*, 141, 81-90.

Potes, Y., Oliván, M., Rubio-González, A., de Luxán-Delgado, B., Díaz, F., Sierra, V., Coto-Montes, A. (2017). Pig cognitive bias affects the conversion of muscle into meat by antioxidant and autophagy mechanisms. *Animal*, 1-9.

Oliván, M., Fernández-Suárez, V., Díaz, F., Sierra, V., Coto-Montes, A., Luxán-Delgado, B., Velarde, A. (2016). Identification of Biomarkers of Stress in Meat of Pigs Managed under Different Mixing Treatments. *British Biotechnology Journal*, 11(1), 1-13.

Capítulos de Libro:

Oliván, M., Sierra, V., Díaz, F. (2016). El proteoma muscular y su papel en la transformación del músculo en carne: un nuevo enfoque para abordar el estudio de la calidad de la carne. En: "Avances de Investigación en Tecnología y Ciencia de la Carne", bajo la Co edición entre la Universidad Autónoma del Estado de México y la Editorial, Ediciones Gráficos Eón, Notabilis Scientia.

Oliván, M., Díaz, F., Potes, Y., Diñeiro, Y., Rubio-González, A., Coto-Montes, A. (2016). Identificación de biomarcadores de calidad en la carne relacionados con el estrés pre-sacrificio. En: "Avances de Investigación en Tecnología y Ciencia de la Carne", bajo la Co edición entre la Universidad Autónoma del Estado de México y la Editorial, Ediciones Gráficos Eón, Notabilis Scientia.

Artículos divulgativos:

Oliván, M., Díaz, F., Potes, Y., Rubio-González, A., Coto-Montes, A. (2016). Identificación en la carne de biomarcadores de estrés animal. *Tecnología Agroalimentaria. Boletín Informativo del SERIDA*, 17, 28-33.

Resumen

Durante las últimas décadas, los científicos de la carne han centrado su interés en comprender el efecto que tienen distintos factores implicados en el manejo del animal y de la canal sobre la calidad del producto. Sin embargo, aún persiste un gran problema de variabilidad inexplicada en la calidad de la carne que podría deberse a diferencias individuales en la susceptibilidad de cada animal al estrés pre-sacrificio, lo cual afectaría al proceso de conversión del músculo en carne. Las líneas de estudio más recientes para abordar este problema se centran en la identificación de biomarcadores del metabolismo muscular post-mortem que permitan predecir la calidad final del producto.

El **Objetivo** de la presente Tesis Doctoral es **estudiar el efecto de distintos factores de manejo** del animal sobre el **estrés** que sufre en el momento del sacrificio y **su influencia** sobre los procesos implicados **en la conversión del músculo en carne**, tanto en ganado porcino como vacuno, con el fin de **identificar biomarcadores potenciales de calidad**.

Para ello, se estudió el efecto de distintos factores pre-sacrificio (sexo, genotipo, sesgo cognitivo o estado emocional, sistema productivo, mezcla con animales extraños) sobre el metabolismo post-mortem del músculo (procesos energéticos, daños oxidativos y proteolíticos, muerte celular programada, proteoma) y la calidad final del producto (pH, color, pérdidas de jugo, dureza) realizándose un total de cuatro experimentos. En ellos, se tomaron muestras de sangre o cerebro en el momento del sacrificio, para detectar biomarcadores fisiológicos de estrés, y muestras de tejido muscular en la canal a distintas horas post-mortem, para el análisis de biomarcadores del metabolismo muscular.

Primer experimento: Efecto del sexo y del genotipo (mutación del gen RYR1) sobre el estrés al sacrificio, el metabolismo muscular post-mortem y la calidad de la carne en porcino. Se aplicó un diseño factorial 2x2: sexo (masculino/femenino) y genotipo RYR1 (NN/Nn). Los resultados mostraron que las hembras tenían niveles séricos más altos de glucosa, urea, proteína C-reactiva "PCR", Pig-MAP) y glutatió-

peroxidasa "GPx" y niveles más bajos de lactato. Además, las hembras mostraron una disminución post-mortem más rápida del pH muscular y carne más exudativa. La mutación RYR1 produjo un aumento en sangre de la creatinina, de la creatina quinasa y de la PCR y un descenso de la GPx. El estudio proteómico reveló además un efecto significativo del sexo y del genotipo en proteínas relacionadas con la estructura miofibrilar y la regulación de la contracción muscular (Proteína C de unión a miosina "MyBP-C"), la defensa antioxidante (Anhidrasa carbónica-3 "CAIII"), la ruta glucolítica post-mortem (β -enolasa "ENO3", Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa "GAPDH", Fosfofructoquinasa 6 muscular "PFKM" y Fosfoglicerato mutasa-2 "PGM2"), así como el transporte y almacenamiento (Albúmina "ALB") y la homeostasis celular (Adenilato quinasa isoenzima-1 "AK1"), que se correlacionan con diferencias en la calidad de la carne. El conjunto de datos indica una mayor susceptibilidad de las hembras al estrés en el sacrificio, que influye negativamente sobre la calidad final de la carne.

Segundo Experimento: Efecto del sesgo cognitivo (estado emocional) sobre el estrés psicológico del animal en el momento del sacrificio y sus consecuencias sobre el metabolismo post-mortem muscular en ganado porcino. Se utilizaron cerdos macho con sesgo positivo (positive bias, "PB") o negativo (negative bias "NB") clasificados según su capacidad de toma de decisiones. En este estudio se abordó el análisis de neurotransmisores cerebrales en diferentes áreas del cerebro. También se analizó la actividad del proteasoma muscular (20S), la defensa antioxidante (AAT), el daño oxidativo (peroxidación lipídica "LPO") y los procesos de muerte celular mediante el análisis de biomarcadores de autofagia (Beclin-1, LC3-I y LC3-II) en el tejido muscular durante la maduración post-mortem temprana (0 a 24 h). Los resultados mostraron un efecto significativo del sesgo cognitivo sobre la susceptibilidad animal al estrés, de forma que los cerdos NB (más propensos al miedo frente a estímulos extraños) sufrieron más estrés al sacrificio, mostrando niveles más altos de serotonina en el hipocampo e inferiores de dopamina en la corteza prefrontal. Además, el músculo de los cerdos NB mostró mayor velocidad e intensidad en los mecanismos promotores de la supervivencia celular tras el sacrificio (defensa antioxidante, actividad del proteasoma y autofagia) en un intento de contrarrestar el estrés oxidativo del tejido producido por el mayor estrés en el momento del sacrificio.

Tercer experimento: Efecto de la mezcla con animales extraños en granja y durante el transporte y espera previos al sacrificio sobre el metabolismo post-mortem del músculo y la calidad de la carne en porcino. Se utilizaron cerdos macho de cruce [(Large White x Landrace) x Duroc] a los que se sometió a tratamientos que producen estrés, como la mezcla con animales extraños en granja y/o en el periodo de transporte y espera previos al sacrificio. La mezcla con animales extraños provocó estrés animal, que se tradujo en un incremento de la glucosa, la haptoglobina y la creatina quinasa en sangre según aumentó el nivel de mezcla de animales, así como de las moléculas relacionadas con el metabolismo de las grasas (LDL-colesterol y triglicéridos) en el tratamiento con doble mezcla (granja + transporte). Con respecto a las variables de calidad, se observó un descenso del pH muscular post-mortem (pH45) significativamente más rápido y mayor exudación en la carne procedente de animales sometidos a mezcla. Los cambios en el proteoma muscular afectaron a la proteína de choque térmico de 70 kDa “HSP70-1B”, a proteínas del metabolismo glucolítico post-mortem (GAPDH y lactato deshidrogenasa-A “LDHA”) y a proteínas relevantes en el mantenimiento de la homeostasis celular, como “AK1”.

Cuarto experimento: Efecto del manejo en granja y de la mezcla con animales extraños como factores de estrés sobre el perfil proteómico muscular, la autofagia y el estrés oxidativo y su influencia en la calidad de la carne de vacuno. Se utilizaron terneros añejos macho de la raza "Asturiana de los Valles" que se distribuyeron en cuatro grupos en un diseño 2 x 2: manejo en granja (Intensivo/Semi-Extensivo) y mezcla con animales extraños antes del sacrificio (Mezcla/No-Mezcla). Los resultados indicaron mayor estrés al sacrificio en los animales criados en Intensivo y sometidos a Mezcla con animales extraños (mayor concentración de haptoglobina en sangre, reducción rápida del ATP muscular post-mortem e incremento de la actividad antioxidante total). El manejo en granja influyó sobre la calidad de la carne de vacuno (más clara, roja y tierna en Intensivo) y sobre la susceptibilidad animal al estrés en el momento del sacrificio (mayor en Intensivo), observándose cambios en el proteoma muscular que afectaron a proteínas estructurales como Miomesina-2 “MYOM2” y otras relacionadas con la homeostasis celular (AK1), el transporte y almacenamiento (ALB), el metabolismo energético (Glucógeno fosforilasa “PYGM”, Fosfoglucomutasa-1

“PGM1”, ENO3, Creatina kinasa “CKM”, GAPDH, y Fructosa bifosfato aldolasa A “ALDOA”) y la autofagia (Beclin-1). La Mezcla con animales extraños produjo un agotamiento más rápido de la energía muscular y cambios en proteínas del metabolismo energético (Enzima desramificadora del glucógeno “GDBE”, PYGM, PGM1, Piruvato kinasa “PKM”, GAPDH, CKM, Triosa fosfato isomerasa “TPI”), proteínas de transporte (precursor de Serotransferrina “TF”) y autofagia (relación LC3-II/LC3-I).

En *global*, en los distintos estudios realizados se ha podido demostrar que tanto factores intrínsecos como ciertos factores de manejo pueden incrementar la susceptibilidad animal al estrés en el momento del sacrificio y producir cambios significativos en el metabolismo muscular post-mortem y por consiguiente, en la calidad de la carne. En este sentido, la aplicación de estudios proteómicos ha permitido identificar cambios significativos en proteínas y fragmentos peptídicos vinculados al metabolismo glucolítico post-mortem, la glucogenólisis, el mantenimiento de la homeostasis celular, el estrés oxidativo y la autofagia, además de cambios en algunas proteínas estructurales. Estos resultados indican la posibilidad de utilizar los biomarcadores de estos procesos celulares como biomarcadores potenciales del estrés peri-sacrificio y en definitiva de la calidad. No obstante, la gran variabilidad de situaciones de manejo y la propia variabilidad individual inherente a los animales no han permitido por el momento identificar un marcador universal para predecir la calidad final de la carne.

Summary

During the last decades, meat scientists have focused their interest in understanding the effect of different factors related to the animal management and carcasses conservation on the process of meat quality acquisition. However, there is still unexplained variability of meat quality that could be due to differences in the animal's individual susceptibility to stress at slaughter, which would affect the process of conversion of muscle into meat. The research in this field have been focused on the identification of biomarkers of the post-mortem muscle metabolism that allow to detect stress at slaughter and to predict the ultimate product quality.

The **objective** of this Thesis is to study the effect of different factors of animal management and their influence on the animal stress at slaughter and on the processes involved in the muscle-to-meat conversion, in pigs and cattle, in order to identify potential biomarkers of meat quality.

For this purpose, we studied the effect of different pre-slaughter factors (sex, genotype, cognitive bias or emotional state, productive system, mixing unfamiliar animals) on the post-mortem muscle metabolism (energetic, oxidative and proteolytic processes, programmed cell death, proteome changes) and meat quality traits (pH, color, drip loss, toughness) within a total of four experiments. For each of them, blood or brain samples were collected at slaughter in order to detect biomarkers of physiological stress, and muscle tissue were also taken from the carcasses at different post-mortem time, to analyze biomarkers of the muscle metabolism.

First experiment: Effect of sex and genotype (mutation of the RYR1 gene) of stress at slaughter, post-mortem muscle metabolism and meat quality in pigs. A 2x2 factorial design was applied: sex (male/female) and genotype RYR1 (NN/Nn). The results showed that the females had higher serum levels of glucose, urea, Protein C-reactive "PCR", Pig-MAP and glutathione-peroxidase "GPx" and lower levels of lactate. Furthermore, the females showed a faster post-mortem decrease in muscle pH and more exudative meat. RYR1 mutation increased serum creatinine, creatine kinase and PCR and decreased GPx. The proteomic study showed significant effect of sex and

genotype on proteins related to the myofibrillar structure and regulation of the muscle contraction (myosin binding protein C "MyBP-C"), the antioxidant defense (Carbonic anhydrase-3 "CAIII"), the post-mortem glycolytic pathway (β -enolase "ENO3", glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase "GAPDH", muscle Phosphofructokinase 6 "PFKM" and Phosphoglycerate mutase-2 "PGM2"), transport and storage (Albumin "ALB") and cell homeostasis (Adenylate kinase isoenzyme-1 "AK1"), that correlate with differences in meat quality. The data set showed a higher susceptibility of females to stress at slaughter with a negative impact on meat quality.

Second Experiment: Effect of cognitive bias (emotional state) on the animal psychological stress at slaughter time and its consequences on post-mortem muscle metabolism in pigs. Male pigs with positive bias (positive bias, "PB") or negative (negative bias, "NB") were classified according to their own decision-making capacity. In this study, brain neurotransmitters were measured at different areas of the brain. Moreover, muscle proteasome activity (20S), total antioxidant defense (TAA), oxidative damage (lipid peroxidation "LPO") and autophagy biomarkers (Beclin-1, LC3- I and LC3- II) were analyzed in muscle tissue during early post-mortem maturation (0 to 24 h). The results showed a cognitive bias significant effect on the animal's susceptibility to stress, as NB pigs suffered more stress at slaughter, showing higher levels of serotonin in the hippocampus and lower levels of dopamine in the prefrontal cortex. Moreover, the muscle of the NB pigs showed quicker and more intense cell survival mechanisms after slaughter (antioxidant defense, proteasome activity and autophagy) as a response to counteract the greater oxidative stress of the tissue produced by the greater stress at slaughter.

Third experiment: Effect of mixing unfamiliar animals at farm and during the transport and lairage prior to slaughter on the muscle post-mortem metabolism and pork quality. Male crossbred pigs [(Large White x Landrace) x Duroc] were subjected to different treatments that produce stress such as mixing unfamiliar animals at farm and/or during the transport and lairage prior to slaughter. Mixing unfamiliar animals caused animal stress, which resulted in a marked increase of serum glucose, haptoglobin and creatine kinase, as the level of animal mixing increased, as well as the molecules related to the lipid metabolism (LDL-cholesterol and triglycerides) in the

double mixing treatment (farm + transport). Regarding meat quality, meat from the mixing treatments showed faster decrease of post-mortem muscle pH (pH₄₅) and higher exudation. Changes in the muscle proteome changes affected to the heat shock protein of 70 kDa "HSP70-1B", to proteins of the post-mortem glycolytic metabolism (GAPDH and lactate dehydrogenase-A "LDHA") and to proteins with a relevant role in the maintenance of cell energy homeostasis, like AK1.

Fourth experiment: Effect of farm management and mixing with unfamiliar animals as stressors on the muscle proteomic profile, autophagy and oxidative stress and its influence on beef quality. Yearling bulls of "Asturiana de los Valles" were divided into four groups in a 2x2 design: farm management (Intensive/Semi-extensive) and mixing with unfamiliar animals prior to slaughter (Mixing/Unmixing). The results indicated higher level of stress at slaughter in the Intensive-Mixing group (higher concentration of serum haptoglobin, faster reduction of post-mortem muscle ATP and increase of total antioxidant activity). Farm management affected to meat quality (meat was lighter, more red and more tender in Intensive) and to the animal's susceptibility to stress at slaughter (higher in Intensive), with changes in the muscle proteome affecting to structural proteins like Myomesin-2 (MYOM2) and others related to cell homeostasis (AK-1), transport and storage (ALB), energy metabolism (Phosphorylase, glycogen "PYGM", Phosphoglucomutase-1 "PGM1", ENO3, Creatine kinase "CKM", GAPDH and Fructose-bisphosphate aldolase A "ALDOA") and autophagy (Beclin-1). Mixing treatment produced faster cell energy exhaustion and changes in proteins of the energy metabolism (Glycogen debranching enzyme "GDBE", PYGM, PGM1, Piruvate kinase "PKM", GAPDH, CKM, Triosephosphate isomerase "TPI"), proteins of transport (Serotransferrin precursor "TF") and autophagy (ratio LC3-II/LC3-I).

Overall, the different studies have shown that genetic and management factors can increase animal susceptibility to stress at slaughter and promote changes in the post-mortem muscle metabolism and the ultimate meat quality. In this way, the application of proteomic studies has allowed the identification of significant changes in proteins and peptide fragments related to the post-mortem glycolytic metabolism, glycogenolysis, maintenance of the cell homeostasis, oxidative stress and autophagy, as well as changes in some structural proteins. These results indicate the possibility of

using the biomarkers of these cell processes as potential biomarkers of peri-slaughter stress and ultimately as biomarkers of meat quality. However, the great variability of management situations and the individual inherent animal variability have not allowed yet to identify a universal biomarker to predict the ultimate meat quality.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Situación actual del sector cárnico.....	2
1.2. El músculo y su transformación en carne	4
1.2.1. Pre-rigor	8
1.2.2. Rigor mortis.....	8
1.2.3. Post-rigor (Maduración y Tenderización).....	9
1.3. Calidad de la carne y parámetros indicativos	10
1.4. Factores que influyen en la calidad de la carne	14
1.4.1. Factores Ante-mortem	14
1.4.2. Factores Peri-mortem	20
1.4.3. Factores Post-mortem.....	24
1.5. Efecto del bienestar/estrés en la calidad	26
1.6. Biomarcadores de estrés.....	28
1.6.1. Biomarcadores de estrés oxidativo	30
1.6.2. Daño oxidativo a lípidos	31
1.6.3. Defensa antioxidante celular	32
1.6.4. Relación entre el estrés oxidativo y la calidad de la carne	33
1.7. Muerte celular programada	34
1.7.1. Autofagia	34
1.7.2. Apoptosis.....	36
1.7.3. Necrosis	38
1.8. Biomarcadores de calidad: Aplicación de la proteómica	39
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS.....	42
CAPÍTULO 3: EFECTO DEL SEXO Y DEL GENOTIPO (MUTACIÓN DEL GEN RYR1) SOBRE EL ESTRÉS AL SACRIFICIO, EL METABOLISMO MUSCULAR POST-MORTEM Y LA CALIDAD FINAL DE LA CARNE EN PORCINO	44
1. Introducción	45
2. Material y métodos	46
2.1. Animales y manejo	46
2.2. Toma de muestras y medidas de calidad de carne	47
2.3. Parámetros bioquímicos y fisiológicos en la sangre.....	48

2.4. Extracción proteica de la fracción sarcoplásmica y electroforesis.....	49
2.5. Análisis de imagen e identificación de proteínas por huella peptídica.....	50
2.6. Análisis estadístico	52
3. Resultados y discusión	53
3.1. Canal y calidad de la carne	53
3.2. Variables bioquímicas en la sangre	56
3.3. Proteínas musculares	59
3.4. Efecto del sexo	60
3.5. Efecto del genotipo	61
3.6. Interacción sexo y genotipo	66
3.7. Análisis multivariante	67
CAPÍTULO 4: EFECTO DEL SESGO COGNITIVO (ESTADO EMOCIONAL) SOBRE EL ESTRÉS PSICOLÓGICO DEL ANIMAL EN EL MOMENTO DEL SACRIFICIO Y SUS CONSECUENCIAS SOBRE EL METABOLISMO POST-MORTEM MUSCULAR EN GANADO PORCINO	70
1. Introducción	71
2. Material y métodos	72
2.1. Animales y manejo	72
2.2. Recogida de muestras	74
2.3. Análisis de neurotransmisores cerebrales	74
2.4. Marcadores estrés oxidativo.....	77
2.5. Ensayo de actividad del Proteasoma.....	77
2.6. Análisis de marcadores autofágicos (Western-blot) en el músculo.....	78
2.7. Análisis estadístico	78
3. Resultados y Discusión	79
CAPÍTULO 5: EFECTO DE LA MEZCLA CON ANIMALES EXTRAÑOS EN GRANJA Y DURANTE EL TRANSPORTE Y ESPERA PREVIOS AL SACRIFICIO SOBRE EL METABOLISMO POST-MORTEM DEL MÚSCULO Y LA CALIDAD DE LA CARNE EN PORCINO	90
1. Introducción	91
2. Material y métodos	92
2.1. Animales y manejo	92
2.2. Toma de muestras y medidas de calidad en matadero	93
2.3. Parámetros bioquímicos y fisiológicos en la sangre.....	93
2.4. Actividad antioxidante del músculo	94
2.5. Extracción proteica de la fracción sarcoplásmica y electroforesis.....	95
2.6. Análisis de imagen e identificación de proteínas por huella peptídica.....	96

2.7. Análisis estadístico	97
3. Resultados y discusión	98
3.1. Parámetros de calidad de la carne	98
3.2. Parámetros bioquímicos y fisiológicos	100
3.3. Patrón electroforético de los extractos musculares	101
3.4. Relación entre los parámetros de calidad de la carne y las variables bioquímicas y electroforéticas	107
CAPÍTULO 6: EFECTO DEL MANEJO EN GRANJA Y DE LA MEZCLA CON ANIMALES EXTRAÑOS COMO FACTORES DE ESTRÉS SOBRE EL PERFIL PROTEÓMICO MUSCULAR, LA AUTOFAGIA Y EL ESTRÉS OXIDATIVO Y SU INFLUENCIA EN LA CALIDAD DE LA CARNE DE VACUNO	109
1. Introducción	110
2. Material y métodos	112
2.1. Animales y manejo experimental	112
2.2. Recogida de sangre	113
2.3. Parámetros bioquímicos y fisiológicos de la sangre	113
2.4. Toma de muestras musculares y mediciones de calidad de la carne	113
2.5. Mediciones bioquímicas musculares	115
2.6. Western Blot muscular	115
2.7. Separación de proteínas sarcoplásmicas (SDS-PAGE) e identificación.	117
2.8. Análisis de imágenes e identificación de proteína	117
2.9. Análisis estadístico de resultados	119
3. Resultados y discusión	119
3.1. Parámetros bioquímicos y fisiológicos en sangre	120
3.2. Canal y calidad de carne	121
3.3. Biomarcadores de energía celular, estrés oxidativo y autofagia	124
3.4. Proteínas musculares	128
3.5. Efecto del manejo en granja	130
3.6. Efecto mezcla de animales desconocidos	133
3.7. Efecto del tiempo post-mortem	134
3.8. Análisis multivariante	134
CAPÍTULO 7: DISCUSIÓN GENERAL	139
CAPÍTULO 8: CONCLUSIONES	153
CAPÍTULO 9: BIBLIOGRAFÍA.....	155
CAPÍTULO 10: ANEXOS	183

Abreviaturas

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

5HIAA: Ácido hidroxindolacético.

5HT: Serotonina.

AAT: Actividad antioxidante total.

ACIII: Anhidrasa carbónica 3.

ACTH: Hormona adrenocorticotrófica.

ADP: Adenosín bifosfato.

AK1: Adenilato quinasa isoforma 1.

ALB: Albúmina.

ALDOA: Aldolasa A.

AMP: Adenosín monofosfato.

ANOVA: Análisis de las varianzas.

APP: Proteína de fase aguda.

ATP: Adenosín trifosfato.

CAT: Catalasa.

CE: Conductividad eléctrica.

CK: Creatin quinasa.

CKM: Creatin quinasa muscular.

CO: Monóxido de carbono.

CO₂: Dióxido de carbono.

CRH: Hormona corticotropina.

CrP: Fosfato de creatina.

DA: Dopamina.

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

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

ENO3: β -enolasa.

EROS: Especies reactivas de oxígeno.

GAPDH: Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa.

GDBE: enzima desramificante del glucógeno.

GPx: Glutati3n peroxidasa.

GSH: Glutati3n reducido.

H₂O₂: Per3xido de hidr3geno.

HAL: Gen halotano.

HPA: Eje hipotal3mico-hipofisario-adrenal.

HPLC: Cromatograf3a l3quida de alta eficacia.

HSP27: Prote3na de choque t3rmico de 27 kDa.

HSP70: Prote3na de choque t3rmico de 70 kDa.

ICDH: Isocitrato deshidrogenasa.

LD: *Longissimus dorsi*.

LDHA: Lactato deshidrogenasa A

LPO: Lipoperoxidaci3n.

LT: *Longissimus thoracis*

MAP: Envasado en atmósfera modificada

Mb: Mioglobina reducida

MbO₂: Oximioglobina

MCP: Muerte Celular Programada.

MDA: Aldehído malondialdehído.

MDH: Malato deshidrogenasa.

MF: Mezcla en granja.

MF-MS: Mezclado en la granja y en el sacrificio.

MF-US: Mezclado en la granja, pero no en el sacrificio.

MMb: Metamioglobina.

MS: Mezclado en el sacrificio.

MTL: Mezcla en transporte y espera previa al sacrificio.

MYOM2: Miomesina 2 isoforma x2.

N₂: Nitrógeno.

NA: Noradrenalina.

NB: Bías negativo.

NO: óxido nítrico.

NTs: Neurotransmisores.

O₂: Oxígeno.

O₂⁻: Radical superóxido.

OH: Radical hidroxilo.

PB: Bías positivo.

PCA: Análisis de componentes principales.

PCR: Proteína C reactiva.

PFKM: Fosfofructoquinasa muscular.

PGM1: Fosfoglucomutasa 1.

PGM2: Fosfoglucomutasa 2.

PKM2: Piruvato quinasa muscular isoforma 2.

PSE: en inglés, Pale, Soft and Exudative; en español, pálida, blanda y exudativa.

PYGM: Glucógeno fosforilasa muscular.

ROO[•]: radical peróxido.

RYR1: Gen receptor de la rianodina.

SDS: Dodecilsulfato sódico.

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

SEM: Error estándar de la media

SM: Músculo semimembranoso.

SOD: SuperÓxido Dismutasa.

TBS: Tampón Tris salino.

TBS-T: Tampón Tris salino con Tween-20.

TF: Precursor serotransferrina.

TPI: Triosa fosfato isomerasa.

UF: No mezcla en granja.

UTL: No mezcla en transporte y espera previa al sacrificio.

WBSF: Fuerza de corte de Warner Bratzler.

Índice de figuras

Figura 1. Evolución del consumo de carne mundial en los últimos 10 años y una estimación para 2020 referente a los tipos de carne más consumidas: avícola, porcino bovino y otras.	2
Figura 2. Consumo de carne en España en 2016 (en porcentaje).	3
Figura 3. Secreción inducida por el ejercicio de proteínas contenidas en las vesículas extracelulares (VE).....	6
Figura 4. Anatomía de las fibras musculares..	7
Figura 5. Evolución de la dureza de la carne, desde el sacrificio y a través de las distintas fases de transformación del músculo en carne (Oliván y cols., 2013).	8
Figura 6. Interconversión redox de los pigmentos de la carne.....	12
Figura 7. Esquema general de la respuesta al estrés	29
Figura 8. Descripción de la generación y desintoxicación enzimática antioxidante de EROs.....	33
Figura 9. Representación de los tipos de muerte celular.	34
Figura 10. Aplicación de la proteómica para estudiar biomarcadores de calidad en la carne.	40
Figura 11. Efecto de la mutación RYR1 (NN: portador de la mutación del gen Nn: libre de mutación en el gen RYR1) en la evolución post-mortem de la dureza de la carne, medida como la fuerza máxima de corte de Warner Bratzler (media \pm S.E.).....	56
Figura 12. Niveles séricos de urea. a) y GPx. b) (medias \pm S.E.M) en los cuatro tratamientos estudiados (M: macho, F: hembra, NN: no portador de la mutación, Nn: portador de la mutación del gen RYR1).	59
Figura 13. Perfil electroforético del extracto sarcoplásmico de muestras del músculo LT de cada tratamiento analizado (M-NN, M-Nn, F-NN, F-Nn) en gel SDS-PAGE.....	60
Figura 14. Diagrama de dispersión biespacial PCA de parámetros de calidad de la carne y biomarcadores del estrés..	69
Figura 15. Actividad del proteasoma en el músculo (media \pm SEM).....	86
Figura 16. (a) Efecto del sesgo cognitivo (sesgo positivo (PB) o sesgo negativo (NB)) en la expresión de Beclin1 a lo largo del post-mortem temprano (0-24 h); (b) efecto del tiempo post-mortem (0, 4, 8 y 24 h) sobre la expresión de Beclin1 dentro de los diferentes grupos de animales para la prueba de sesgo cognitivo (PB y NB).....	87
Figura 17. (a) Efecto del sesgo cognitivo (sesgo positivo (PB) o negativo (NB)) en el flujo autofágico (ratio LC3-II / LC3-I) a distintos tiempos post-mortem; (b) efecto del tiempo post-mortem (0, 4, 8 y 24 h) sobre el flujo autofágico para cada grupo de animales en función del sesgo cognitivo (PB y NB)	88
Figura 18. Resumen de los principales factores implicados en este estudio y la relación establecida entre ellos.....	89

Figura 19. Imagen en gel 1D SDS-PAGE del extracto sarcoplásmico del tejido muscular a diferentes tiempos post-mortem (0h, 4h, 8h, 24h).	102
Figura 20. Efecto del tiempo post-mortem en la disponibilidad de ATP en el músculo	124
Figura 21. Efecto del tiempo post-mortem en la AAT muscular.....	125
Figura 22. Efecto del tiempo post-mortem en la LPO muscular	126
Figura 23. Western-Blot mostrando la evolución post-mortem de Beclin1 en el tejido muscular de las cuatro condiciones estudiadas.	127
Figura 24. Western-Blot mostrando la evolución post-mortem de LC3-I y LC3-II en el tejido muscular de las cuatro condiciones estudiadas.....	128
Figura 25. Evolución post-mortem de biomarcadores de autofagia (Beclin1 y ratio LC3II/LC3I) en la célula muscular.....	128
Figura 26. Imagen de gel de SDS-PAGE de un extracto sarcoplásmico del músculo LTL en diferentes tiempos post-mortem (2h, 8h, 24h).	129
Figura 27. Análisis de interacción proteína-proteína realizado por String 11.0 de proteínas expresadas en el músculo <i>Longissimus</i> de la raza AV según los tratamientos de manejo: a) Manejo en granja, b) Mezcla de animales desconocidos..	132
Figura 28. Análisis de diagramas de dispersión biespaciales de componentes principales de tratamientos: I-M (Intensivo-mezcla), I-NM (Intensivo-no mezcla), SE-M (Semi-extensivo-mezcla y SE-NM (Semiextensivo-No mezcla); y variables.....	136
Figura 29. Flujo de trabajo de la estrategia que se utiliza para el estudio proteómico de biomarcadores de calidad de la carne.....	142
Figura 30. Análisis de interacción proteína-proteína hecho con String 11.0 de proteínas musculares del extracto sarcoplásmico	146
Figura 31. Esquema de los principales mecanismos biológicos involucrados en el proceso de conversión del músculo en carne y las rutas metabólicas que incluyen...	149

Índice de tablas

Tabla 1. Efecto del sexo (S) y del genotipo RYR1 (G) y su interacción (S * G) en los parámetros de calidad de la canal y de la carne.	55
Tabla 2. Efecto del sexo (S) y el genotipo RYR1 (G) y su interacción (S * G) en las variables bioquímicas séricas en el momento del sacrificio.	57
Tabla 3. Identificación de las bandas de proteínas que mostraron diferencias significativas entre tratamientos.....	65
Tabla 4. Efecto del sexo (S), del genotipo RYR1 (G) y su interacción (S * G) sobre la expresión de proteínas que mostraron cambios en los extractos musculares sarcoplásmicos (densidad óptica, en unidades arbitrarias).	66
Tabla 5. Efecto del sesgo cognitivo (sesgo positivo "PB" o sesgo negativo "NB") sobre las concentraciones de catecolaminas e indolaminas en diferentes regiones cerebrales.	82
Tabla 6. Efecto del sesgo cognitivo ("CB") (sesgo positivo "PB" o sesgo negativo "NB"), tiempo post-mortem "T" (0, 4, 8, 24 h) y su interacción (CB x T) sobre la actividad antioxidante total (AAT, expresada en mg de Trolox / mg de proteína) y la peroxidación lipídica (LPO, expresada en $\mu\text{mol MDA} + 4\text{HNE} / \text{g proteína}$) en el músculo.....	83
Tabla 7. Efecto del manejo sobre la calidad de carne.....	99
Tabla 8. Efecto del manejo sobre parámetros bioquímicos en suero y músculo	101
Tabla 9. Identificación de proteínas de bandas individuales de extractos sarcoplásmicos separados por 1D SDS-PAGE.	105
Tabla 10. Modelos de regresión lineal múltiple para la predicción de la calidad de la carne (pH45, CE24, L*, pérdidas por goteo) basados en biomarcadores (variables bioquímicas en sangre y perfil electroforético de los extractos sarcoplásmicos) del músculo.	108
Tabla 11. Efecto del manejo de animales en granja y durante el transporte y espera en biomarcadores séricos.....	121
Tabla 12. Efecto del manejo de animales en granja y durante el transporte y espera en las principales características de calidad de la carne.	123
Tabla 13. Efecto del manejo de animales en la granja y durante el transporte y la espera en el perfil de proteínas sarcoplásmicas del músculo.....	129
Tabla 14. Resumen global de los biomarcadores proteómicos que mostraron diferencias significativas con los diferentes tratamientos analizados en vacuno y porcino.....	151

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Situación actual del sector cárnico

La carne es un alimento fundamental en la dieta humana, ya que aporta proteínas de alta calidad y contiene ácidos grasos esenciales, así como minerales y vitaminas de alta biodisponibilidad. Además, presenta unas características sensoriales excepcionales que la convierten en uno de los alimentos de origen animal mejor valorado desde el punto de vista hedónico por el consumidor.

A nivel mundial, la carne más consumida es la de cerdo (37%), seguida muy de cerca por la carne de ave (35%) mientras que la carne de bovino ocuparía el tercer puesto (21%) (Interempresas, 2017), aunque la evolución en los últimos años muestra una disminución progresiva del consumo de carne de porcino y vacuno y un incremento de la carne de ave (Figura 1).

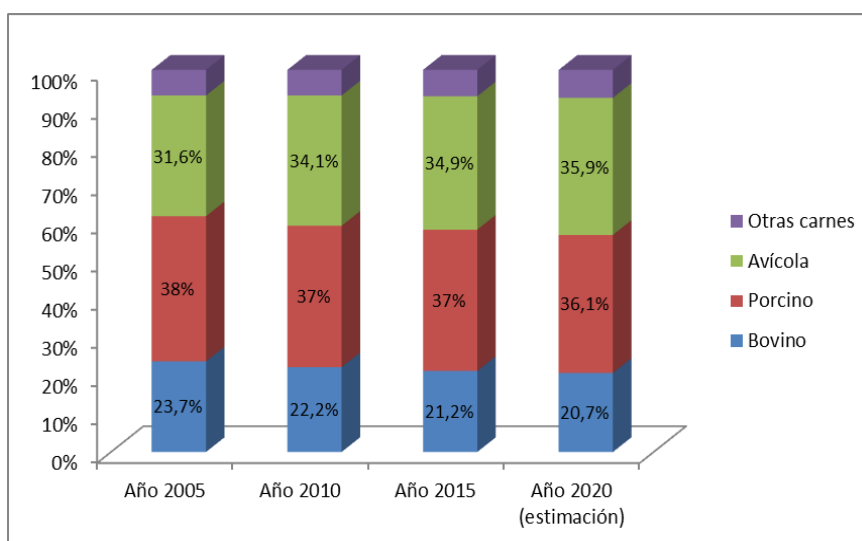


Figura 1. Evolución del consumo de carne mundial en los últimos 10 años y una estimación para 2020 referente a los tipos de carne más consumidas: avícola, porcino bovino y otras.

En Europa, la tendencia es similar, aunque cambian las proporciones, de modo que el principal producto cárnico consumido es la carne de porcino (23,4 millones de toneladas/año), seguida por la de ave (14,4 millones de toneladas), siendo la producción de bovino algo inferior (7,8 millones de toneladas) (EUROSTAT, 2017).

En lo que respecta a España, el consumo de carne muestra distinto perfil, estando en cabeza la carne de ave (37%) seguida por la carne de cerdo (29%), ocupando la carne de vacuno el cuarto lugar (15%) (MAPAMA, 2017a) (Figura 2).

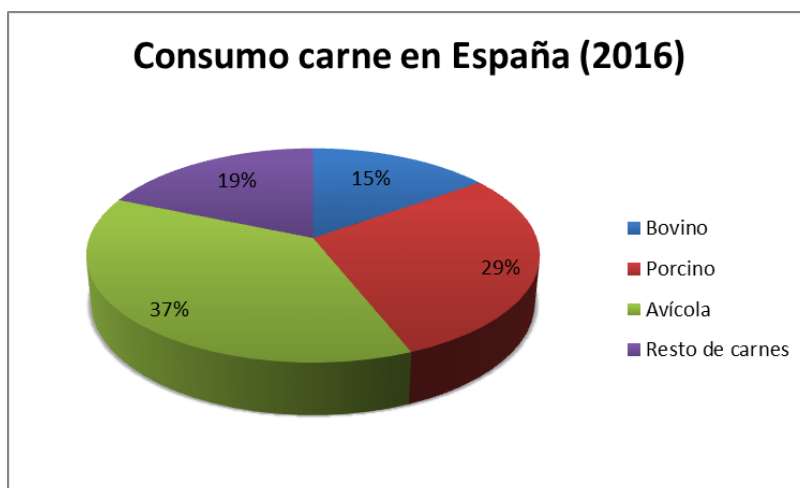


Figura 2. Consumo de carne en España en 2016 (en porcentaje).

En cuanto al peso económico en el sector productivo, el porcino tiene una importancia clave en la economía de nuestro país ya que supone el 12,7% de la Producción Final Agraria (unos 6.000 millones de euros) y el 36% de la Producción Final Ganadera (MAPAMA, 2016). Centrándonos en el sector vacuno, que representa el 17% de la Producción Final Ganadera española, se observa un incremento paulatino desde el año 2008, que alcanza ya una cifra que supera los 2.700 millones de €. Así mismo, representa el quinto puesto a nivel europeo en importancia productiva, por detrás de Francia, Reino Unido, Alemania e Italia.

A su vez, las producciones varían según las comunidades autónomas. Las que más carne de cerdo producen son Cataluña (42%), Castilla y León (13,5%) y Aragón (13,2%) mientras que la producción de carne de vacuno se concentra en Cataluña (20%), Castilla y León (17%) y Galicia (15%) y en el caso del sector avícola lo encabezan Cataluña (23,9%) y Andalucía (21,8%) (MAPAMA, 2017b).

En Asturias, la tradición ganadera ligada a unas condiciones edafo-climáticas óptimas, hacen que la presencia del ganado bovino sea mayoritaria en la producción ganadera. En los mataderos asturianos la cantidad de toneladas de carne sacrificadas para el consumo está encabezada por el sector bovino (14.000 toneladas, año 2017) y

seguida del porcino (4.000 toneladas, año 2017), mientras que el sacrificio de aves es prácticamente nulo ya que se realiza fuera de la región (Gobierno del Principado de Asturias, 2018).

En su conjunto, la cabaña ganadera asturiana ha mostrado una disminución paulatina en los últimos veinte años, mostrando la cabaña bovina una reducción del 11,4% y la porcina del 78%, según los informes de la Consejería de Medio Rural y Pesca, elaborados por SADEI (2017). En el caso de la cabaña bovina, el mayor descenso de efectivos se dio entre los animales de raza frisona (reducción del 32%) y las vacas mestizas (cruces de las razas cárnicas y/o lecheras) cuyo censo se redujo un 20%, mientras que el número de vacas de las razas cárnicas autóctonas Asturiana de los Valles “AV” y Asturiana de la Montaña “AM” se incrementó un 9% y un 69%, respectivamente. Esta evolución, incentivada en gran medida por las subvenciones recibidas en los últimos años a las vacas nodrizas, refleja además la excelente adaptación de estas dos razas autóctonas asturianas a los sistemas productivos propios de la región, existiendo entre ellas notables diferencias productivas y de implantación. La raza AV es la dominante en cuanto a número de efectivos (más de 90.000 hembras y 11.000 machos, según el censo de diciembre de 2017 del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, (MAPAMA, 2018), estando muy bien valorada por el sector, debido a su excelente aptitud cárnica, relacionada en gran medida con la amplia incidencia en la población de una mutación en el gen de la miostatina, proteína que regula el crecimiento muscular, lo que produce terneros “culones” con un desarrollo muscular superior y por tanto mayor rendimiento cárnico.

1.2. El músculo y su transformación en carne

La calidad final de la carne depende en gran medida de las características y estructura del músculo “in vivo” y de los procesos de transformación del músculo en carne que se producen tras la muerte del animal.

El músculo estriado esquelético es un tejido complejo que contiene varios elementos, incluyendo fibras musculares, tejido conectivo y adiposo, vasos sanguíneos

y nervios (Petritz y cols., 2016). Es un órgano dinámico que se encarga del movimiento del cuerpo y la generación de calor, también tiene un papel muy importante en la homeostasis metabólica ya que es un órgano receptor de insulina y también oxida ácidos grasos. Además la plasticidad del músculo esquelético le permite a este complejo órgano responder y adaptarse a una amplia gama de estímulos fisiológicos como el ejercicio.

Actualmente se le considera como un órgano endocrino que secreta varias moléculas al fluido extracelular, tales como factores de crecimiento, metabolitos y mioquinas (Pedersen y cols., 2012). El término “mioquina” fue acuñado para describir “una citoquina o péptido que es producido por las células del músculo esquelético y posteriormente se libera en la circulación para ejercer efectos endocrinos o paracrinicos en otras células, tejidos u órganos” (Whitham y Febbraio, 2016). Estas actúan como hormonas y su liberación está mediada por la contracción muscular (Brandt y Pedersen, 2010), así por ejemplo la liberación de interleucina 6 (IL-6) con capacidad antiinflamatoria y cuyos niveles musculares afectan a la glucogénesis y a la sensibilidad a la insulina está inducida por el ejercicio físico. Muchas de las moléculas que se liberan en el ejercicio se transportan envueltas en vesículas extracelulares (VE) (figura 3). Por ejemplo algunos enzimas glucolíticos se transportan a través de esas vesículas durante las altas demandas de energía del ejercicio y estas pueden influir en la tasa de glucólisis en las células receptoras (Whitham y cols., 2018).

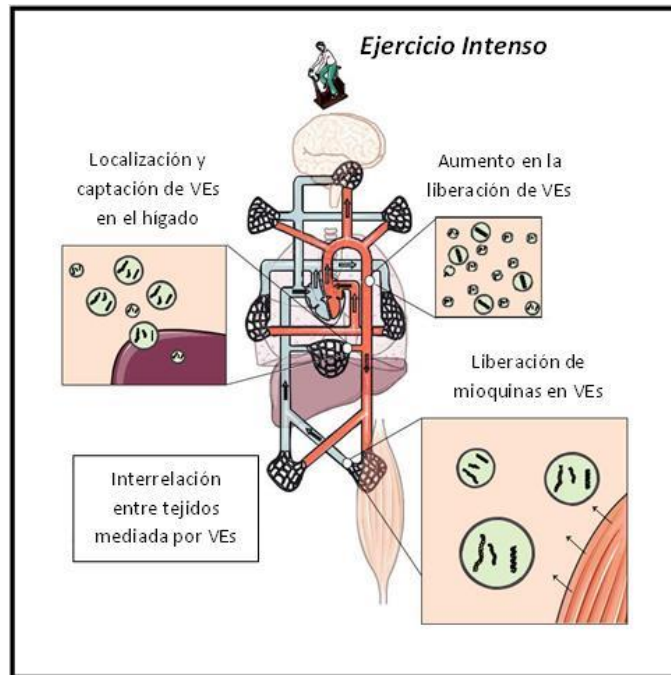


Figura 3. Secreción inducida por el ejercicio de proteínas contenidas en las vesículas extracelulares (VE), adaptada de Whitham y cols. (2018).

La célula o fibra muscular es un sincitio multinucleado rodeado de membrana plasmática. Estas fibras están ocupadas por sarcómeros. El sarcómero es la unidad más pequeña de contracción muscular y su longitud influye en la calidad final de la carne. La longitud sarcomérica post-mortem varía, contrayéndose durante la instauración del rigor mortis y relajándose posteriormente durante la maduración, lo que afectará a la textura de la carne y a la capacidad de retención de agua, además de poder generar efectos indirectos en el color y el sabor.

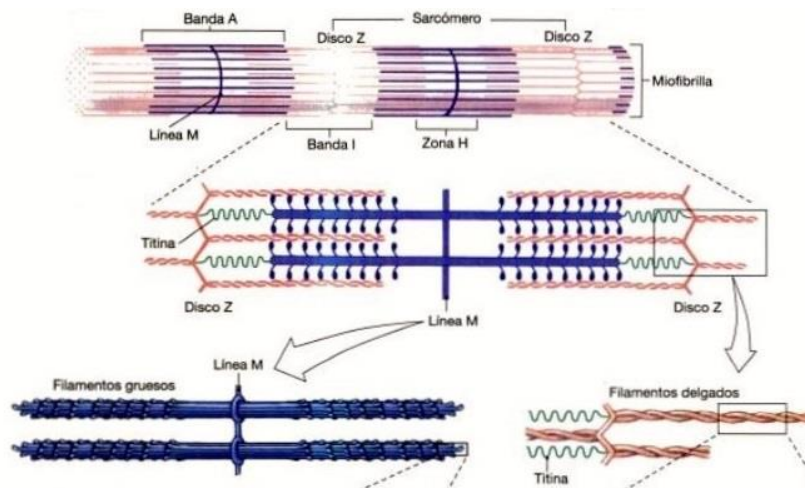


Figura 4. Anatomía de las fibras musculares (Fuente: Fisiología humana: Un enfoque integrado.2008.Ed. Médica Panamericana).

Desde el punto de vista histológico, las fibras musculares tienen una banda clara, que se denomina banda I, y una banda oscura, que se conoce como banda A (Figura 4). La región central de la banda A se denomina zona H, y en el centro se encuentra la banda M. La proteína motora miosina está organizada en filamentos gruesos en la banda A. Los monómeros de actina se ensamblan en los filamentos finos que abarcan la banda I y se superponen con filamentos gruesos en la banda A. Los discos Z forman los límites laterales del sarcómero donde se anclan los filamentos finos.

El proceso de transformación del músculo en carne consta de una compleja combinación de cambios celulares, estructurales y bioquímicos, que los científicos han dividido en etapas, tal y como describieron por primera vez Sentandreu y cols. (2002) en las cuales hay una **fase pre-rigor** (el músculo permanece excitable y se correspondería con la fase de supervivencia del sistema nervioso (Chrystall, 1985), el **rigor mortis** (situación de agotamiento de componentes energéticos como ATP, entre otros) y la **fase post-rigor** (etapa de maduración o también llamada tenderización en la que se produce una desestructuración de la arquitectura muscular debido a la actividad proteolítica de diversos sistemas enzimáticos sobre los elementos proteicos celulares) (Figura 5).

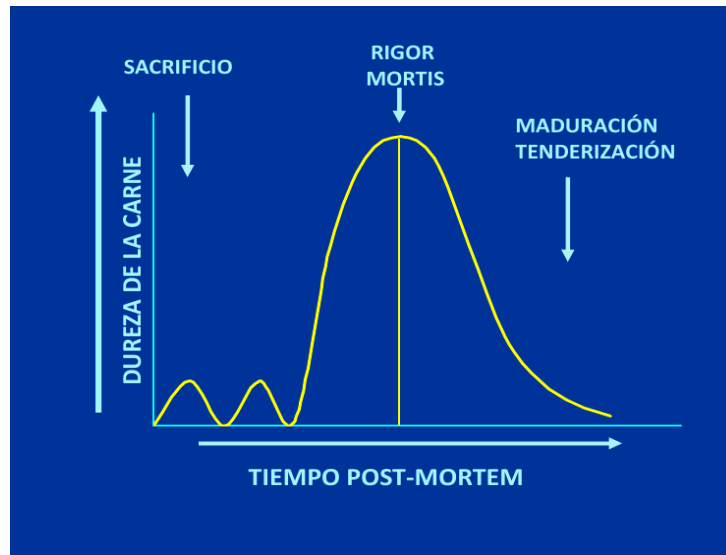


Figura 5. Evolución de la dureza de la carne, desde el sacrificio y a través de las distintas fases de transformación del músculo en carne (Oliván y cols., 2013).

1.2.1. Pre-rigor

Es la fase que ocurre justo después del sacrificio, en la que, debido a la falta de oxígeno que llega a las fibras musculares tras el corte de circulación sufrido por el sangrado, se produce un déficit de nutrientes en las células, lo que provoca un cambio en el metabolismo muscular que se ve obligado a consumir las reservas de glucógeno existentes, provocando un descenso de pH (acidificación) en el músculo y un agotamiento de los enzimas que rigen el metabolismo celular lo que conlleva la pérdida de la capacidad de las fibras musculares de extensión y contracción produciéndose un acortamiento sarcomérico que da lugar a un estado de rigidez conocido como *rigor-mortis*.

El enfriamiento durante el periodo pre-rigor es crítico ya que la relación entre el pH y la temperatura es un factor decisivo que afectará al proceso de tenderización y por tanto a la calidad final de la carne (Hannula y Puolanne, 2004).

1.2.2. Rigor mortis

A medida que las fibras musculares individuales agotan su suministro de energía, pierden extensibilidad y entran en un estado de rigidez, llamado “rigor”. Los principales fenómenos bioquímicos que se suceden en el músculo relacionados con el inicio del rigor mortis se pueden resumir (Ertberg y cols., 2017) en:

- I. Agotamiento del oxígeno unido a la mioglobina después de la muerte del animal y cese de la respiración mitocondrial.
- II. Cambio del metabolismo aeróbico al anaeróbico.
- III. Agotamiento de la fosfocreatina poco tiempo después de la muerte.
- IV. Agotamiento del ATP, que comienza después de que el fosfato de creatina ha disminuido.
- V. Aumento de Ca^{2+} libre en sarcoplasma.
- VI. Formación de enlaces cruzados entre las cabezas de miosina y actina que da como resultado la aparición de complejos de actomiosina. El músculo se vuelve rígido y pierde elasticidad.

El momento post-mortem en el que ocurren estos procesos depende de la concentración inicial de glucógeno del músculo, de la temperatura y del pH, influyendo sobre todo los dos últimos factores en la calidad de la carne de bovino y porcino, tal como indica Honikel (2014).

1.2.3. Post-rigor (Maduración y Tenderización)

Tras el rigor comienza la etapa de maduración, que comprende una serie de cambios bioquímicos y estructurales que van transformando la arquitectura muscular y por ende, las características finales de la carne. Estos cambios se deben principalmente a la acción de enzimas proteolíticos sobre las proteínas estructurales del tejido muscular produciendo un ablandamiento de la carne conocido como “tenderización”, así como la actuación de determinados procesos oxidativos que inducen la aparición de sustancias que originan el aroma característico de la carne. (Sentandreu y cols., 2002; Huff-Lonergan y cols., 2010).

La temperatura del músculo en esta fase también tendrá un gran efecto en el metabolismo muscular post-mortem, ya que modula la velocidad de la glicolisis (modificando el funcionamiento de la actividad enzimática) y también afecta a la tasa de descenso de pH y a la velocidad de aparición del rigor mortis y del acortamiento sarcomérico, lo que influye sobre la terniza final.

1.3. Calidad de la carne y parámetros indicativos

La calidad es un término muy complejo de definir sin embargo, la forma más empleada de hacerlo es definirla 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:

- I. *Calidad higiénico-sanitaria*: ausencia de contaminación microbiana y/o sustancias tóxicas.
- II. *Calidad nutritiva*: aporte de los nutrientes necesarios para satisfacer las necesidades del organismo.
- III. *Calidad organoléptica*: ofrece durante su consumo sensaciones satisfactorias de carácter sensorial.
- IV. *Calidad de servicio*: presencia de ciertas cualidades culinarias o cierto formato de presentación que permita que sea fácil de preparar y/o consumir.
- V. *Calidad simbólica*: propiedad de ciertas características que el consumidor asocie con una mayor calidad, como, por ejemplo, crianza en el campo frente a cebadero, producto fresco frente a congelado, imagen de una determinada marca, etc...
- VI. *Calidad tecnológica*: mantenimiento de las características necesarias para el desarrollo de determinados procesos de transformación en la industria y de manejo y conservación.

Atendiendo a los diferentes conceptos de calidad, existen diferentes parámetros y atributos que pueden medirse como indicadores de la calidad de la carne, tanto desde el punto de vista tecnológico (pH, temperatura, capacidad de

retención de agua, oxidación y color) como desde el aspecto organoléptico o sensorial para el consumidor (color, flora bacteriana, composición química y energética, textura o dureza y atributos sensoriales como el olor, el gusto y los aromas percibidos durante la masticación). En general, los principales indicadores de calidad de la carne son:

I. El **pH**: definido 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, influyendo directamente tanto en la estabilidad y propiedades de las proteínas como en las características físico-químicas de la carne.

La producción de ATP tras el sacrificio del animal, debido al corte del flujo sanguíneo, se produce mayoritariamente por glucólisis anaeróbica a partir de la glucosa almacenada en el músculo en forma de glucógeno. La acumulación de metabolitos intermedios como ácido láctico, produce un descenso del pH muscular. Estas variaciones en el pH pueden tener un efecto importante 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 misma.

II. **Temperatura**: En ciertos casos, recurrir a temperaturas de enfriamiento muy bajas puede producir un oscurecimiento sobre todo en las canales muy magras (con poca grasa). Esto se debe al acortamiento excesivo de los sarcómeros en la instauración del rigor, incentivado por el frío, así como a la desecación de la superficie del músculo por el contacto con el aire y la oxidación de la hemoglobina (pigmento que da color rojo a la carne), ocasionando problemas de “quemadura” por frío. Una solución propuesta para obtener el máximo de calidad en canales grandes es el enfriamiento progresivo en distintas etapas, de modo que se someten durante un tiempo a una temperatura intermedia (10-15°C) hasta la instauración del rigor, para más tarde enfriar las canales hasta 4°C (López y Casp, 2004).

III. El **color**: es una de las cualidades más importantes ya que es el primer atributo que el consumidor puede apreciar a simple vista y por lo tanto motiva la aceptación o el rechazo del producto. El color de la carne depende de la estructura y el tipo de músculo, de la concentración de pigmentos hemínicos (mayoritariamente mioglobina) en el tejido muscular y del estado de oxidación de los mismos. El contenido de mioglobina en el músculo depende de diversos factores productivos, tales como especie, raza, tipo de alimentación, etc..., mientras que su estado de oxidación o desnaturalización dependerá de procesos post-mortem que se ven afectados por la disminución de la temperatura y la tasa de descenso del pH, así como de los tiempos de almacenamiento y las condiciones de comercialización. Dependiendo del estado de oxidación del átomo de hierro del grupo hemo, se pueden diferenciar tres formas diferentes de los pigmentos hemínicos, que proporcionarán distinta tonalidad a la carne (Figura 6). El pigmento se mantiene en la forma de mioglobina reducida o deoximioglobina (Mb) en ausencia de oxígeno, dando a la carne un color morado. Cuando entra en contacto con el aire, se produce la oxigenación del pigmento y se transforma en oximioglobina (MbO₂), aportando un color rojo brillante al músculo, siendo esta carne la más atractiva para los consumidores.

Ambos tipos de pigmentos, deoximioglobina y oximioglobina, son capaces de reaccionar con el oxígeno y dar lugar a la forma oxidada, la metamioglobina (MMb), que aporta un color pardo y apagado, que el consumidor asocia con la pérdida de calidad.

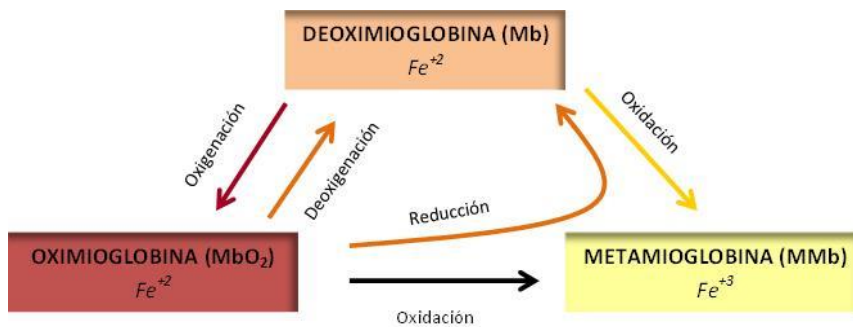


Figura 6. Interconversión redox de los pigmentos de la carne. Adaptado de (Mancini y Hunt., 2005).

IV. El **estado oxidativo**: se produce como consecuencia de las modificaciones que tienen lugar a lo largo de la maduración post-mortem en las biomoléculas musculares debido al intercambio de radicales libres producto de la exsanguinación. Estos cambios suponen un descenso de la defensa antioxidante y un incremento del grado de oxidación de lípidos y proteínas por la acción de los radicales libres, con consecuencias sobre la calidad sensorial y textura final de la carne.

En el músculo, la oxidación lipídica se inicia en los fosfolípidos, debido principalmente a sistemas autocatalíticos de radicales libres en cadena. Además, la oxidación de las proteínas altera su estructura secundaria y terciaria, pudiendo conducir a la formación de agregados (Grune y cols., 2004) y en ocasiones a la inactivación de enzimas, lo que puede afectar negativamente a los procesos de tenderización de la carne. En las células existen una serie de enzimas antioxidantes que tratan de contrarrestar los efectos de la oxidación, como son la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT), que son capaces de neutralizar la energía de las EROs (especies reactivas de oxígeno) metabolizando los radicales libres o sus intermediarios reactivos, transformándolos en productos sin efectos nocivos para los tejidos.

V. **Dureza**: Dentro de los parámetros que determinan la textura de la carne, la dureza es de los más importantes debido a su influencia en la aceptación de la carne por parte del consumidor. El ensayo más ampliamente utilizado para determinar la dureza de la carne consiste en medir la máxima resistencia al corte realizado con una cuchilla Warner-Bratzler (Cross y cols., 1986).

Un factor determinante de la dureza de la carne es la integridad de las proteínas que constituyen las fibras musculares. Tras la muerte del animal, ocurre un proceso de desestructuración celular y se liberan determinados enzimas proteolíticos endógenos, como calpaínas y catepsinas, que actúan sobre las grandes proteínas estructurales (Ouali, 1992; Sentandreu y cols.,

2002; Weaver y cols., 2009), disminuyendo a dureza de la carne a medida que avanza el tiempo de maduración post-mortem.

También tendrá un papel determinante en la dureza de la carne la proporción y la naturaleza del tejido conectivo, es decir, el colágeno, estando muy influenciado por factores como la raza y la edad del animal (Panea y cols., 2018).

1.4. Factores que influyen en la calidad de la carne

Existen numerosos factores que influyen en la calidad final de la carne. Algunos son intrínsecos del animal, como la raza, el genotipo, el sexo y la edad. Otros factores son extrínsecos, es decir, relacionados con el manejo productivo y el entorno, tales como la alimentación o el ejercicio.

También pueden distinguirse por el orden temporal en el que se van produciendo, por lo que pueden separarse en factores pre-sacrificio (ante-mortem), como son raza, genotipo, sexo, edad y aspectos relacionados con el sistema productivo, factores previos cercanos al momento del sacrificio (peri-mortem), contando entre éstos el transporte, el ayuno y el sistema de sacrificio en sí mismo, y por último factores post-sacrificio (post-mortem), como la conservación, la maduración y la refrigeración de la canal y de la carne.

1.4.1. Factores Ante-mortem

La **raza** es un factor que juega un papel muy importante con respecto a los parámetros de calidad. En porcino, existen distintas razas con diferencias en caracteres productivos y de calidad de la carne. Oliver y cols. (1993) realizaron un estudio muy completo de razas de porcino europeas en el que apuntaban que la raza Pietrain posee mayor porcentaje magro y por tanto menor grasa, siendo bastante susceptible al estrés. La raza Duroc se caracteriza por un elevado contenido en grasa así como elevada conformación, siendo esta raza junto con la raza Landrace White dos razas

muy resistentes al efecto del estrés. Finalmente la raza Landrace fue considerada como una raza intermedia en cuanto a conformación muscular, engrasamiento y susceptibilidad al estrés.

En nuestro país, se han realizado diversos estudios en vacuno que han permitido caracterizar las principales razas autóctonas españolas, habiéndose establecido una categorización atendiendo a rasgos productivos como son el tamaño corporal y características de la canal (Alberti y cols., 2005):

Razas especializadas en carne: Asturiana de los Valles y Rubia Gallega, que se caracterizan por una gran musculatura, pelvis ancha, altura media, maduración tardía y un nivel bajo o medio de engrasamiento. Ambas presentan alto rendimiento cárnico.

Razas de producción cárnica media: Asturiana de la Montaña, Parda Alpina y Pirenaica, con poco desarrollo muscular y compacidad y niveles elevados o moderados de grasa.

Razas con bajo rendimiento carnicero: Avileña, Retinta y Morucha.

Además de estas diferencias productivas entre razas autóctonas, Gil y cols. (2001) establecieron diferencias en cuanto al color de la carne, siendo las más oscuras las que poseen mayor contenido en mioglobina. Las razas más especializadas en carne tienen una carne más clara y las de menor rendimiento carnicero poseen un color mucho más oscuro.

El **genotipo**, o más bien los cambios derivados de distintas mutaciones, son otro factor importante que influye en la calidad. En el ganado porcino, existe una mutación genética que tiene gran influencia sobre la calidad final de la carne, que afecta al gen receptor de la rianodina (RYR1) conocido antiguamente como **gen halotano** (HAL), asociado al síndrome de estrés porcino. Este gen (RYR1) se encuentra en el cromosoma 6 y consta de dos alelos (normal "N" y uno con una mutación recesiva "n"), de forma que el genotipo libre de la mutación del gen es el homocigoto NN y el genotipo portador de la mutación del gen es Nn (en heterocigosis) o nn (en homocigosis) (Calvo y cols., 1997; Oliván y cols., 2018). Dicha mutación afecta al receptor de rianodina (proteína de membrana de liberación de calcio del retículo

sarcoplásmico) y produce la alteración de la liberación de calcio hacia el sarcoplasma de la célula muscular, sobre todo en periodos de estrés físico, influyendo por tanto sobre los procesos de contracción y relajación muscular. Al aumentar la cantidad de calcio sarcoplásmico también aumenta el metabolismo energético y este incremento metabólico unido a una, todavía, temperatura elevada del animal (>36°C) durante el proceso de conversión del músculo en carne se traduce en una desnaturalización parcial de las proteínas del músculo esquelético y pérdida de líquido (Fujii y cols., 1991) produciendo carnes muy exudativas. Además este gen influye en la composición y tamaño de las fibras musculares, incrementando el número de fibras glicolíticas, lo que favorecerá una bajada más rápida del pH favoreciendo la aparición de carnes pálidas, blandas y exudativas (PSE: Pale, Soft, Exudative, en español pálida, blanda y exudativa). Este tipo de carne presenta una baja capacidad de retención de agua y un descenso del pH post-mortem demasiado rápido.

Con respecto al ganado bovino, y en concreto en algunas razas como la Azul Belga, la Asturiana de los Valles o la Piamontesa, existe una mutación genética bastante extendida que produce hipertrofia muscular (muscular hypertrophy "*mh*"). Esta mutación inactiva el gen de la miostatina (Grobet y cols., 1997) una proteína reguladora del crecimiento muscular, lo cual produce hiperplasia (aumento del número) e hipertrofia (aumento del tamaño) de las fibras musculares, lo que da lugar a animales con mayor conformación muscular y menor engrasamiento, conocidos como animales "culones" o de "doble grupa" (Arthur, 1995; Oliván y cols., 2004; Albertí y cols., 2005).

Los animales homocigotos (*mh/mh*) "culones" producen una carne más magra, con menor contenido de grasa intramuscular, de color más claro y con menor capacidad de retención de agua que la de los terneros de genotipo normal (+/+) de la misma raza, presentando los terneros heterocigotos (*mh/+*) características intermedias (Oliván y cols., 2004; Aldai y cols., 2006). La hipertrofia muscular produce una serie de efectos negativos para la producción animal, como son problemas de fertilidad, mayor susceptibilidad al estrés, menor viabilidad de las camadas y retraso en la madurez sexual (Ménissier, 1982; Arthur, 1995).

En cuanto a la producción cárnica, esta hipertrofia muscular produce canales con mayor proporción de músculo, menor proporción de hueso, menor cantidad de tejido conectivo y mucha menor proporción de grasa que las canales convencionales (Arthur, 1995; Fiems y cols., 2003), teniendo además esta grasa diferente composición de ácidos grasos (Aldai y cols., 2006; Wiener y cols., 2009).

El **sexo** afecta a diversos parámetros de calidad de la carne, como son la cantidad de músculo y grasa de la canal, las características de la fibra muscular y determinadas características físico-químicas y sensoriales de la carne.

En porcino, se ha descrito en ocasiones que los machos tienden a producir una carne más roja y de color más intenso (Latorre y cols., 2003). Channon y cols. (2004) demostraron que los machos de cerdo de la raza Duroc tenían una carne más oscura y más dura (mayor fuerza de corte Warner Bratzler) en comparación con la de las hembras. Sin embargo D'Souza y Mullan (2002) no encontraron diferencias en cuanto a parámetros sensoriales como flavor, olor, jugosidad y la aceptabilidad general, al igual que Lampe y cols. (2006), ya que hay muchos factores que intervienen en el color de la carne como son el tipo de músculo, el pH, el estrés previo al sacrificio, la dieta... por lo que no se pueden atribuir las diferencias a un solo factor, como el sexo (Ahmed y cols., 2018).

En vacuno el sexo puede influir también sobre la composición química del músculo, habiéndose descrito en algunos estudios que las hembras producen carne con mayor contenido de grasa y menor de agua, mientras que los machos tienen mayor desarrollo muscular y mayor contenido de proteína en el músculo, posiblemente debido al efecto de las hormonas masculinas (Zhang y cols., 2010).

Otro factor que influye sobre la calidad de la carne es la **edad** del animal, aunque su efecto continúa sin estar claro a pesar de los estudios realizados al respecto. Esto se debe a que en muchas ocasiones, el estudio del efecto de la edad interacciona con otros factores como la velocidad de crecimiento del animal, la composición muscular y el engrasamiento.

En porcino, se ha demostrado que la edad del animal puede afectar a características de la carne como la actividad enzimática, el color y la cantidad de grasa, factores que determinan el olor y el sabor. López-Bote y cols. (2001) afirmaron que los enlaces cruzados dentro del tropocolágeno y, a su vez, los enlaces del tejido conectivo aumentan con la edad lo que influye en la textura de la carne (más dureza) de modo análogo a lo que ocurre en vacuno (Huff Lonergan y cols., 1995).

Diversos estudios en vacuno han descrito una disminución en la ternura de la carne al aumentar la edad (Riley y cols., 1986; Shorthose y Harris, 1990), siendo este efecto más acusado cuando se analizan músculos con alto contenido en tejido conectivo, posiblemente debido a un incremento en el entrecruzamiento del entramado de colágeno con la edad (1 a 4 años aproximadamente). En rangos de edad reducidos (menos de 2 años), hay estudios que han encontrado incrementos, descensos o ningún cambio notable en la medida de la ternura al aumentar la edad del animal (Gullett y cols., 1996; Sañudo y cols., 2004).

Xiong y cols. (2007) encontraron que en vacas maduras (2 a 12 años) de cruce Angus x Simmental, un incremento en la edad produce un aumento de la dureza de la carne, relacionado con una disminución de la degradación post-mortem de la troponina T, observándose también una disminución de la estabilidad oxidativa del producto. Estos aspectos de actividades enzimáticas en el músculo en animales de distinto rango de edad merecen ser estudiados con más profundidad, ya que pueden influir enormemente en la evolución de la calidad del producto durante su maduración y comercialización.

En cuanto a la **alimentación**, los animales pueden criarse bajo distintos sistemas. Así un sistema intensivo, es aquel en el que los animales son alimentados los últimos meses con piensos compuestos. Por otro lado, los sistemas extensivos, permiten acceso a forraje verde en condiciones de pastoreo, aunque pueden recibir algo de suplementación con piensos para asegurar un incremento adecuado de peso.

Tradicionalmente, se ha discriminado la carne de rumiantes producida en pastoreo debido a su color más oscuro y una mayor dureza. Sin embargo, en muchos experimentos el efecto de la alimentación se confunde con las diferencias en edad y

peso al sacrificio, así como el nivel de ingestión de energía y la tasa de crecimiento del animal. Algunos autores relacionan la ingestión de forrajes por el animal con la aparición de sabores extraños o no deseados en la carne (Melton, 1990; Priolo y cols., 2001), lo cual se ha atribuido a la presencia de compuestos específicos de la dieta forrajera, que presenta altos niveles de proteína y de carbohidratos fermentables, así como alta proporción de ácido linoleico (C18:3 n-3) y de compuestos clorofílicos y metabolitos vegetales secundarios como taninos y terpenos (Prache y cols., 2005; Schreus y cols., 2008).

La alimentación basada en pastos puede afectar de forma importante al color de la carne y de los tejidos adiposos del animal (Priolo y cols., 2001; Dunne, 2005), parámetros ambos de gran importancia ya que determinan en primer término la decisión de compra por el consumidor. Generalmente, la ingestión de forrajes produce grasa más amarilla, debido a la acumulación de pigmentos característicos como los carotenoides, lo cual puede producir cierto rechazo por los consumidores acostumbrados a las canales con grasa blanca procedentes de sistemas de cría intensivos.

En cuanto al **color** de la carne, la comparación entre la calidad de la carne de cerdos criados en intensivo y en extensivo es de suma importancia debido al conflicto existente entre ambos sistemas de producción (Park y cols., 2017). Estudios como el de Gentry y cols. (2004) reflejan que los cerdos de extensivo tienen carne más roja (valores de color más altos para índice de rojo a^*) que los cerdos de intensivo. Esto le da a la carne una apariencia más atractiva para los consumidores. Estos resultados estaban de acuerdo con un estudio similar publicado por los mismos autores en 2002, cuando compararon los entornos de nacimiento y cría para el parámetro de color, y una vez más los cerdos en extensivo tuvieron un mayor valor de a^* respecto a los de intensivo. En el mismo estudio, se realizó análisis sensorial y de fuerza de corte en el lomo y los resultados mostraron que el ambiente de nacimiento tuvo un efecto significativo en la intensidad del sabor de la carne de cerdo, que fue más alta en la carne de cerdos que se criaron al aire libre. Los resultados también mostraron que los cerdos criados al aire libre tenían la carne más tierna.

La alimentación es el principal factor que influye en la composición y calidad de la grasa del cerdo, dado que condiciona la síntesis endógena y exógena de ácidos grasos. La grasa se deposita en el cerdo, principalmente, en el tejido adiposo subcutáneo y en el tejido muscular, además de la que se deposita en la cavidad abdominal y en el hígado. En la calidad de la carne es la grasa intramuscular la que tiene más importancia, ya que va a ser la que determine las características sensoriales, como la jugosidad, luminosidad (L^*), la dureza y el aroma (Cava y cols., 1999).

En bovino, se ha descrito que la carne de terneros añejos de las razas AV y AM sacrificados directamente del pasto es más oscura, tiene menor nivel de engrasamiento intramuscular y mayores pérdidas de jugo, resultando más dura y seca, con lo que resulta penalizada en la valoración sensorial por el consumidor (Oliván y cols., 2002). En cambio, la introducción antes del sacrificio de un período de acabado con pienso de 70 ó 100 días de duración mejora la calidad sensorial de la carne y su color (Oliván y cols., 2005).

Se cree que los fenómenos de oxidación lipídica y deterioro del color pueden estar relacionados, actuando los pigmentos hemínicos como catalizadores de la peroxidación lipídica. A esto hay que añadir que la inclusión en la dieta del rumiante de pastos y forrajes puede ocasionar un incremento en los tejidos de determinados compuestos con actividad antioxidante, como la vitamina E, que incrementa la estabilidad oxidativa al producto, con lo que presenta una mejor conservación del color y la calidad sensorial (Warren y cols., 2008).

1.4.2. Factores Peri-mortem

Dentro de estos factores encontramos, entre otros, el transporte, el ayuno, el aturdimiento y el manejo previo al sacrificio. Hay que tener en cuenta que tanto el transporte como el manejo antes del sacrificio pueden generar un estrés a los animales y más si se realiza de forma inadecuada, y que pueden desencadenar una serie de cambios en el animal a nivel metabólico que tengan una repercusión en el proceso de conversión del músculo en carne y por tanto en la calidad final del producto.

El **transporte** es un factor importante a tener en cuenta, pues afecta al bienestar animal y también a la calidad del producto resultante. El viaje al matadero supone un cambio ambiental para el animal y frente a estos cambios se desencadenarán respuestas a nivel del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal, una parte esencial del sistema neuroendocrino que controla las reacciones al estrés y regula varios procesos del organismo como la digestión, el sistema inmune, las emociones, la conducta sexual y el metabolismo energético. Estas respuestas producirán un aumento de los niveles de cortisol plasmático y sus metabolitos. Este proceso de adaptación del animal supone también un gasto energético importante. La respuesta al estrés es esencialmente catabólica, debido a que tiende a movilizar reservas energéticas (carbohidratos, grasas, proteínas). Con esto, los glucocorticoides y las catecolaminas causan un aumento de la glucemia, a partir de los sustratos glucídicos y no glucídicos tales como las proteínas, y un incremento de los ácidos grasos no esterificados, derivados de la movilización de lípidos. Las catecolaminas aumentan la función cardiovascular y, en conjunción con los glucocorticoides, producen un incremento de la gluconeogénesis, la degradación proteica en las fibras musculares, la lipólisis y la concentración de ácidos grasos en sangre. Con esto se produce una acción antiinflamatoria y se afecta el sistema inmunitario. En conjunto, estos cambios están destinados a producir una mayor disponibilidad de energía para el cerebro y los músculos, y por lo tanto un comportamiento más eficaz como respuesta al estrés (Miranda-de la Lama, 2018).

El tiempo de transporte puede influir significativamente en los parámetros de bienestar y calidad de la carne. Así, Pérez y cols. (2002) observaron que cerdos sometidos a transporte muy corto (15 min) mostraron una respuesta al estrés más intensa (mayor nivel de lactato y cortisol en sangre) y una peor calidad de carne (pH₂₄ más bajo) que los cerdos sometidos a un transporte moderadamente largo (3h), lo cual parece indicar que el viaje más largo podría haber permitido a los animales adaptarse a las condiciones de transporte.

En vacuno también se ha descrito que un incremento en el tiempo de transporte puede tener un efecto negativo en la calidad de la carne, afectando a parámetros de calidad sensorial como la terneza y el flavor (Warris y cols., 2000; Villarroel y cols., 2003). En tiempos relativamente cortos (transportes de menos de 4 horas) se ha demostrado que no ocurren cambios severos a no ser que haya traumatismos (Tarrant, 1989; Grandin, 2000), de hecho se ha comprobado que viajes de hasta 6 horas de transporte no han producido cambios en parámetros de calidad comúnmente controlados, como es el pH de la carne (María y cols., 2003).

En lo que respecta al **ayuno** (período de tiempo en el que el animal permanece sin ingerir alimento y que comprende desde la última vez que consumió alimento sólido en la granja, el tiempo de transporte y la estancia en los cubículos del matadero a la espera del sacrificio) su importancia radica en que el tiempo de ayuno previo al sacrificio afectará a las reservas corporales y musculares del animal, en particular a la cantidad de glucógeno almacenado en el músculo, lo cual afecta enormemente a los procesos de conversión del músculo en carne (Álvarez y cols., 2009).

Un estudio en porcino demostró que los cerdos que estaban más tiempo en ayunas (48 h) y con larga duración del transporte al matadero, en el momento del sacrificio tenían un pH post-mortem final más alto en el músculo, una carne más oscura y una mayor capacidad de retención de agua que los cerdos que no estaban tanto tiempo en ayunas (Leheska y cols., 2003).

En vacuno, el ayuno no parece tener gran influencia sobre la calidad de la carne. Hay que tener en cuenta que además de la privación de alimento previa al sacrificio puede producirse una posible deshidratación que ocasionaría problemas de calidad de la carne, y en esta situación los rumiantes son menos susceptibles que los cerdos a periodos de ayuno debido al rumen que actúa como depósito de nutrientes y agua (Warris, 1990).

En cuanto al **Aturdimiento**, su principal objetivo es que el animal pierda la consciencia para así evitar sufrimiento y facilitar un sacrificio rápido y seguro.

En porcino existen hoy en día dos métodos de aturdimiento, el eléctrico y el gas CO (Velarde y Dalmau, 2018) y se ha comprobado que el aturdimiento por CO reduce la incidencia de carnes PSE y petequias en comparación con el método eléctrico (Velarde y cols., 2000).

En bovino, el uso de la bala cautiva retenida con penetración del cráneo es muy común, la pistola contiene un perno que es impulsado y perfora el cráneo y retorna a la pistola. Esta conmoción es irreversible y el animal pierde la consciencia lo que facilita el posterior sangrado y manejo en el matadero. No obstante, hay estudios como (Oliveira y cols., 2018) que comparan la bala cautiva retenida con y sin penetración en el cráneo y su resultado demuestra que se obtienen mejores resultados de aturdimiento con la penetración de la bala a una presión elevada de libra de fuerza por pulgada cuadrada (190 psi). Y atendiendo a parámetros de calidad sensorial como flavor o terniza el método de la bala cautiva tiene mejores resultados que el aturdimiento eléctrico como refleja un estudio de Önenç y Kaya. (2004).

Mezcla de animales: A lo largo de su vida, los grupos de animales establecen jerarquías y un orden social, habiendo animales dominantes y otros sumisos dentro de cada grupo. Por ese motivo, mezclar lotes y poner a los animales en contacto con individuos nuevos puede comprometer el bienestar animal, ya que produce estrés social y aumenta la agresividad y el comportamiento de lucha (Craig, 1989; Disanto y cols., 2014; Boissy y cols., 2016) aunque la experiencia social previa, el número de los animales que se mezclan y la composición del grupo son factores importantes que modulan sus efectos (Boe y Faerevick, 2003).

Se ha demostrado que mezclar grupos desconocidos tiene efectos significativos tanto en el comportamiento como en la fisiología, produciendo en algunos casos una respuesta crónica al estrés (Chen y cols., 2015). También se ha descrito que mezclar animales desconocidos antes del sacrificio produce agresiones entre animales que pueden provocar miedo y dolor, lo que afecta el metabolismo muscular post-mortem (Terlouw y cols., 2008; Rubio-González y cols., 2015). Hasta ahora, este efecto negativo del estrés por mezcla de animales sobre las características de la carne están bien

documentados cerdos, pero hay menos información sobre sus efectos en el ganado bovino.

1.4.3. Factores Post-mortem

La maduración de la carne es un proceso fundamental que influye en la tenderización que se produce por la degradación de las proteínas del citoesqueleto que mantiene la integridad de las miofibrillas musculares. Este proceso de maduración se encuentra condicionado por factores como la raza, sexo, genotipo, peso vivo, estrés y también por factores inherentes como cambios en la longitud sarcomérica, en la cantidad de tejido conectivo y grado de enlaces cruzados, actividad de enzimas proteolíticas (Koochmaraie y Geesink, 2006) La oxidación de la carne también tiene influencia en la tenderización y tiene un papel importante en la calidad.

Dentro de proteólisis de proteínas miofibrilares que se produce intervienen diversos sistemas enzimáticos como: Las calpaínas (dependientes de calcio) consideradas de las más importantes en el proceso de tenderización, en concreto en la fase temprana post-mortem debido que su actividad baja con la bajada del pH muscular. Las catepsinas (enzimas lisosomales) se activan a pH más ácido por lo que actúan en fases más tardías de la maduración post-mortem y el sistema ubiquitina-proteosoma (dependiente de ATP). En estos últimos años también se han propuesto otros sistemas proteolíticos como caspasas y metaloproteinasas (Sentandreu, 2002) tanto por su capacidad proteolítica sobre el músculo esquelético, como por sus posibles implicaciones en los procesos de muerte celular.

En lo que respecta a la carne de cerdo, está demostrado que el **tiempo de maduración** controlado a baja temperatura es un requisito fundamental para el desarrollo de la ternera (Van Laack y cols., 2001; Channon y cols., 2004, Kim y cols., 2018, Li y cols., 2019).

Referente al periodo óptimo de maduración en relación a la calidad de la carne hay diversos estudios, Channon y cols. (2004) obtuvieron mejores parámetros de calidad al día 7 en comparación con el día 2 en cuanto a ternera, flavor y gusto en

general. Además, la tenderización continúa en cerdo hasta 14 días (Van Laack y cols., 2001) disminuyendo la dureza al aumentar el tiempo de maduración. Rees y cols. (2002) encontraron mejoras en la terneza a tiempos tempranos post-mortem (2 días) aunque el mayor porcentaje fue entre los 4 y 6 días. Por lo que puede sugerirse que el tiempo óptimo de maduración en cerdo se encontraría entre los 2-14 días.

En cambio, la carne de vacuno precisa de tiempos de maduración algo más largos (14-21 días) (Bolumar y cols., 2013). Según Sañudo y cols. (2004) la maduración de la carne tiene un efecto importante en la tenderización que afecta a la dureza, disminuyendo a mayor tiempo de maduración.

Estudios para determinar el tiempo de maduración óptimo en diferentes razas de vacuno en función del perfil sensorial, reflejan la variabilidad existente en cuanto al tiempo de maduración requerido. La duración de este periodo dependerá del tipo de raza, así para la raza AV con presencia del gen de la hipertrofia muscular se sugieren tiempos más cortos (14 días) (Sierra y cols., 2012) y para otras razas más rústicas como AM, Morucha o Retinta tiempos más largos (21 días).

La **textura** es un factor de calidad muy importante en la carne que se adquiere durante la maduración, especialmente la terneza. Los valores sensoriales de terneza en un estudio realizado sobre distintas razas de vacuno fueron mayores a medida que aumentó el tiempo de maduración (Miller y cols., 1997). El flavor también aumenta con la maduración según lo descrito por Spanier y cols. (1997), especialmente después de 10 días.

Las características de los productos cárnicos pueden variar en función del **tipo de envasado y de conservación**. Esto requiere un diseño de envasado adecuado para cada tipo de producto.

Las principales opciones de envasado varían desde envases permeables al aire para almacenamiento a corto plazo hasta el uso de materiales de barrera al vacío o envasados en atmósfera modificada (MAP) para almacenamiento a más largo plazo (Kerry y cols., 2006; McMillin, 2008). El envase permeable al aire permite la unión de mioglobina y O₂ (oxígeno) para formar pigmentos de oximioglobina, que se ven como

un color rojo, hasta que la capacidad reductora se agota y los pigmentos cambian a pigmentos de metamioglobina de un color marrón no deseado.

Los envasados MAP consisten en la eliminación del entorno gaseoso y su reemplazo por una atmósfera gaseosa deseada, generalmente con mezclas de gases a diferentes concentraciones para crear el ambiente necesario para conseguir las características deseadas en la carne (McMillin, 2017). El O₂ crea pigmentos rojos de oximioglobina que eventualmente se oxidan y producen un color marrón. El nitrógeno (N₂) es relativamente benigno, se usa principalmente para eliminar el aire del envasado al vacío o como un gas de relleno para evitar el colapso del paquete en MAP. El dióxido de carbono (CO₂) se usa para la inhibición microbiana. El monóxido de carbono (CO) crea un pigmento rojo, la carboximioglobina, que es altamente estable durante periodos de tiempo mucho más largos que la oximioglobina.

El envasado al vacío se utiliza para una mayor duración del producto y evitar contaminaciones como puede ser *C.Botulinum* de hecho un estudio de Torngren y cols. (2018) refleja que la carne de cerdo y de vacuno envasada al vacío y a 0°C se conserva durante más tiempo y con ausencia de contaminaciones. El diseño de un envasado correcto debe estudiarse para cada tipo de producto cárnico.

1.5. Efecto del bienestar/estrés en la calidad

Durante el traslado desde la explotación al matadero, el ganado es expuesto con frecuencia a diferentes factores que causan agotamiento físico y estrés psicológico, como son el ayuno, el proceso de ruptura de la jerarquía social debido a la mezcla de animales, la interacción con humanos extraños, el manejo rudo o inquietante en el momento de carga y descarga del camión, cambios en las condiciones de temperatura y humedad, movimientos bruscos del camión, ruidos en el transporte y el matadero, sonidos de alerta producidos por otros animales, etc.

Las causas exactas del estrés dependen de las características de cada especie, incluido el sistema de cría. En el caso del ganado porcino, el manejo y la novedad de la situación contribuyen a las reacciones de estrés. Así, la lucha durante la mezcla en los

cubículos, las condiciones de carga y descarga, y la introducción en el inmovilizador son factores determinantes (Terlouw y cols., 2008; Rubio-González y cols., 2015). En el caso del ganado bovino, la alteración del grupo social, el manejo, la carga y descarga, la fatiga, la novedad de la situación y la mezcla de los terneros con animales desconocidos son factores de estrés conocidos (Mounier y cols., 2006; Partida y cols., 2007; Grandin, 2014). Por el contrario, si las condiciones de transporte y alojamiento son buenas y su duración no es demasiado larga, de modo que permita el descanso de los animales, se pueden eliminar los efectos negativos que conlleva el estrés. (Terlouw y cols., 2008).

Hay que tener en cuenta que los factores enumerados pueden ocasionar en mayor o menor medida un estrés psicológico que afecta a los procesos fisiológicos y también al metabolismo post-mortem y, por tanto, al proceso de conversión del músculo en carne. No existe un estudio actualizado que cuantifique la magnitud del problema, pero de forma general se estima que a nivel mundial hay un 10% de carnes defectuosas llamadas DFD (del inglés “Dark, Firm, Dry”, en español “oscura, dura, seca”) por efecto del estrés, debido a un manejo pre-sacrificio inadecuado lo cual supone pérdidas de hasta 20 millones de dólares en países como Australia y Gran Bretaña (Adzitey y Nurul, 2011). Por otro lado en porcino también existe una importante incidencia de carnes defectuosas o PSE que están muy relacionadas con los genotipos susceptibles a estrés como es el caso de la mutación RYR1 (halotano positivo). La incidencia habitual de carnes PSE es entre el 10% y el 30% de la producción, pudiendo alcanzar en algunos casos hasta el 60% de la producción (O’Neill y cols., 2003).

Existen importantes limitaciones para la definición de criterios y medidas de control del estrés. Se han realizado grandes esfuerzos por incrementar los conocimientos en este campo, especialmente en los animales de granja y los expertos defienden la aplicación de sistemas de evaluación de múltiples criterios o “multi-criteria” (alojamiento, sanitarios, comportamiento) para valorar el nivel de bienestar en distintas especies (Velarde y Dalmau, 2012). No obstante, la mayor limitación de este tipo de medidas es que se basan principalmente en valoraciones en grupo, por lo que no tienen en cuenta la variabilidad individual en la susceptibilidad al estrés.

Por ese motivo, los científicos de la carne centran sus esfuerzos en la búsqueda de biomarcadores de estrés animal, especialmente en identificar aquellos que puedan aplicarse a nivel individual y que permitan detectar situaciones de estrés pre-sacrificio, dado sus efectos adversos sobre la calidad final del producto.

1.6. Biomarcadores de estrés

Las respuestas fisiológicas al estrés, han sido descritas detalladamente en una revisión escrita por Romero y cols. (2011). En resumen, se puede afirmar que el estrés altera la homeostasis interna de los animales induciendo cambios en la actividad del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA) y el sistema simpático-adreno-medular. La activación endocrina promueve la liberación de determinadas hormonas, con importante carácter regulador, como las catecolaminas, especialmente adrenalina y noradrenalina, la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), además de corticosteroides, principalmente el cortisol. (Figura 7).

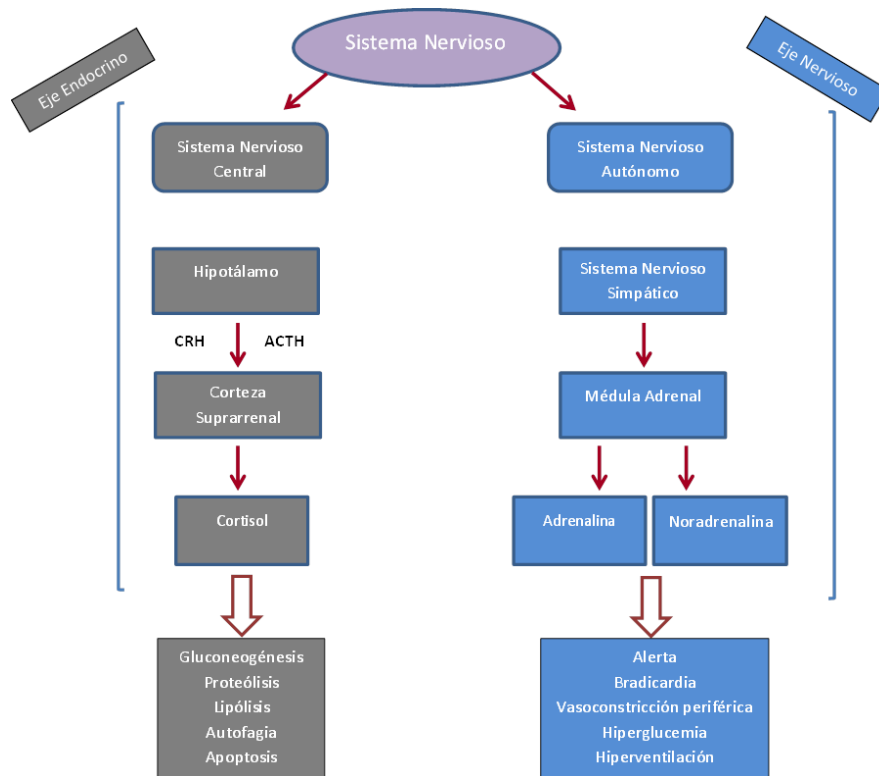


Figura 7. Esquema general de la respuesta al estrés (Romero y cols., 2011). (Elaboración propia adaptada).

El cortisol incrementa la disponibilidad de energía y las concentraciones de glucosa en la sangre, porque estimula la proteólisis, la lipólisis y la gluconeogénesis en el hígado, aumentando la síntesis de enzimas implicadas en la conversión de aminoácidos, glicerol y lactato, en glucosa, aumentando así la movilización de los aminoácidos desde el músculo (Muchenje y cols., 2009). También disminuye el transporte y utilización de glucosa por las células, incrementando la concentración de glucosa en sangre (Lay y Wilson, 2001; Trevisi y Bertoni, 2009).

En esta compleja respuesta fisiológica se presenta, además, un proceso de retroalimentación negativa, permitiendo que el cortisol actúe sobre el hipotálamo y la hipófisis disminuyendo la producción de CRH y ACTH (Lay y Wilson, 2001). En esta etapa el organismo intenta adaptarse o afrontar la presencia de los factores que percibe como amenaza, en donde se presenta una normalización de los niveles de corticosteroides y, por tanto la desaparición del estado de estrés, etapa que se ha denominado de “relajación”.

Hasta la fecha, la mayoría de los investigadores estudian el estrés animal a partir de distintos constituyentes sanguíneos, como el cortisol, el hematocrito, la concentración de glucosa, la actividad de la enzima creatinquinasa (CK) o las concentraciones de β -hidroxibutirato y lactato (Averós y cols., 2008; Oliván y cols., 2014; Dokmanovic y cols., 2015).

También se ha destacado el gran potencial de otras moléculas, como las proteínas de fase aguda (acute phase proteins, "APPs") como posibles biomarcadores de estrés, debido a su conocido papel como indicadores de situaciones de infección, inflamación o estrés. Diversos estudios han demostrado que los niveles de haptoglobina y de la proteína *Major Acute-Phase* "Pig-MAP" en plasma se incrementan en cerdos sometidos a situaciones que comprometen el bienestar, como es el manejo a densidades altas, el transporte largo o la mezcla con animales extraños (Saco y cols., 2003; Piñeiro y cols., 2007; Marco-Ramell y cols., 2011).

Un importante efecto del estrés psicológico, con claras repercusiones para el individuo que lo sufre, es el incremento del estrés oxidativo en el organismo, que puede inducir disfunciones en muchos tejidos (Li y cols., 2012). En general, el estrés psicológico ocasiona un incremento en la producción de radicales libres, lo cual provoca un desequilibrio entre las EROs y la capacidad del sistema para detoxificar y reparar el daño resultante (Lardoney cols., 2006). Existen evidencias de que las situaciones estresantes en el manejo animal, como el transporte por carretera, el destete o el estrés térmico pueden causar cambios oxidativos (Pregel y cols., 2005; Burke y cols., 2009). Sin embargo, resulta difícil medir directamente las EROs por lo que se realizan medidas indirectas como el estudio del nivel de oxidación de las proteínas o de los daños de lípidos (Vega-Naredo y cols., 2012).

Del mismo modo, la actividad de los enzimas antioxidantes en músculo ha sido relacionada con el estrés en respuesta a la mezcla de animales por nuestro grupo (Rubio-González y cols., 2015).

1.6.1. Biomarcadores de estrés oxidativo

El estado de estrés oxidativo se produce como consecuencia de un desequilibrio en el organismo debido a un aumento de los radicales libres y/o una disminución de los antioxidantes. Los radicales libres pueden ser moléculas orgánicas o inorgánicas, extremadamente inestables y con un gran poder reactivo ya que tienen en el orbital más externo de su estructura uno o más electrones desapareados, siendo así muy susceptibles a reacciones con otro átomo o molécula cercana para recuperar su estado neutro ideal.

Los orgánulos celulares que generan radicales libres principalmente son las mitocondrias, los lisosomas y las membranas (citoplasmáticas, nucleares y las del retículo endoplásmico) (Turrens, 2003). El sistema antioxidante es esencial en el mantenimiento de la homeostasis celular, ya que es capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas (Kregel y Zhang, 2007), mediante la eliminación de EROs.

Cuando el equilibrio entre los radicales libres y los mecanismos de defensa antioxidante, denominado “balance oxidativo”, se desregula a favor de los radicales libres, se van a desencadenar procesos dañinos que serán asociados con el desarrollo de numerosas enfermedades. La destrucción de las moléculas celulares debido a un exceso de EROs, que no han sido neutralizados por la defensa antioxidante del organismo, es lo que se conoce como **daño oxidativo** (Pierrefiche y Laborit, 1995).

Estas EROs son ubicuas y derivan del metabolismo del oxígeno producido en todos los sistemas biológicos que reaccionan con las moléculas circundantes en el lugar de formación. Principalmente incluyen: el radical superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Roberts y Sindhu, 2009) (Figura 7).

1.6.2. Daño oxidativo a lípidos

La oxidación de lípidos denominada lipoperoxidación (LPO) representa un fenómeno degradativo de propagación de un conjunto de reacciones de radicales libres, afectando sobre todo a los ácidos grasos poliinsaturados, los cuales se pueden encontrar en las lipoproteínas y membranas biológicas mayoritariamente, y son muy

sensibles a la oxidación. Existen evidencias de que los aldehídos que son generados por la vía endógena durante la LPO, van a estar relacionados con las patologías asociadas al estrés oxidativo en células y tejidos (Esterbauer y cols., 1991).

1.6.3. Defensa antioxidante celular

El organismo tiene sistemas naturales antioxidantes que ayudan a mantener los niveles de EROs controlados, sin embargo, estos sistemas antioxidantes pueden verse alterados por la acumulación excesiva de radicales libres o situaciones patológicas diversas dando lugar al estrés oxidativo (Park y Kwak, 2016).

Los enzimas antioxidantes que están involucrados en la eliminación de las especies reactivas de oxígeno, incluyen fundamentalmente los enzimas SOD, CAT, glutatión peroxidasa (GPx y glutatión reductasa (GSH).

La SOD es la primera y más importante metaloenzima antioxidante, descubierta por McCord y Fridovich. (1969) cuando observaron la dismutación de O_2^- en H_2O_2 y oxígeno molecular.

Tanto la CAT como el sistema GPx/GSH se van a encargar de eliminar el H_2O_2 . Es un enzima intracelular que se suele ubicar en el interior de los orgánulos principalmente los peroxisomas (De Duve y Baudhuin, 1996). La CAT actúa como catalizador para la conversión de H_2O_2 a oxígeno molecular y agua. Su acción anulará el efecto del H_2O_2 que está presente intracelularmente (Jeeva y cols., 2015). Dado que el H_2O_2 es un potente agente oxidante, las células expresan abundante CAT para convertirlo en oxígeno molecular y agua. Sin embargo la presencia de metales de transición reducidos tales como el Cu o el Fe, pueden convertir el H_2O_2 en OH altamente reactivo a través de las reacciones de Fenton o Haber-Weiss (Roberts y Sindhu, 2009).

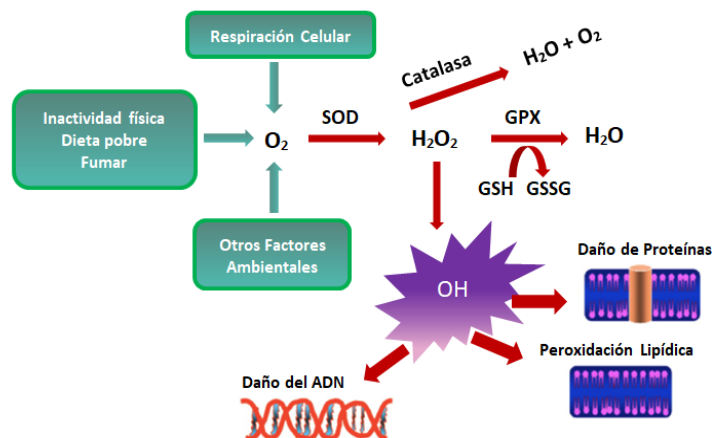


Figura 8. Descripción de la generación y desintoxicación enzimática antioxidante de EROs (Adaptada de Roberts y Sindhu, 2009).

1.6.4. Relación entre el estrés oxidativo y la calidad de la carne

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

Se ha demostrado que la actividad antioxidante disminuye en los tejidos animales estresados, alterándose gradualmente el balance redox entre moléculas oxidantes y antioxidantes, y favoreciendo así el daño oxidativo (Li y cols., 2011).

Los estudios llevados a cabo hasta el momento, relacionan el incremento en la formación de EROs con la caída abrupta de oxígeno tras el sacrificio y exsanguinación del animal, promoviendo la inhibición de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Coto-Montes y cols., 2004).

Las EROs conocidas como moléculas de señalización, como el anión superóxido, el radical hidroxilo y el oxígeno, son radicales libres en los que el oxígeno está

involucrado y es producido principalmente por las mitocondrias; estas moléculas participan en la transmisión de señales durante el estrés oxidativo, que puede dañar el tejido muscular, inhibir el correcto funcionamiento e inducir la apoptosis.

La acumulación de EROS puede activar la vía apoptótica al alterar el potencial de la membrana mitocondrial. Este cambio influye en el canal de oxidación mitocondrial y puede llevar a que el citocromo c se libere de las mitocondrias al citoplasma para activar la apoptosis en varios tipos de células (Wang y cols., 2018).

Se han descrito diferentes tipos de muerte celular, programada (apoptosis, autofagia) o no programada (necrosis) (Figura 9). Su prevalencia en el tejido muscular dependerá de las condiciones pre- y post-sacrificio, pudiendo afectar en gran medida al proceso de conversión del musculo en carne, y con ello a la adquisición final de un grado de terniza y una calidad óptima.

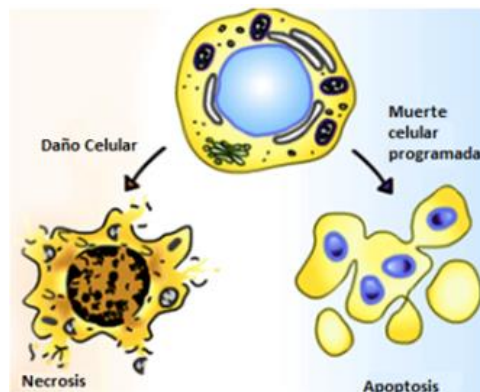


Figura 9. Representación de los tipos de muerte celular.

1.7. Muerte celular programada

1.7.1. Autofagia

La autofagia es uno de los mecanismos de defensa celular que se puede activar en respuesta a una producción excesiva de EROs. Estas EROs actúan como moléculas de señalización en los primeros eventos de la inducción de la autofagia sirviendo esta a

su vez, para reducir las moléculas y los orgánulos dañados por la oxidación. Si la autofagia elimina orgánulos dañados que de otra manera activarían muerte celular programada como apoptosis, entonces la autofagia sería protectora. La autofagia basal constitutiva, que preserva la función mitocondrial, es crucial para la homeostasis del músculo cardíaco y esquelético. Sin embargo, dependiendo del grado de daño celular, este mecanismo de defensa puede ser excesivo y puede llegar a promover un tipo de muerte celular programada (a través de la apoptosis o la autofagia), ya que se produce una liberación de enzimas lisosomales, como las catepsinas y otras hidrolasas que pueden iniciar la permeabilización mitocondrial, la liberación de factores proapoptóticos y la producción de EROs, siendo la autofagia una característica destacada de los procesos de muerte celular en este caso (Coto-Montes y cols., 2012)

El rasgo característico de la autofagia es la formación de una estructura de doble membrana llamada autofagosoma que liberará su contenido al lisosoma para su posterior degradación. Es un mecanismo de defensa para las células que sufren estrés metabólico en el músculo esquelético, para la eliminación de agregados de proteínas y daños mitocondriales, participa en procesos fisiológicos, patológicos, de supervivencia celular, muerte celular y envejecimiento entre otros y recientemente se ha demostrado su papel en la tenderización de la carne (García-Macia y cols., 2012).

Se han descrito tres tipos de autofagia: microautofagia, macroautofagia y autofagia mediada por chaperonas. El proceso autofágico, y sobre todo la macroautofagia que conduce a la PCDII en la célula, ha ganado importancia en relación al mundo de la carne en los últimos años. En determinadas circunstancias y como consecuencia de un intento fallido de preservar la supervivencia celular, se forman varios autofagosomas en toda la célula, tragando gran parte de los componentes citoplásmicos y dando como resultado un tipo de muerte celular con características autofágicas denominadas PCD tipo II (Coto-Montes y cols., 2012).

Un estudio llevado a cabo por nuestro equipo de investigación (García-Macia y cols., 2013) ha demostrado la ocurrencia de autofagia (PCDII) en las células musculares del *Longissimus Dorsi* (LD) en vacuno (García-Macia y cols., 2013). Debido a las condiciones oxidativas derivadas de la exsanguinación durante la muerte del animal, las células pueden desencadenar el recambio fisiológico de los orgánulos a través de la

autofagia. La autofagia parece estar involucrada en la fase previa al rigor y muestra distinta incidencia en función de la raza, ya que en este estudio se encontraron diferencias entre la carne de las dos razas autóctonas analizadas (AV y AM) de modo que en la raza AM la autofagia se desencadena más rápidamente lo que parece ralentizar la degradación celular y, finalmente, la maduración de la carne.

La autofagia retrasaría la desintegración del disco Z, la pérdida del alineamiento transversal de los sarcómeros y la división longitudinal de miofibras, con importantes consecuencias en la destrucción muscular y en el proceso de tenderización. Este descubrimiento puede tener implicaciones importantes para mejorar la comprensión de los procesos implicados en la conversión del músculo en carne y en la búsqueda de biomarcadores de la calidad de la carne. (García-Macia y cols., 2013).

La autofagia desencadenada por el estrés oxidativo ha sido ampliamente documentada en algunas células como las células cancerosas (Sir y cols., 2008), sin embargo todavía se desconoce la relación existente entre el estrés psicológico y/o físico y la autofagia si bien es posible que se desencadene la autofagia en respuesta al estrés ante- o peri-mortem cuando este estrés produce alteraciones en el balance oxidativo.

En un estudio realizado por nuestro grupo para ver el efecto del estrés en el cerdo se pudo demostrar que en los músculos de animales sometidos a situaciones de estrés derivadas de la mezcla de animales ante y peri-mortem se producía un incremento de la defensa antioxidante lo que tiene efectos claros sobre el daño inducido por radicales libres y además se observó la ocurrencia de autofagia (Rubio-González y cols., 2015). Por lo tanto, la autofagia parece jugar un papel relevante en la regulación del metabolismo muscular post-mortem y por tanto en el proceso de conversión del músculo en carne.

1.7.2. Apoptosis

Es un proceso regulado genéticamente y equilibrado para la eliminación selectiva de células excesivas, dañadas o potencialmente peligrosas sin dañar las

células circundantes, que se produce en todos los tejidos como parte del recambio celular normal. El modo de regulación de la apoptosis dependerá de la naturaleza del estímulo inicial y del tipo de célula. Sobre esta base, se pueden distinguir dos formas principales: extrínseca (mediada por receptores transmembrana) e intrínseca (episodios mitocondriales, entre otros).

Sentandreu y cols. (2002) propusieron por primera vez la hipótesis de que el sistema proteolítico de caspasas había participado en la proteólisis y en la tenderización de la carne durante el proceso de maduración post-mortem.

Se sabe que la activación de las caspasas se produce rápidamente “in vivo”, en aproximadamente 10 minutos a partir de los estímulos apoptóticos, y una vez que la muerte celular se activa es inevitable (Green, 2005). Por lo tanto, este fenómeno podría suceder en el músculo desde los primeros minutos post-mortem, un período que se sabe que es esencial para el proceso de maduración. Debido a esta activación rápida, junto con el hecho de que la desmina es uno de los sustratos de las caspasas y su degradación contribuye significativamente a la tenderización de la carne, estos enzimas podrían ser buenos predictores de la terneza y por tanto la calidad final de la carne (Geesink y cols., 2006; Hopkins, 2017).

También las proteasas lisosomales, catepsinas, parecen estar involucradas en la apoptosis. Algunos autores han demostrado que las catepsinas promueven la muerte celular programada indirectamente desencadenando la disfunción mitocondrial y la posterior liberación de proteínas mitocondriales (Boya y cols., 2003, Broker y cols., 2005). Además las catepsinas pueden activar a las caspasas, confirmando así que la permeabilización lisosómica a menudo es un evento temprano en los procesos de muerte celular programada, no solo en la autofagia sino también en la cascada apoptótica, (Broker y cols., 2005).

En resumen, durante las primeras horas post-mortem en las células musculares se reduce la energía, baja el pH, se libera calcio, etc... (Longo y cols., 2015). La ausencia de glucosa reduce la producción de ATP y produce estrés oxidativo activando vías asociadas a Bax (factor proapoptótico) y la hipoxia regula también a p53 (regula transcripción de Bax) (Chipuk y cols., 2004). Al bajar el pH también se produce una

acidificación que activa ADNAsas que participan en la apoptosis y también se produce un aumento de la acumulación de iones de calcio que es un desencadenante de la liberación del citocromo c desde el espacio intermembrana mitocondrial al citosol, donde puede activar las caspasas y conducir a la apoptosis que es el primer paso en la conversión del músculo en carne (Picard y cols., 2017).

1.7.3. Necrosis

Al contrario que la muerte celular programada, se considera una muerte celular "desordenada". Se define como un tipo pasivo de desaparición celular que carece de eventos de señalización subyacentes. Se produce como consecuencia de un desastre bioenergético por el que el ATP se ve reducido a niveles incompatibles con la supervivencia celular (Ejemplo "accidentes" celulares como condiciones fisicoquímicas extremas, que incluyen anoxia abrupta, escasez repentina de nutrientes, calor o detergentes o activación de enzimas no hidrófilos activadas por Ca^{2+} (Budd y Nicholls, 1996)) y por tanto las células pierden su integridad. Durante la necrosis, las células se hinchan de agua aumentando de volumen (oncosis) hasta el punto donde se produce la lisis de su membrana plasmática, explosión celular que conduce a la liberación del contenido citoplasmático en el medio circundante causando inflamación (Kroemer y cols., 2009). También se produce una condensación moderada de cromatina y la fragmentación del ADN nuclear de forma "aleatoria" por activación de las endonucleasas, en particular por serin peptidasas.

La necrosis de una célula afecta a otras células por la acción de las enzimas intracelulares liberadas y de los leucocitos sanguíneos que acuden a modo de refuerzo para despejar el sitio (inflamación local) (Ouali y cols., 2006).

Es un proceso que se considera dañino, porque a menudo se asocia con condiciones patológicas que producen daños de la membrana celular, desequilibrios osmóticos, flujos de iones, inflamación de las células y finalmente la muerte sin las características de la apoptosis y sin vacuolización autofágica masiva (Golstein y Kroemer, 2007).

Hasta la fecha la necrosis no ha sido descrita en el músculo post-mortem aunque parece lógico pensar que se producirá necrosis a medida que aumenta el tiempo tras el sacrificio y se agotan las reservas energéticas (Sentandreu y cols., 2002).

1.8. Biomarcadores de calidad: Aplicación de la proteómica

Uno de los principales objetivos de los científicos de la carne es la identificación (“in vivo” o en el post-mortem temprano) de biomarcadores, que son indicadores biológicos (proteínas o metabolitos) de la ocurrencia de un determinado proceso celular correlacionado directa o indirectamente con la calidad final de la carne. Estos estudios resultan caros, invasivos y complejos, pero dan información muy valiosa que permite explicar la variabilidad de la calidad de la carne (Picard y cols., 2015).

Las proteínas forman parte fundamental de la estructura del músculo y participan en todas las reacciones celulares actuando como enzimas, pero también como moléculas “diana” de las actividades oxidativas y proteolíticas. Por ese motivo, se hace esencial aplicar la proteómica, que permite un análisis completo del contenido proteico celular o proteoma del músculo, para obtener información de los cambios proteicos y entender el papel de determinadas proteínas en los procesos bioquímicos y celulares que ellas reflejan, y que ocurren ligados al proceso de transformación del músculo en carne (Hollung y cols., 2007).

La proteómica moderna es entendida como una comparación cualitativa y cuantitativa de proteomas bajo diferentes condiciones para entender mecanismos subyacentes de procesos biológicos. Esta rama actualmente abarca muchos campos como enfermedades, procesos celulares, industria biotecnológica y muchas aplicaciones en la calidad alimentaria (Carbonaro, 2004).

En particular, en la industria cárnica la proteómica está enfocada a la búsqueda de marcadores moleculares (biomarcadores (Figura 9) que permitan un diagnóstico o detección más precisa y/o temprana de parámetros de interés y el estudio de los cambios en el producto, por su participación en los procesos glucolíticos, oxidativos y

proteolíticos que determinan en gran medida la calidad final de la carne (Bendixen, 2005; Jian y cols., 2006; Bjarnadottir y cols., 2010; Sierra y cols., 2012).

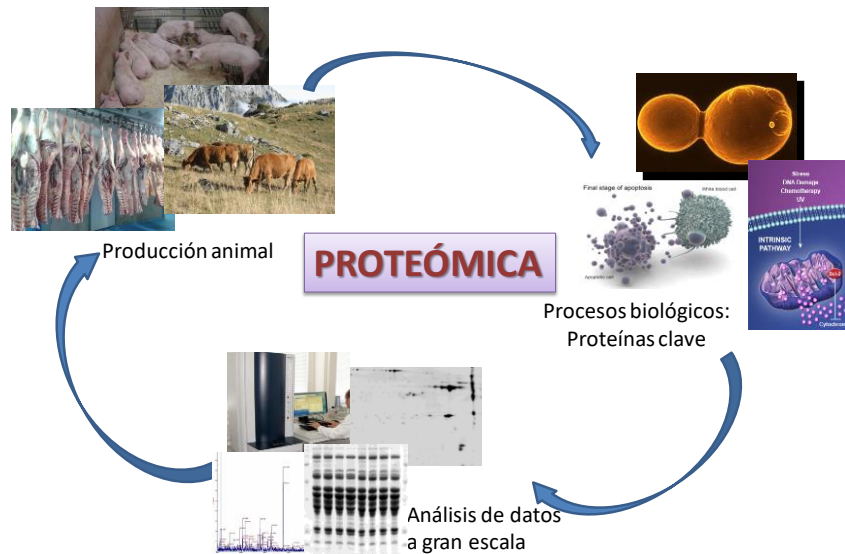


Figura 10. Aplicación de la proteómica para estudiar biomarcadores de calidad en la carne.

Una proteína es el producto final de un gen y la regulación de ese gen puede depender a su vez de otra proteína que a su vez puede estar influenciada por factores ambientales, epigenómicos. La proteómica nos permite estudiar cambios en momentos exactos, por lo que su análisis juega un papel muy importante en el estudio de la tenderización y de los procesos que se suceden en el músculo a consecuencia del estrés (D'Alessandro y Zolla, 2013; Gobert y cols., 2014; Shilling y cols., 2017).

Dentro de los biomarcadores de mayor importancia tenemos un grupo relativamente amplio, como son las proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins) que se encuentran en niveles bajos en condiciones psicológicas normales pero cuando se produce estrés celular (por hipertermia, daño oxidativo o por presencia de algún estresante químico) aumentan. Funcionan principalmente como chaperona, ya que interviene en el plegamiento de proteínas y se clasifican según su peso molecular, ejemplo: HSP70, 90, 100 (Golli-Bennour y Bacha, 2011). También se ha demostrado su rol en cuanto a protección celular se refiere, por ejemplo, HSP27 retrasa la proteólisis y la Hsp70 tiene una acción anti-apoptótica (Carvalho y cols., 2014).

En el tejido muscular se han realizado diversos estudios de biomarcadores de calidad, encontrándose con frecuencia citados determinados enzimas que participan en procesos de metabolismo energético, como la lactato deshidrogenasa “LDH” (37 kDa, interconversión piruvato-lactato), isocitrato deshidrogenasa “ICDH” (11 kDa, ciclo de Krebs), Piruvato kinasa “PKM2” (63 kDa, glicolisis, gluconeogénesis), malato deshidrogenasa “MDH” (Krebs, gluconeogénesis) (Te pas y cols., 2013). También se han encontrado biomarcadores estructurales del músculo, como la miosina o la alfa actina que también participa en la tenderización, o de proteólisis como las calpaínas (Gagaoua y cols., 2015).

Los biomarcadores con papel relevante en la tenderización de la carne han sido clasificados en los siguientes grupos: Proteínas de choque térmico (protección), metabólicos (glicolítico y oxidativo), estructurales, resistencia oxidativa, desintoxicación celular, actividad mitocondrial – apoptosis y proteolíticos (Ouali y cols., 2013; Gagaoua y cols., 2015).

Otros estudios se han centrado en la búsqueda de biomarcadores de los procesos metabólicos relacionados con el color en la carne, mediante la aplicación de técnicas genómicas y proteómicas (Gagaoua y cols, 2015). Estos autores demostraron que los principales parámetros de color (L^* , a^* , b^*) tienen relación significativa con proteínas de choque térmico (Hsp70-8, Hsp27), biomarcadores metabólicos (ENO3), biomarcadores estructurales (μ -calpaína) y biomarcadores de resistencia oxidativa (peroxirredoxina-6). Gran parte de estos mecanismos que involucran al color han coincidido con los encontrados anteriormente ligados a los procesos de tenderización de la carne (Gagaoua y cols., 2017).

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

El **Objetivo General** de esta Tesis Doctoral ha sido estudiar el efecto de distintos factores de manejo del animal sobre los procesos implicados en la conversión del músculo en carne, tanto en ganado vacuno como en porcino, con el fin de identificar potenciales biomarcadores de calidad relacionados con situaciones de estrés animal.

Para la consecución de dicho Objetivo General, se han abordado los siguientes **objetivos parciales**:

Objetivo 1: Efecto del sexo y el genotipo (mutación del gen RYR1) sobre la susceptibilidad individual al estrés y sus consecuencias sobre el metabolismo post-mortem del músculo y la calidad final de la carne de porcino (Capítulo 3).

Objetivo 2: Efecto del estado emocional (sesgo cognitivo) del animal sobre el estrés psicológico en el momento del sacrificio y sus consecuencias sobre el metabolismo post-mortem del músculo en ganado porcino (Capítulo 4).

Objetivo 3: Efecto de la mezcla con animales extraños durante la fase de transporte y espera previos al sacrificio sobre el metabolismo post-mortem del músculo y la calidad de la carne en porcino y vacuno (Capítulo 5).

Objetivo 4: Efecto del manejo en granja (intensivo vs semi-extensivo) y su interacción con la mezcla con animales extraños durante la fase de transporte y espera previos al sacrificio sobre el metabolismo post-mortem del músculo y la calidad de la carne de vacuno (Capítulo 6).

**CAPÍTULO 3: EFECTO DEL SEXO Y DEL GENOTIPO
(MUTACIÓN DEL GEN RYR1) SOBRE EL ESTRÉS AL
SACRIFICIO, EL METABOLISMO MUSCULAR POST-
MORTEM Y LA CALIDAD FINAL DE LA CARNE EN
PORCINO**

1. Introducción

La calidad de la carne debe considerarse desde un punto de vista multifactorial, incluyendo aspectos tecnológicos, nutricionales, sensoriales, de seguridad y éticos. Su estudio resulta complejo, ya que se ve afectado por diversos factores, como la genética del animal, particularidades del sistema de producción, la respuesta fisiológica de los animales al tratamiento ante-mortem y el acondicionamiento post-mortem de las canales, entre otros.

El efecto del sexo sobre la calidad de la canal de cerdo ha sido estudiado en diversos trabajos. En general, los machos presentan menos acumulación de grasa en los tejidos (Gispert y cols., 2010), sin embargo, existe controversia sobre el efecto del sexo en la aparición de carne defectuosa PSE, habiendo algunos estudios que muestran efectos significativos (Cisneros y cols., 1996; Channon y cols., 2004) mientras que otros no (Blanchard y cols., 1999; Channon y cols., 2000). Estas diferencias entre experimentos, podrían deberse en parte a diferentes condiciones de manejo ante-mortem, que pueden influir en las reacciones del animal ante el estrés en el sacrificio y que pueden influir en la calidad final de la carne (Hambrecht y cols., 2005a, b; Terlouw y Rybarczyk, 2008; Boler y cols., 2010; D'Eath y cols., 2010).

Los cruces genéticos más utilizados en España incluyen en la mayoría de los casos la línea del macho Pietrain, en heterocigosis respecto a la mutación del gen RYR1 (Nn). Esta mutación se ha relacionado con una mayor susceptibilidad al estrés y con la inducción de hipertermia maligna en cerdos (Fujii y cols., 1991), con efectos perjudiciales sobre la calidad de la carne (Fàbrega y cols., 2004).

De modo que, podríamos suponer que los cerdos de diferente sexo y genotipo pueden responder de manera diferente al manejo previo al sacrificio (Carreras y cols., 2016), lo cual puede afectar el proceso post-mortem de conversión del músculo en carne. Este proceso implica mecanismos bioquímicos complejos que dependen en gran medida de los antecedentes genéticos, el medio fisiológico tisular y la percepción de peligro o miedo por parte del animal durante el proceso de sacrificio. Hasta la fecha, todavía no existe una definición precisa del estrés animal, probablemente debido a la

complejidad de las diferentes situaciones físicas y psicológicas, aunque puede describirse como “el estado fisiológico, de comportamiento y psicológico del animal frente a una situación potencialmente amenazante” desde el punto de vista del animal.

Además, es importante tener en cuenta que el nivel de estrés del animal depende indirectamente de la situación y directamente de la evaluación de la situación por parte del animal (Terlouw, 2005). Por este motivo, los científicos de la carne muestran un creciente interés en la identificación de biomarcadores que podrían ser indicadores de estrés en el momento del sacrificio y que podrían usarse como predictores indirectos de la calidad final de la carne. En este campo, la proteómica es una herramienta prometedora, aunque su aplicación aún se encuentra en desarrollo y muy pocos estudios se han centrado en el estrés dependiente de cambios proteómicos a nivel muscular (Franco y cols., 2015; Fuente-García y cols, 2019).

El objetivo de este experimento es investigar el efecto del sexo (masculino / femenino) y del genotipo RYR1 (NN / Nn) en variables fisiológicas, bioquímicas y proteómicas detectadas en la canal que pueden influir en el proceso de conversión del músculo en carne y que reflejan la susceptibilidad de los animales al estrés en el sacrificio.

2. Material y métodos

2.1. Animales y manejo

Cuarenta y ocho cerdos del cruce [Large White × Landrace] x Pietrain fueron seleccionados al azar en una granja comercial y repartidos en cuatro grupos de 12 cerdos cada uno. Cada grupo contenía NN hembras, NN machos, Nn hembras y Nn machos. El genotipo RYR1 se determinó en los cerdos a las cinco semanas de vida a partir de una muestra de cabello usando el método de Fujii y cols. (1991). A las nueve semanas de edad, los cerdos fueron transportados desde la granja comercial a las instalaciones experimentales del IRTA (instituto de investigación y tecnología

agroalimentaria) y alojados por separado según tratamiento (sexo × genotipo) en 8 corrales (6 cerdos por corral), es decir, con dos réplicas por tratamiento. Los cerdos se mantuvieron en corrales (5 × 2,7 m) con suelo enrejado, en condiciones de luz natural y a una temperatura ambiental constante de 22°C ± 3°C.

Cada corral estaba provisto de un cuenco bebedero de acero (15 × 16 cm) conectado a un pezón y de un comedero de hormigón (58 × 34 cm) con cuatro puestos de alimentación. Los animales disponían de agua y alimento *ad libitum*. Los cerdos eran inspeccionados diariamente y no se observaron problemas de salud durante el período experimental.

Al alcanzar un peso promedio de 111,4 ± 10,5 kg, los cerdos fueron transportados al matadero experimental del IRTA (situado a 1,2 km) conservando los grupos de cría sin mezclar. Los animales fueron manipulados con cuidado durante el transporte y en el matadero para evitar un estrés adicional. Hubo dos lotes de sacrificio, en dos semanas consecutivas, incluyendo 24 animales por día. El sacrificio duró entre 30 minutos y 3 horas.

2.2. Toma de muestras y medidas de calidad de carne

La sangre se recogió en la exsanguinación en tubos sin anticoagulante. El suero se obtuvo por centrifugación a 2000 xg durante 10 minutos y se mantuvo en alícuotas a -80°C.

El lado izquierdo de cada canal fue utilizado para evaluar la calidad de la carne. El pH muscular se midió a los 45 min (pH45) y a las 24 h (pH24) post-mortem en el músculo *Longissimus thoracis* (LT), usando un medidor de pH portátil Crison equipado con un electrodo xerolítico. La conductividad eléctrica (CE) también se midió a las 24 h post-mortem en el mismo lugar utilizando un Medidor de Calidad de Cerdo (PQM-I, INTEK Aichach, Alemania).

El color de la carne se registró en tres puntos de 10 mm de diámetro en la superficie de corte expuesta del músculo *Longissimus thoracis* (LT) en la última costilla

a las 24 h post-mortem. Los indicadores de luminosidad (L^*), índice de rojo (a^*) e índice de amarillo (b^*) se tomaron con un espectrofotómetro Minolta C2002, iluminante C (Konica Minolta Inc., Madrid, España), y se promedió el valor obtenido de los tres puntos.

Tras el sacrificio (15-20 min post-mortem) se tomaron muestras de carne (20 g) del músculo LT de cada cerdo a nivel de la última costilla para el análisis electroforético por SDS-PAGE del perfil proteico de extractos sarcoplásmicos. Estas muestras musculares se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

La pérdida por goteo de la carne (% exudado) se determinó por duplicado en muestras frescas de 25 mm de diámetro extraídas del LT a las 24 h post-mortem y colocadas en un recipiente especial (Meat juice collector, Sarstedt, Alemania), según el método de Rasmussen y Andersson (1996) con pequeñas modificaciones.

La textura instrumental se determinó en muestras de LT utilizando el ensayo de Warner Bratzler, siguiendo los procedimientos descritos en Ampuero Kragten y Gil (2015). A las 24 h post-mortem las muestras fueron envasadas al vacío y almacenadas a 4°C hasta cumplir su periodo de maduración correspondiente, finalmente se congelaron (-20°C) a los 1, 3 y 5 días de maduración. Posteriormente las muestras fueron descongeladas a 4°C una noche y cocinadas en un baño hasta alcanzar una temperatura central de 71°C y luego se obtuvieron 5 sub-muestras utilizando un punzón. Estas sub-muestras se analizaron individualmente para la dureza instrumental (fuerza máxima de corte, en kg) con TA.XT Plus Texture Analyzer (Stable Microsystems, Haslemere, Reino Unido) y se calculó el valor medio para cada animal y tiempo.

2.3. Parámetros bioquímicos y fisiológicos en la sangre

Se analizaron, por duplicado, los siguientes metabolitos:

- Marcadores de la utilización de la glucosa: glucosa (método Hexokinasa), lactato (método enzimático LOD-Lactato Oxidasa).
- Marcadores del metabolismo del nitrógeno: creatinina (método Jaffé), urea (método GLDH), proteínas totales (método Biuret).
- Marcadores del metabolismo lipídico: triglicéridos (método GPO-PAP), colesterol total (método CHOP-PAP), colesterol HDL (método de inmunoinhibición), colesterol LDL (método de protección selectiva), ácidos grasos no esterificados (NEFA-C reactivo, Wako Chemicals) y 3-hidroxiacetil-CoA (BHB, reactivo de Ranbut, Randox Laboratories, Ltd).
- Proteínas de fase aguda "APPs" como marcadores inflamatorios: haptoglobina (Phase Haptoglobin, Tridelta Ltd), proteína C-reactiva (CRP, método inmunoturbidimétrico) y PigMAP (ELISA, PigChamp ProEuropa).
- Marcador de músculo esquelético: creatina quinasa (CK, método IFCC).
- Marcador de estrés oxidativo: glutatión peroxidasa GPx (método Cumene Hydroperoxyde, Ransel, Randox Laboratories Ltd).
- Hormona de estrés: cortisol (ELISA, DRG Diagnostics, Alemania).

Todos los parámetros se determinaron mediante técnicas espectrofotométricas en el analizador Olympus AU400, con la excepción de Pig-MAP y cortisol, que se determinaron mediante ELISA.

2.4. Extracción proteica de la fracción sarcoplásmica y electroforesis

La fracción proteica sarcoplásmica, que contiene la mayoría de las enzimas de la vía glucolítica y otras proteínas metabólicas (Hollung y cols., 2007), se extrajeron de cada muestra muscular individual (una por animal), tomada inmediatamente después del sacrificio y cuantificada siguiendo el método descrito por Jia y cols. (2009). Un total de 600 mg de tejido muscular fue cogido y homogeneizado en 2 ml de tampón Tris-EDTA-Sacarosa "TES" (Tris 10 mM [pH 7,6], EDTA 1 mM y sacarosa 0,25 M), usando un

Polytron PT1200 E (Kinematica Inc., Lucerna, Suiza) tres veces durante 15 segundos a velocidad máxima. El homogeneizado se centrifugó (30 min a 8800 xg) a 4°C para eliminar las proteínas insolubles en TES.

Las concentraciones de proteína se midieron con un kit comercial a 760 nm (RC DC Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) en un espectrofotómetro Lambda 35 UV / VIS (Perkin Elmer, Massachusetts, EE. UU.) utilizando albúmina de suero bovino como patrón.

Después se desnaturalizaron 120 µg de proteínas mezclando con tampón (Tris / HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS al 2%, glicerol al 20%, mercaptoetanol al 5%, azul de bromofenol al 0,025%) y se calentaron a 95°C durante 5 minutos, y cargados en geles de placa vertical doble de 1 mm (Xi Protean II, Bio-Rad Laboratories Inc., CA, EE. UU.) para la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico unidimensional (SDS-PAGE), según el procedimiento descrito por Sierra y cols. (2012).

El gel de resolución fue al 11% y el gel de empaquetamiento 4% de acrilamida al 30% (p / vol): bisacrilamida y una mezcla de Tris / HCl (375 mM) pH 8,8, agua milli-Q, SDS 10% (p / vol), persulfato de amonio al 10% (peso / volumen) y 0.1% de TEMED. Los marcadores de peso molecular preteñidos (Precision Plus Protein All Blue Standards, Bio-Rad Laboratories Inc., Hércules, CA) también se analizaron en cada gel para determinar los pesos moleculares de la banda de proteína. Los geles (tamaño 20 cm x 20 cm) se corrieron a 80 V durante 2 h, 160 V durante 2 h, 250 V durante 10 h y 500 V durante 20 min (Universal PowerPack 500, Bio-Rad), teñidos en una mezcla de 30% (vol / vol) de metanol, 10 % (vol / vol) de ácido acético y 0,01% (p / vol) de Coomassie Brilliant Blue R-250 y se destiñeron usando una mezcla de 40% (vol / vol) de metanol y 10% (vol / vol) de ácido acético. Se hicieron tres geles por muestra muscular y se calculó el valor medio para cada animal con técnicas de análisis de imágenes.

2.5. Análisis de imagen e identificación de proteínas por huella peptídica

Las imágenes de gel teñidas se capturaron usando el UMAX ImageScanner (Asmersham Biosciences). La densitometría de los geles de electroforesis y la

cuantificación de las bandas se realizó usando el software ImageQuant TL por medio de su herramienta de análisis de gel 1D (versión 7.0, GEHealthcare, Buckinghamshire, UK). Para tener en cuenta las ligeras variaciones en la carga de proteínas, la densidad de las bandas de proteínas se expresaron como intensidad relativa (volumen normalizado) y expresado en unidades arbitrarias

Las bandas de proteínas se cortaron manualmente y se enviaron para su identificación al laboratorio de proteómica de Inbiotec S.L. (León, España), donde las proteínas fueron digeridas siguiendo el método de Havlis y cols. (2003) y procesado para un análisis posterior según lo indicado por Jami y cols. (2010). Las muestras se analizaron con un espectrómetro de (MALDI-TOF / TOF) de ionización de desorción por desorción láser asistida por matriz 4800 (ABSciex, MA, EE. UU.). Se usó el analizador proteómico 4700 de calibración (Cal Mix 5, ABSciex) como calibración externa. Todos los espectros de MS se calibraron internamente utilizando péptidos de la digestión con tripsina. El análisis por espectrometría de masas MALDITOF / TOF produjo huellas de péptidos y los péptidos observados (hasta 65 péptidos por punto) se recogieron y se representaron como una lista de pesos moleculares monoisotópicos con una relación señal a ruido (S / N) mayor que 20 utilizando el software 4000 Series Explorer v3.5.3 (ABSciex). Todos los iones contaminantes conocidos (péptidos derivados de tripsina y queratina) se excluyeron para el posterior análisis MS / MS. Por lo tanto, a partir de cada espectro MS, los 10 precursores más intensos con S / N > 20 se seleccionaron para el análisis MS / MS con CID (gas atmosférico) en modo de reflector iónico de 2-kV y ventanas de masa precursora de ± 7 Da. La calibración predeterminada se optimizó para los espectros MS / MS.

Para la identificación de proteínas, los archivos genéricos Mascot que combinan espectros MS y MS / MS se crearon automáticamente y se usaron para consultar a una base de datos de proteínas no redundantes utilizando una licencia local de Mascot v 2.2 de Matrix Science a través de Global Protein Server v 3.6 (ABSciex). Los parámetros de búsqueda para las huellas de masas de péptidos y los espectros de MS en tándem obtenidos se establecieron de la siguiente manera: i) se utilizaron las bases de datos de secuencias NCBIprot (05-12-2017); ii) taxonomía: todas las entradas (139213787 secuencias; 51013024959 residuos); iii) se consideraron modificaciones fijas y variables

(Cys como derivado de S carbamidometilo y Met como metionina oxidada); iv) se permitió un sitio de escisión perdido; v) la tolerancia del precursor fue de 100 partes por millón y la tolerancia del fragmento MS / MS fue de 0,3 Da; vi) carga peptídica: 1+; y vii) el algoritmo se estableció para usar tripsina como enzima. Los candidatos a proteínas producidos por esta combinación de huellas peptídicas de masa / búsqueda de EM en tándem se consideraron válidas cuando la puntuación global Mascot fue superior a 90 con un nivel de significación de $P < 0,05$.

2.6. Análisis estadístico

Los efectos del sexo (masculino “M”/ femenino “F”) y el genotipo (NN/Nn) sobre las características de la canal, los parámetros de calidad de la carne, los marcadores bioquímicos en la sangre y las variables proteómicas musculares se analizaron mediante Análisis de Varianza (ANOVA) utilizando el procedimiento del Modelo Lineal General (GLM) de SPSS. El modelo incluyó el sexo, el genotipo y su interacción como factores fijos y el día de sacrificio (lote) como factor aleatorio. Cuando la interacción fue significativa, las diferencias entre los cuatro tratamientos (M-NN, M-Nn, F-NN, F-Nn) se analizaron mediante la prueba post-hoc de Tukey. La evolución post-mortem de la dureza de la carne (fuerza máxima de corte de Warner Bratzler) se analizó mediante GLM, incluyendo el sexo, el genotipo, el tiempo de maduración y sus interacciones como factores fijos y el animal como factor aleatorio.

Las correlaciones bivariadas se calcularon utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. Además, se realizó un análisis multivariante, el Análisis de Componentes Principales (PCA) para estudiar las relaciones entre la calidad de la carne y las variables fisiológicas, bioquímicas y proteómicas obtenidas de los animales estudiados, mediante el uso del software XLStat (XLStat 2013, Addinsoft Inc., París, Francia). La prueba de Kaiser-Meyer-Olkin se realizó para medir la adecuación del muestreo para cada variable en el modelo, y solo se seleccionaron variables con KMO por encima de 0,6. La medida general de KMO del PCA realizado fue 0,725.

3. Resultados y discusión

3.1. Canal y calidad de la carne

En este estudio, las hembras mostraron un pH muscular más bajo que los machos (Tabla 1), con diferencias significativas a los 45 min post-mortem ($P < 0,01$). Esto concuerda con D'Souza y Mullan (2002) y D'Eath y cols. (2010), quienes encontraron un pH más bajo ($P < 0,01$) en el músculo del lomo de las hembras en comparación con los machos castrados. Estas diferencias pueden deberse en parte a las diferencias fisiológicas y metabólicas en la respuesta celular, lo que indica en cierta medida una mayor susceptibilidad de las hembras al estrés en el sacrificio. Este es un tema controvertido, ya que se ha postulado que los cerdos machos son más susceptibles al estrés, porque muestran un comportamiento más agresivo que las hembras y que los castrados (Fàbrega y cols., 2010), mientras que en ganado bovino, Tarrant (1990) mostró que las hembras y los animales de menos edad son más susceptibles al estrés en comparación con los machos y los animales de más edad.

Al observar el efecto del genotipo, encontramos que el descenso post-mortem del pH muscular fue más rápido en animales heterocigotos para la mutación RYR1 (Nn), que mostraron un pH significativamente menor ($P < 0,001$) a los 45 min post-mortem, mientras que el pH final no difiere entre los genotipos (Tabla 1), por lo que la tasa de descenso del pH (45 min-24 h) fue menor en el grupo Nn (0,76 vs 1,03 para Nn y NN, respectivamente, $P < 0,05$). Además, los animales Nn produjeron carne con valores más altos de conductividad eléctrica (EC) ($P < 0,05$) y también mayor pérdida por goteo ($P < 0,001$). Por lo tanto, la tasa de descenso del pH se correlacionó negativamente con EC ($r = -0,702$, $P < 0,001$) y la pérdida por goteo ($r = -0,726$ para $P < 0,001$) mientras que la EC y la pérdida por goteo mostraron una correlación positiva ($r = 0,858$ para $P < 0,001$). Estas diferencias podrían indicar diferencias metabólicas musculares post-mortem debidas a la mutación RYR1, pero también podrían estar moduladas por una elevada susceptibilidad al estrés en el momento del sacrificio en los cerdos Nn, para los que previamente se ha descrito una reacción más intensa al estrés que la de los animales NN (Roberts y cols., 1998). Este efecto podría producir

una mayor y más rápida fuga de calcio al citoplasma y sus efectos (como son la contracción muscular y la estimulación del metabolismo muscular) resultarían en una reducción rápida del pH debido a la acidosis láctica y en un aumento de la conductividad eléctrica, tal y como apuntan trabajos previos (Depreux y cols., 2002; Fernández y cols., 2002; Shen y cols., 2007; Krischek y cols, 2011).

A consecuencia de estos cambios metabólicos relacionados con el calcio a menudo se produce un aumento de la pérdida por goteo y una mayor luminosidad de la carne (L^*), aunque los resultados encontrados en la literatura dependen de las particularidades de cada experimento (nivel de estrés y duración, evaluación de la situación por parte de los animales), de las características intrínsecas del músculo (reservas de glucógeno, estado antioxidante) y de la tasa de descenso del pH post-mortem y la desnaturalización de proteínas resultante. En este experimento, la L^* no mostró diferencias significativas entre grupos para los factores analizados, esto concuerda con estudios como (D'Souza y cols., 1998; Channon y cols., 2000; Hambrecht y cols., 2005) pero es contrario a los trabajos de (Terlouw y Rybarczyk, 2008; Boler y cols., 2010; Edwards; Engle, y cols., 2010; Edwards, Grandin, y cols., 2010; Dokmanovic y cols., 2015) lo cual refleja la complejidad de los procesos involucrados.

Sin embargo, en otro de los parámetros del color como es el caso del a^* se observó una reducción significativa con el genotipo Nn ($P < 0,01$), lo que podría ser el resultado de una mayor desnaturalización y/o proteólisis post-mortem en la carne de estos animales (Kazemi y cols., 2011).

Además también se apreciaron diferencias significativas para este parámetro entre sexos, siendo significativamente más alto en machos que en hembras, observándose el mismo efecto para la coordenada (b^*), lo que explica la interacción significativa observada entre sexo y genotipo para estas variables (a^* y b^*) (Tabla 1).

Otro indicador de calidad clave, como la dureza de la carne, fue modificado significativamente por el genotipo RYR1 ($P < 0,05$), mostrando los animales Nn una carne más dura (mayor fuerza de corte) a lo largo del proceso de maduración de la carne (1 a 5 días post-mortem, ver Figura 1), lo cual concuerda con estudios previos

que demostraron mayor fuerza de corte y carne menos tierna en Nn que en cerdos normales sin presencia de la mutación del gen halotano (NN) (Channon y cols, 2000; Fernández y cols., 2002; Van den Maagdenberg y cols., 2008). Además, nuestros resultados indican diferencias crecientes en la fuerza de corte a medida que avanzó el proceso de tenderización de la carne entre genotipos (Figura 11), aunque la interacción entre el genotipo RYR1 y el tiempo de maduración no fue significativa ($P > 0,05$).

Obviamente, la dureza de la carne tiende a disminuir con el tiempo de maduración en todos los tipos de carne, pero el mayor efecto de la mutación RYR1 en la dureza está probablemente relacionado con las diferencias en el metabolismo post-mortem. Todos los datos registrados en este trabajo (disminución más rápida del pH, mayor pérdida por goteo) indican un metabolismo post-mortem más rápido en el músculo de los cerdos Nn, confirmando lo observado en trabajos previos, como el de Cheah y cols. (1995), que encontraron *in vivo* concentraciones sarcoplásmicas de calcio más elevadas en el músculo de animales Nn en comparación con los NN, posiblemente causado por una velocidad mayor de lo normal en la glucólisis muscular post-mortem. De la misma manera, Depreux y cols. (2002) describieron una mayor proporción de fibras glucolíticas en el músculo de animales con genotipo Nn respecto a los NN, que se correlacionaba con una disminución del pH post-mortem más rápida. Esto podría implicar una mayor tasa de agotamiento de las enzimas implicadas en la tenderización de la carne y, por lo tanto, un proceso de tenderización más corto. Esto concuerda con investigaciones histológicas e histoquímicas previas que revelaron un mayor diámetro de fibra y un mayor potencial metabólico glucolítico en el músculo LT de cerdos con la mutación RYR1, debido a una mayor proporción de fibras glicolíticas de contracción rápida y menor del tipo oxidativo de contracción lenta (Fiedler y cols., 1999).

Tabla 1. Efecto del sexo (S) y del genotipo RYR1 (G) y su interacción (S * G) en los parámetros de calidad de la canal y de la carne.

Sexo	Macho		Hembra		SEM ¹	P-valor		
	NN	Nn	NN	Nn		S	G	S*G
Temperatura (°C)	37,37	37,38	37,10	39,47	1,386	0,7173	0,1332	0,2221

pH45	6,57	6,32	6,42	6,13	0,171	0,0021	<,0001	0,3318
pH24	5,50	5,50	5,44	5,43	0,070	0,2909	0,2558	0,6532
Rango pH (pH45-pH24)	1,075	0,820	0,987	0,703	0,094	0,2881	0,0102	0,8824
CE ² (mS)	4,11	6,12	5,94	7,20	2,099	0,1088	0,0144	0,3219
Pérdida por goteo (%)	4,48	5,48	4,92	7,21	1,679	0,1887	<,0001	0,9829
L*	50,54	49,16	49,47	50,92	2,044	0,5354	0,553	0,0758
a*	6,97 ^c	6,33 ^a	6,77 ^b	6,56 ^b	0,692	0,8748	0,0064	0,0403
b*	2,18 ^b	1,54 ^a	2,05 ^b	2,24 ^b	0,734	0,7904	0,109	0,015
WBSF ³ -1d	4,91	5,10	4,17	5,19	0,920	0,3216	0,0326	0,9375
WBSF ³ -3d	4,22	4,22	3,72	4,54	0,706	0,655	0,0029	0,8014
WBSF ³ -5d	3,80	4,01	3,60	4,70	0,598	0,5445	0,0005	0,5598

Medias en la misma fila seguidas por diferentes superíndices son significativamente diferentes para P <0,05.

¹SEM: error estándar de las medias

²CE: Conductividad eléctrica

³WBSF: Fuerza de corte de Warner-Braztler a 1, 3 o 5 días *post-mortem*

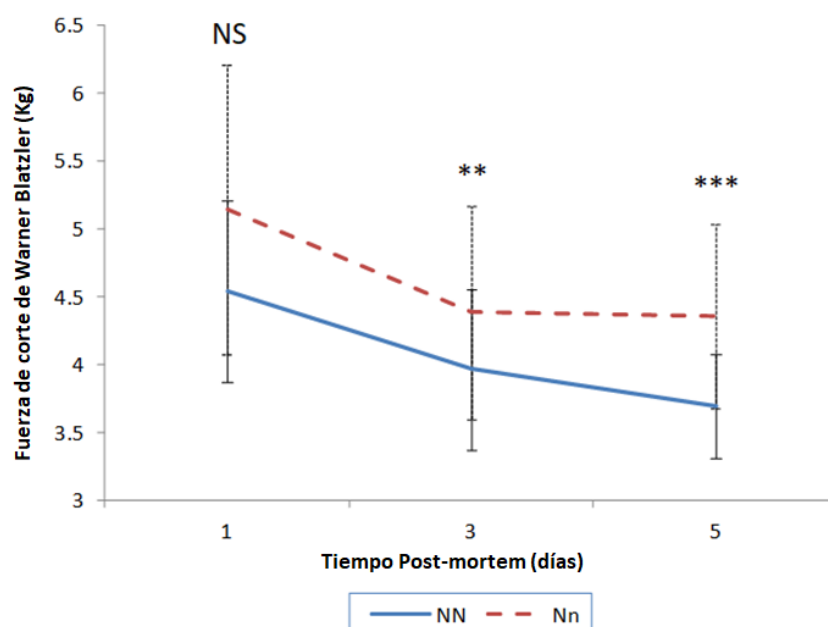


Figura 11. Efecto de la mutación RYR1 (NN: portador de la mutación del gen Nn: libre de mutación en el gen RYR1) en la evolución post-mortem de la dureza de la carne, medida como la fuerza máxima de corte de Warner Bratzler (media \pm S.E.). Significaciones: **: P <0,01. ***: P <0,001, NS: no significativa P > 0,05.

3.2. Variables bioquímicas en la sangre

El sexo influyó en la concentración de varios metabolitos de la sangre en el momento del sacrificio (Tabla 2). Las hembras mostraron niveles más altos de glucosa

(P <0,05), urea (P <0,001), PCR (P <0,05), Pig-MAP (P <0,01) y GPx (P <0,01) que los machos e inferiores de lactato (P <0,05).

Tabla 2. Efecto del sexo (S) y el genotipo RYR1 (G) y su interacción (S * G) en las variables bioquímicas séricas en el momento del sacrificio.

Sex0	Macho		Hembra		SEM ¹	P-valor		
	NN	Nn	NN	Nn		S	G	S*G
Glucosa, mg/dL	286,25	330,51	366,91	349,62	14,676	0,019	0,523	0,138
Lactato, mmol/L	10,61	10,37	8,53	9,35	0,432	0,013	0,622	0,377
Creatinina, mg/dL	1,88	2,03	2,00	2,06	0,034	0,123	0,035	0,329
Urea, mg/dL	27,08	25,31	37,90	32,69	1,473	<0,001	0,097	0,409
Proteínas totales, g/dL	6,84	6,66	6,85	6,82	0,066	0,396	0,258	0,434
Triglicéridos, mg/dL	47,92	51,75	49,64	55,25	2,283	0,401	0,155	0,806
Colesterol, mg/dL	90,33	87,43	92,15	95,64	1,811	0,053	0,919	0,219
HDL-col ² , mmol/L	1,14	1,14	1,16	1,21	0,017	0,072	0,238	0,238
LDL-col ³ , mmol/L	1,35	1,26	1,32	1,33	0,031	0,602	0,304	0,288
NEFAs ⁴ , mmol/L	0,080	0,082	0,085	0,067	0,008	0,657	0,426	0,342
BHB ⁵ , mmol/L	0,072	0,085	0,081	0,077	0,005	0,933	0,511	0,279
Haptoglobina, mg/mL	0,174	0,408	0,523	0,474	0,085	0,091	0,437	0,245
PCR ⁶ , µg/mL	4,35	10,05	10,56	12,35	1,246	0,018	0,039	0,261
Pig-MAP, mg/mL	0,62	0,58	0,96	0,72	0,049	0,001	0,050	0,163
CK ⁷ , U/L	1844,58	3024,42	1920,36	4368,08	277,388	0,065	<0,001	0,125
GPx ⁸ , U/L	8321,42 ^a	8855,58 ^a	14481,55 ^b	8670,33 ^a	683,073	0,003	0,009	0,002
Cortisol, ng/mL	39,03	38,95	30,92	43,37	2,869	0,670	0,139	0,134

Medias en la misma fila seguidos por diferentes superíndices son significativamente diferentes para P <0,05 ¹SEM: error estándar de las medias

² HDL-col: Lipoproteínas de alta densidad-colesterol

³ LDL-col: lipoproteínas de baja densidad-colesterol

⁴ NEFAs: ácidos grasos no estearificados

⁵ BHB: β-hidroxiacetato

⁶ PCR: proteína C reactiva

⁷ CK: creatina quinasa

⁸ GPx: glutatión peroxidasa

La presencia de niveles más elevados de glucosa en sangre podría indicar un efecto más acusado del estrés durante el sacrificio en las hembras. Se sabe que situaciones de estrés psicológico generan una sensación de amenaza en el organismo que se prepara para protegerse, por lo que aumentan los niveles de glucosa en el plasma debido a la secreción de las hormonas que conducen a un aumento en la degradación del glucógeno hepático y la gluconeogénesis (Becerril-Herrera y cols., 2007; Mota-Rojas y cols., 2009). Diversos estudios describen el aumento de los niveles de glucosa séricos o plasmáticos como consecuencia del estrés en diferentes especies animales (Becerril-Herrera y cols., 2007) pero el efecto del sexo en el perfil energético

no está tan claro, ya que puede verse afectado por las diferencias hormonales. Nuestros resultados concuerdan con el trabajo de Mota-Roja y cols. (2012), lo cuales encontraron una mayor concentración de glucosa en la sangre de las hembras sometidas a estrés agudo, en comparación con cerdos castrados y con machos normales.

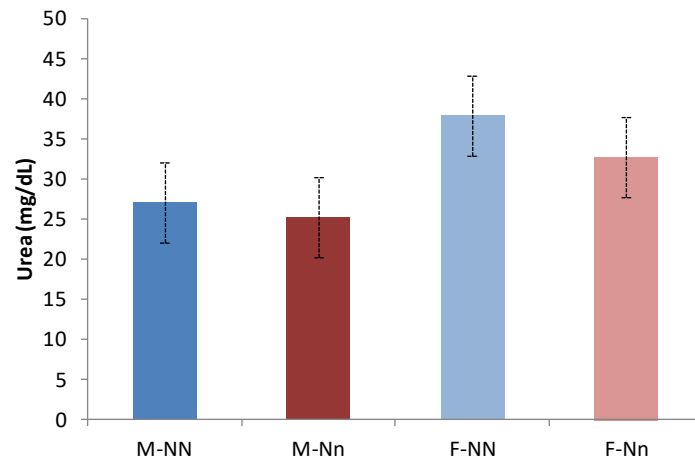
Nuestros resultados también concuerdan con estudios previos en cerdos en los que se describen niveles crecientes de APPs como PCR y Pig-MAP en plasma como consecuencia del estrés en las hembras (Saco y cols., 2003; Murata, 2007; Piñeiro y cols., 2007; Salamano y cols., 2008).

En cuanto a la concentración sérica de urea es importante destacar que fue mayor en las hembras de ambos grupos NN y Nn (Figura 2a), lo que sugiere un catabolismo de proteínas más rápido, asociado, probablemente a una mayor susceptibilidad de las hembras al estrés previo al sacrificio.

El Genotipo RYR1 también mostró un efecto significativo sobre algunas de las variables bioquímicas medidas en sangre tales como la creatinina ($P < 0,05$), PCR ($P < 0,05$), Pig-MAP ($P = 0,05$), CK ($P < 0,001$) y GPx ($P < 0,01$) (Tabla 2). Los cerdos heterocigotos (Nn), mostraron una mayor actividad de CK en suero, lo que sugiere un aumento en el daño muscular, que posteriormente puede derivar en una situación inflamatoria y una mayor concentración de PCR. Algunas APP han sido propuestas como posibles indicadores de estrés animal (Saco y cols., 2003; Piñeiro y cols., 2007; Salamano y cols., 2008; Marco-Ramell y cols., 2011; Marco-Ramell y cols., 2016a), sin embargo, existe cierta controversia sobre el efecto del estrés sobre sus concentraciones séricas, ya que es difícil distinguirlo del posible efecto de traumatismos o infecciones subclínicas.

Por otro lado, la mayor actividad de GPx en cerdos homocigotos (NN), y especialmente en las hembras (ya que se observó una interacción significativa Sexo*Genotipo, $P < 0,01$) sugiere que los sistemas de defensa antioxidante son más activos en las hembras, probablemente debido a la influencia de los estrógenos (Borrás y cols., 2010) (Figura 12b).

a)



b)

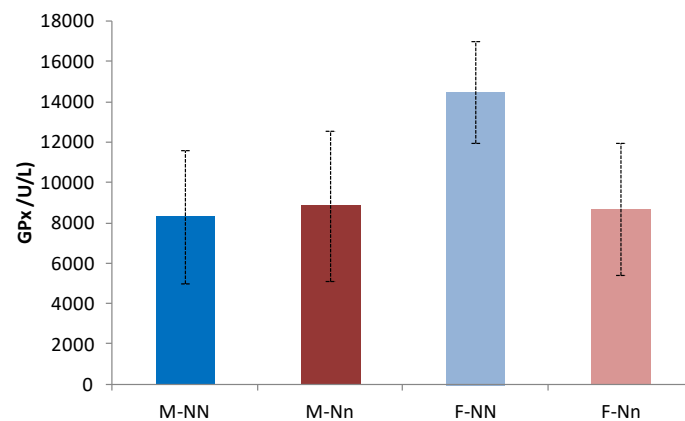


Figura 12. Niveles séricos de urea. **a)** y GPx. **b)** (medias \pm S.E.M) en los cuatro tratamientos estudiados (M: macho, F: hembra, NN: no portador de la mutación, Nn: portador de la mutación del gen RYR1).

3.3. Proteínas musculares

Se diferenciaron un total de 26 bandas peptídicas (201 a 20 kDa) en los geles SDS-PAGE obtenidos de los extractos sarcoplásmicos musculares, tal y como se muestra en la figura 13, donde cada banda ha sido identificada con S de proteína "sarcoplásmica", seguida de un número correlativo (1 a 26).

La Tabla 3 muestra la identificación que se ha realizado de las bandas proteicas analizadas que mostraron una expresión diferencial entre tratamientos y la Tabla 4 muestra el efecto del sexo y el genotipo y su interacción en la intensidad de estas bandas proteicas.

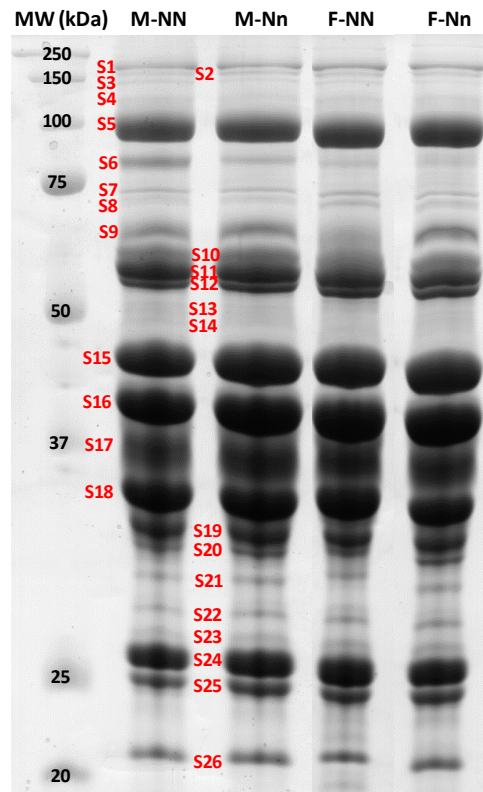


Figura 13. Perfil electroforético del extracto sarcoplásmico de muestras del músculo LT de cada tratamiento analizado (M-NN, M-Nn, F-NN, F-Nn) en gel SDS-PAGE. Cada una de las bandas ha sido identificada con la letra S (proteína sarcoplásmica) seguido de un número correlativo.

3.4. Efecto del sexo

Los resultados obtenidos muestran una mayor intensidad en el músculo de las hembras de la banda S2 ($P < 0,05$) que pertenece a la proteína C de unión a la miosina, tipo rápido "MyBP-C", en la que pertenece a la familia de proteínas C de unión a miosina, que incluye las isoformas rápida y lenta, cada una de ellas es una proteína asociada a la miosina que se encuentra en los puentes cruzados (región C) de las bandas A sarcoméricas, donde se produce la interacción entre los filamentos finos y

gruesos. MyBP-C, puede modular la contracción muscular, por lo que se le han propuesto funciones estructurales y reguladoras (Oakley y cols., 2004).

La banda S6 (fosfofructoquinasa 6 muscular "PFKM") también se vio significativamente afectada por el sexo, con menor presencia en el músculo de las hembras. PFKM es una enzima primordial para el control de la tasa de glucólisis, cataliza la transferencia de un grupo fosfato del ATP a fructosa-6-fosfato para producir ADP y fructosa-1,6-bisfosfato. Este enzima está estrictamente regulado y responde a diversas moléculas y señales cambiando su actividad catalítica y su comportamiento y es uno de los pocos ejemplos en los que se observa la inhibición del enzima por el sustrato, ya que el ATP puede inhibir PFKM en diferentes niveles, dependiendo el estado metabólico tisular (Sola-Penna y cols., 2010). Además, se sabe que el lactato potencia los efectos inhibidores del ATP sobre PFKM (Leite y cols., 2007). Por tanto, en nuestro estudio la baja expresión de PFKM en el músculo de las hembras, que a su vez mostró una acidificación post-mortem más rápida, podría deberse al efecto potenciador de la inhibición por lactato, aunque no podemos descartar que haya una inherente menor concentración de PFKM en el músculo de las hembras debido a las diferencias fisiológicas entre machos y hembras.

3.5. Efecto del genotipo

El efecto del genotipo fue significativo para cuatro bandas peptídicas, así las bandas S2 (MyBP-C, $P < 0,05$), S18 (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa "GAPDH", $P < 0,01$) y S24 (que contiene dos proteínas: anhidrasa carbónica "ACIII" y fosfoglicerato mutasa-2 "PGM2", $P < 0,05$) mostraron menor intensidad y la banda S23 (ENO3) mayor intensidad en el músculo de los cerdos Nn (Tabla 4).

Las diferencias en MyBP-C, afectan a la estructura de la fibra muscular, podrían deberse a las diferencias previamente mencionadas en composición de las fibras entre los genotipos RYR1, mientras que los otros cambios significativos se refieren a enzimas metabólicos (GAPDH, ACIII y/o PGM2, ENO3) que mostraron una correlación significativa con la tasa de disminución del pH del músculo post-mortem (es decir, con

la amplitud del pH), siendo esta relación positiva para GAPDH ($r = 0,540$, $p < 0,01$) y ACIII/PGM2 ($r = 0,410$, $P < 0,05$) y negativa para ENO3 ($r = -0,541$, $P < 0,006$). Esto concuerda con los resultados de Gagaoua y cols. (2015) que encontraron una relación negativa entre ENO3 y la disminución del pH en la carne.

La menor intensidad en la banda de GAPDH en el músculo de los cerdos Nn indica una menor glucólisis, lo que podría ser debido a un agotamiento más rápido de los metabolitos musculares (glucógeno) debido al estrés, como encontraron Fernández y cols. (2002). Hay que mencionar que GAPDH ha sido implicado recientemente en diferentes procesos no metabólicos, que incluyen la activación de la transcripción y el inicio de la apoptosis (Tarze y cols., 2007). Además, GAPDH puede actuar como un interruptor metabólico reversible bajo estrés oxidativo (Agarwal y cols., 2012).

Respecto a ENO3, se trata de una enzima glucolítica que se ha asociado en la carne con un metabolismo energético muscular post-mortem más rápido, lo que resulta en una disminución más rápida del pH (Gagaoua y cols., 2015) y también se ha correlacionado con la estabilidad del color de la carne (Gagaoua y cols., 2015; Gagaoua y cols., 2017; Picard y cols., 2017) y con su tenderización (Lametsch y cols., 2003; Polati y cols., 2012). Además, ENO3 se ha descrito como una proteína de estrés hipóxico que proporciona protección a las células al aumentar el metabolismo anaeróbico (Pancholi, 2001; Wulff y cols., 2012). Por lo tanto, se podría esperar encontrar la banda de ENO3 aumentada en el músculo de los cerdos que sufren un mayor estrés al sacrificio, es decir, los del genotipo Nn.

La interpretación de los cambios encontrados en la banda de proteína S24 es más difícil, debido a la migración conjunta de dos proteínas (ACIII y PGM2) en una misma banda y la cuantificación conjunta resultante, que es una de las dificultades de usar electroforesis 1D para la separación de proteínas. La banda S24 mostró menor intensidad ($P < 0,05$) en los extractos musculares de los animales Nn, y esta diferencia fue consistente independientemente del sexo (machos y hembras), pero no se ha podido dilucidar si ambas proteínas (ACIII y PGM2) o solo una de ellas tenía menor presencia en el tejido de los cerdos Nn. De todos modos, podría esperarse una menor ACIII (que "secuestra oxirradicales" y por lo tanto protege las células del daño

oxidativo) en el músculo de los cerdos Nn y que por tanto reflejaría un nivel más bajo de defensa antioxidante. Esto concuerda con los estudios de Laville y cols. (2009) que describieron una reducción de la abundancia de proteínas antioxidantes en el músculo SM de cerdos con mutación RYR1 (genotipo nn) en comparación con cerdos NN, probablemente porque el músculo de animales nn era menos oxidativo y, en consecuencia, presentaba una capacidad antioxidante y reparadora menor.

Existe un interés creciente entre los científicos de la carne por estudiar el equilibrio entre el estrés oxidativo y la defensa antioxidante en el músculo post-mortem, lo cual está proporcionando correlaciones significativas con rasgos de calidad de la carne como el color de la carne y la terneza (Laville y cols., 2007, 2009; Jia y cols., 2009; Ouali y cols., 2013; Gagaoua y cols., 2015, 2017; te Pas y cols., 2017).

La segunda proteína encontrada en la banda S24 fue PGM2, que cataliza la interconversión de 2-fosfoglicerato y 3-fosfoglicerato en la vía glucolítica y, por lo tanto, tiene un papel de regulación del balance energético y en el metabolismo del glucógeno y la glucólisis del músculo esquelético (Fontanesi y cols., 2008). Esta proteína está codificada por un gen localizado en el cromosoma 18 porcino (Fontanesi y cols., 2003) en una región donde se encuentran los loci relacionados con parámetros de calidad de la carne como las pérdidas por goteo, el color, el engrasamiento y el diámetro de la fibra muscular, por lo que una menor abundancia de PGM2 en el músculo de los cerdos Nn podría estar relacionada con la mayor pérdida de jugo por goteo, tal y como se ha observado.

En general, el déficit de GAPDH, PGM2 y/o ACIII y la mayor cantidad de ENO3 en el músculo de los cerdos Nn después del sacrificio reflejan una alteración de la función de la glucólisis y una mayor defensa de la célula muscular frente al estrés oxidativo, lo cual podría estar relacionado con cambios metabólicos debido a la mutación RYR1, que causa una desregulación de la homeostasis del calcio y conduce a trastornos neuromusculares (Treves y cols., 2005) e incluso puede afectar a la respuesta inmunológica y neuroendocrina de los cerdos al estrés (Ciepielewski y cols., 2016). En nuestro estudio no pudimos cuantificar los cambios en la abundancia de proteínas musculares involucradas en la homeostasis del calcio, como sarcalumenina o

calsecuestina-1, que no se obtuvieron ni identificaron en la separación realizada en los geles 1D SDS-PAGE. Estas proteínas fueron detectadas recientemente mediante electroforesis 2D en músculo de ratón por Picard y cols. (2016) que encontraron que su abundancia en el músculo tibial anterior (glucólisis rápida) aumentaba en ausencia de Hsp27 (proteína de choque térmico), proteína que se ha descrito como biomarcador de tenderización de la carne de vacuno, por el grupo de Picard.

Tabla 3. Identificación de las bandas de proteínas que mostraron diferencias significativas entre tratamientos

Banda [MWe ¹]	Identificación	Nº de Acceso ²	Puntuación MOWSE ³	Cobertura de sec. (%)	Consultas coincidentes	MWt ⁴
S2 (175,6 kDa)	Proteína C de union a la miosina, tipo rápido [Sus scrofa]: FastMyBP-C	gi 335290041	111	14	13	128,4
S6 (86,8 kDa)	Fosfofructoquinasa 6 muscular [Sus scrofa]: PFK-M	gi 95117652	524	35	22	82,4
S9 (61,7 kDa)	Albúmina [Sus scrofa]	gi 833798	808	38	20	71,4
S18 (32,5 kDa)	Gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa (fosforilado): (EC 1.2.1.12)- pig: GAPDH	gi 65987	767	55	14	35,9
S23 (26,3 kDa)	β -enolasa [Bos taurus]: ENO3	gi 77736349	282	32	9	47,4
S24 (25,3 kDa)	Anhidrasa carbónica 3 [Sus scrofa]: ACIII	gi 56711366	858	76	21	29,7
S24 (25,3 kDa)	Fosfoglicerato muatasa-2 [Sus scrofa]: PGM2	gi 201066358	400	56	13	28,8
S26 (20,5 kDa)	Adenilato quinasa isoenzime 1 [Sus scrofa]: AK1	gi 350579686	539	65	15	21,7

¹MWe es el peso molecular experimental (kDa)

²Nº de acceso corresponde a la base de datos del NCBI nr

³La puntuación MOWSE es un descriptor numérico de la probabilidad de que la identificación sea correcta. Puntuaciones mayores de 69 son significativos ($P < 0.05$)

⁴MWt es el peso molecular teórico (kDa)

3.6. Interacción sexo y genotipo

El análisis estadístico mostró que hubo una interacción significativa entre sexo y genotipo para dos proteínas musculares: S9 (albúmina) y S26 (AK1). Es decir, en este estudio, los machos mostraron una expresión de albúmina muscular más alta que las hembras, lo que podría reflejar diferencias fisiológicas relacionadas con la función de la albúmina en el músculo esquelético, donde sirve para almacenamiento temporal de aminoácidos, manteniendo la presión osmótica y actuando como un transportador de ácidos grasos libres (Ellmerer y cols., 2000). En cuanto al efecto genético, la presencia de la mutación RYR1 aumentó la expresión de albúmina en el músculo de las hembras y la disminuyó en los machos.

En lo que respecta a la proteína AK1, que cataliza la transferencia reversible del grupo fosfato terminal entre ATP y AMP y es un enzima clave en la homeostasis energética muscular, mostró un nivel ligeramente más alto en los genotipos Nn, que fue más evidente en los machos que en las hembras, mostrando además interacción significativa entre sexo y genotipo.

Nuestros resultados mostraron niveles más bajos de AK1 en hembras Nn, lo que podría relacionarse con alteraciones de la homeostasis muscular como resultado de una mayor respuesta al estrés en el sacrificio.

Tabla 4. Efecto del sexo (S), del genotipo RYR1 (G) y su interacción (S * G) sobre la expresión de proteínas que mostraron cambios en los extractos musculares sarcoplásmicos (densidad óptica, en unidades arbitrarias).

Sexo	Macho		Hembra		P-valor			
Genotipo	NN	Nn	NN	Nn	SEM ¹	S	G	S*G
Fast MyBP-C	0,217	0,168	0,370	0,223	0,034	0,048	0,044	0,272
PFK-M	1,328	1,498	0,854	0,790	0,144	0,006	0,911	0,466
Albúmina	2,688 ^b	2,329 ^b	1,881 ^a	2,441 ^b	0,119	0,081	0,385	0,006
GAPDH	14,065	13,109	14,398	12,235	0,367	0,710	0,009	0,313
ENO3	0,379	1,049	0,667	0,934	0,124	0,704	0,017	0,211
ACIII/PGM2	7,967	7,140	7,907	7,111	0,204	0,963	0,012	0,870

AK1	2,085 ^a	1,985 ^a	1,979 ^a	2,160 ^b	0,046	0,658	0,591	0,046
-----	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	-------	-------	-------	-------

Medias en la misma fila seguidas de diferentes superíndices son significativamente diferentes para $P < 0,05$.

¹SEM: error standar de la media

3.7. Análisis multivariante

Para obtener una visión global de las relaciones existentes entre las variables analizadas se realizó un análisis multivariante mediante Análisis de Componentes Principales (PCA). Para ello, se seleccionaron las variables más adecuadas para el análisis factorial ($KMO > 0,6$), que fueron: tres características de calidad de la carne (pH_{45} , CE y pérdidas por goteo), cuatro metabolitos séricos (glucosa, creatinina, CK y GPx) y tres bandas proteicas que contienen proteínas musculares del metabolismo energético y la defensa antioxidante (GAPDH, ENO3 y ACIII / PGM2). El biplot obtenido al representar el gráfico de cargas de las variables escogidas y los centroides de cada grupo de estudio analizado (Figura 4) mostró que entre los dos componentes principales (PC1 y PC2) se explicaba el 62% de la varianza en los datos.

El primer componente principal (PC1) explicaba el 50,6% y agrupaba en el lado positivo las variables relacionadas con baja calidad de la carne: pérdida por goteo, CE y dureza (fuerza de corte WB a los 5 días de maduración (WBSF-5d). Otras variables con alto peso para PC1 fueron creatinina sérica y CK, que indican un mayor daño muscular en el momento del sacrificio, y ENO3, una proteína muscular que se ha relacionado con un metabolismo energético más rápido y una disminución post-mortem más rápida del pH en la carne (Gagaoua y cols., 2015) y también con el estrés hipóxico (Sedoris y cols., 2010).

Además, la temperatura de la canal mostró una correlación positiva con PC1, lo cual en conjunto indica claramente que el lado positivo de PC1 englobaba las variables relacionadas con el estrés en el sacrificio. Estas características correspondieron a animales del genotipo Nn, principalmente hembras, cuya puntuación media mostró una alta correlación positiva con el primer componente (PC1) (Figura 14). Por el contrario, en el lado negativo del primer componente quedaban agrupadas variables relacionadas con carne de animales de genotipo “normal”, indicando una disminución

normal del pH post-mortem (pH más alto a los 45 min), metabolismo glucolítico muscular normal (mayor GAPDH muscular y PGM2 en el sacrificio) y mayor defensa antioxidante muscular (ACIII), es decir, aquellas variables que en general contribuyen a un proceso adecuado de conversión de músculo en carne, estando el genotipo NN (tanto machos "M-NN" como hembras "F-NN") cuyos centroides aparecen en el lado negativo del PC1 correlacionados positivamente con dichas variables.

El segundo componente separaba en el lado positivo los niveles de glucosa y GPx en la sangre en el momento del sacrificio, es decir, variables que indican estrés, inflamación y mayor respuesta antioxidante, lo que correspondió principalmente a muestras de carne de las hembras del genotipo NN.

En general, estos resultados demuestran que la mutación RYR1 en heterocigosis (Nn) contribuyó a reducir la calidad final de la carne (mayor exudación y dureza de la carne) y que su efecto se moduló en cierta medida por una mayor respuesta al estrés de estos individuos Nn en el sacrificio (nivel sérico más alto de creatinina y creatina quinasa, en comparación con cerdos NN). Por otro lado, las hembras mostraron una disminución del pH post-mortem más rápida y produjeron carne más exudativa que los machos, y también mostraron parámetros bioquímicos sanguíneos en el momento del sacrificio que parecen reflejar una mayor respuesta fisiológica al estrés (mayor glucosa y GPx).

Además, desde una perspectiva proteómica, estos resultados permitieron la identificación de proteínas clave implicadas en la vía glucolítica post-mortem (GAPDH, PGM2, ENO3) y la defensa antioxidante (ACIII) del músculo, que contribuyen al proceso de adquisición de la calidad de la carne que estará influenciado por el estrés previo al sacrificio. Estas proteínas tienen un papel relevante en el metabolismo muscular post-mortem y la mayoría de ellas ya han sido identificadas como biomarcadores de calidad de la carne y el estrés animal en diversos trabajos (Laville y cols., 2007 y 2009; Guillemin y cols., 2011; Gagaoua y cols., 2015 y 2017).

Estos resultados contribuyen a la identificación integral de las proteínas relacionadas con el proceso de adquisición de calidad de la carne, siendo finalmente moduladas por la reacción del animal al estrés en el sacrificio. Conocer el mecanismo

biológico que subyace a este proceso abre la posibilidad de monitorizar y predecir los cambios resultantes. Una vez identificados, estos biomarcadores proteicos potenciales se debe realizar un proceso de evaluación y validación (Naylor, 2003; te Pas y cols., 2011; Picard y Gagaoua, 2017), proceso para el cual se hace necesaria una población mayor de datos y que se abordará en el siguiente proyecto.

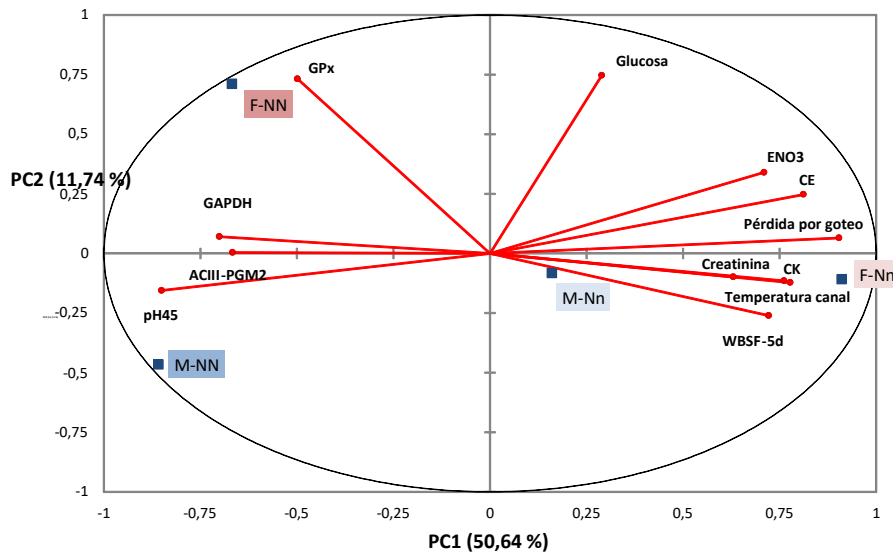


Figura 14. Diagrama de dispersión biespacial PCA de parámetros de calidad de la carne y biomarcadores del estrés. En cuadros se muestran las puntuaciones medias de los tratamientos (M-NN, M-Nn, F-NN, F-Nn). Variables: CE: conductividad eléctrica; WBSF-5d: fuerza de corte Warner Bratzler a los 5 días post-mortem; CK: creatina quinasa; GPx: glutatión peroxidasa; ACIII: anhidrasa carbónica; PGM2: fosfoglicerato mutasa-2; GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; ENO3: β-enolasa. Tratamientos: M-NN (macho sin gen halotano), M-Nn (portador de la mutación del gen masculino), F-NN (hembra sin gen halotano) y F-Nn (portador de la mutación del gen femenino).

**CAPÍTULO 4: EFECTO DEL SESGO COGNITIVO
(ESTADO EMOCIONAL) SOBRE EL ESTRÉS
PSICOLÓGICO DEL ANIMAL EN EL MOMENTO DEL
SACRIFICIO Y SUS CONSECUENCIAS SOBRE EL
METABOLISMO POST-MORTEM MUSCULAR EN
GANADO PORCINO**

1. Introducción

En Europa, los consumidores se preocupan cada vez más por el bienestar animal (European Union, 2007) que supone un trato adecuado de los animales a lo largo de las distintas fases de la cadena productiva desde la cría hasta el sacrificio. Es bien conocido que tanto las condiciones ambientales (temperatura) como las situaciones desconocidas tales como el destete, el transporte por carretera, la estancia en el matadero...etc generan estrés psicológico en los animales lo que puede inducir la liberación de neurotransmisores (NTs) en concreto de catecolaminas y sus metabolitos a nivel cerebral.

El grado de estrés alcanzado, así como la liberación de estos NTs podrían estar regulados en función del estado emocional o sesgo cognitivo (CB del inglés “cognitive bias”) de cada animal (Berridge y Waterhouse, 2003; Logue y Gould, 2013). Se está trabajando mucho en el desarrollo de test no invasivos que permitan la caracterización de los animales en función de su sesgo cognitivo (Carreras y cols., 2015). Dichos test analizan la influencia del estado emocional de los animales sobre sus procesos cognitivos y sobre el procesado que hacen de la información recibida que incluye cosas como la atención, el aprendizaje, la memoria y la toma de decisiones por parte de los animales.

Nuestra hipótesis de partida para este estudio es que la caracterización del sesgo cognitivo del animal podría ir unida a la susceptibilidad al estrés de un animal en el momento del sacrificio lo que podría tener efectos muy importantes sobre el estado redox y por tanto en el metabolismo muscular y en la calidad final de la carne.

El estrés psicológico a menudo se relaciona con niveles elevados de especies reactivas de oxígeno (EROs) lo que combinado con un desequilibrio en los sistemas de defensa antioxidante pueden causar acumulación de daño oxidativo en las células (Jorgensen, 2013; Nakhaee y cols., 2013). A raíz del sacrificio y la exsanguinación de los animales las células y los tejidos son expuestos a una situación de carencia de nutrientes y oxígeno lo que conduce a una situación de acumulación masiva de EROS, detención en la producción de ATP causando una acidificación progresiva del

citoplasma y una desregulación de la homeostasis del calcio (Rubio-Gonzalez y cols., 2015). Esta producción masiva de EROs es un elemento crucial del proceso de conversión del músculo en carne ya que para contrarrestar el estrés oxidativo derivado de dicha situación las células musculares dispararán mecanismos de defensa (Lana y Zolla, 2015). Nuestro grupo ha demostrado con anterioridad que una de las respuestas del tejido muscular al estrés oxidativo es la ocurrencia de cambios en los procesos autofágicos (Garcia-Macia y cols., 2014; Lana y Zolla, 2015).

La autofagia es un mecanismo de supervivencia celular por el que las células eucarióticas “auto-digieren” parte de sus componentes citoplasmáticos para degradar proteínas u orgánulos en respuesta al ayuno y otras situaciones estresantes (Coto-Montes y cols., 2012). Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación han mostrado que determinadas prácticas de manejo como la mezcla de animales desconocidos en la granja o previa al sacrificio producen un incremento de los niveles de estrés oxidativo en el tejido muscular y de los procesos autofágicos en las primeras horas tras el sacrificio (Rubio-Gonzalez y cols., 2015).

El objetivo de este experimento es estudiar el efecto del sesgo cognitivo positivo (PB del inglés “positive Bias”) o negativo (NB del inglés “negative Bias”) en la susceptibilidad del animal al estrés durante el sacrificio y sus efectos en el metabolismo post-mortem en concreto sobre el estado oxidativo del músculo y los procesos autofágicos.

Este experimento forma parte de un proyecto de investigación más amplio encaminado a la mejora del bienestar animal que incluye la búsqueda de nuevos métodos para medir el estado emocional de los animales (Carreras y cols., 2015) y la identificación de nuevos biomarcadores fisiológicos de susceptibilidad al miedo y al estrés (Arroyo y cols., 2016).

2. Material y métodos

2.1. Animales y manejo

Se criaron (desde el destete hasta el sacrificio) un total de 36 cerdos macho (cruces de hembras Large White × Landrace sin el gen RYR1 (NN) con machos heterocigotos Pietrain (Nn)) en la granja experimental del IRTA. Los animales se estabularon en corrales (5 x 2.7m) con luz natural y temperatura ambiente constante de $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Cada corral estaba provisto de un bebedero de acero con tetina (15 × 16 cm) y un comedero de hormigón (58 × 34 cm) con cuatro huecos, los animales disponían de agua y alimento *ad libitum*. Los cerdos, que fueron inspeccionados diariamente, no mostraron ningún problema de salud durante el período experimental.

Un mes antes del sacrificio, los cerdos fueron sometidos a un test de “sesgo cognitivo” que permitió la clasificación de los animales en tres categorías: “PB”, “NB”, y “neutros” o inclasificables que eran aquellos animales que no se correspondían claramente con ninguna de las dos categorías anteriores (Carreras y cols., 2015). Para realizar este test, los cerdos fueron entrenados individualmente durante 16 sesiones en las que se les enseñaba a discriminar entre un cubo con o sin trozos de manzanas en función de su posición (izquierda o derecha) en un cubículo de 34 m². Posteriormente, cada animal se sometió individualmente a una sesión en la que el cubo fue colocado en el centro del cubículo (señal ambigua). Para clasificar a los animales por su sesgo cognitivo, el tiempo de contacto con el cubo en la sesión de prueba se comparó con el tiempo medio de las últimas cuatro sesiones de entrenamiento. Si el tiempo utilizado en la sesión de prueba estaba comprendido entre la media \pm SEM de las últimas dos sesiones con acceso a las manzanas, entonces el animal era clasificado como “PB” para el sesgo cognitivo. Si el tiempo tomado en la sesión de prueba estaba comprendido entre la media \pm SEM de las últimas dos sesiones sin acceso a alimento, el animal se clasificó como "NB". Como resultado de esta prueba, 19 animales se clasificaron como PB, 6 como NB y 11 como neutros, estando estos animales homogéneamente distribuidos entre los grupos (estabulación).

Cuando los animales alcanzaron un peso vivo de entre 100 y 110 kg de peso vivo fueron transportados al matadero experimental del IRTA (1,2 km de distancia), donde se les aplicó un manejo muy cuidadoso para para no incrementar el estrés de

los animales, que fueron sacrificados tras un tiempo de estabulación de entre 30 min a 1 h. Con el fin de evitar cualquier diferencia de manejo que pudiera influir sobre la susceptibilidad animal al estrés, se seleccionaron para la siguiente parte del estudio 18 animales procedentes de un mismo lote de sacrificio, de ellos nueve animales fueron clasificados como PB, tres como NB y seis como “neutros”. Por tanto, para realizar los análisis de NTs en cerebro y de biomarcadores de metabolismo post-mortem en el músculo se utilizaron 12 animales (9PB:3NB), esta proporción (3:1) coincide con la proporción real existente en la población original respecto al sesgo cognitivo, una vez descartados los animales “neutros”.

2.2. Recogida de muestras

Inmediatamente después del sacrificio (como máximo 5 min), se abrió el cráneo de los animales y se extrajo el cerebro entero, de él se diseccionaron, tan rápido como fue posible, las áreas de interés: la amígdala, el hipocampo y la corteza frontal, y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, siendo almacenadas posteriormente a -80°C hasta su análisis.

Por otro lado, se tomaron muestras de músculo, en concreto del LT a las 0 h, 4 h, 8 h y 24 h post-mórtem que también fueron ultra-congeladas en nitrógeno líquido y mantenidas posteriormente a -80°C hasta su análisis.

2.3. Análisis de neurotransmisores cerebrales

La preparación del extracto cerebral para la determinación de NTs consiste en la precipitación de proteínas en medio ácido, para ello, las muestras de tejido cerebral fueron homogeneizadas 1:10 en 0,25 M ácido perclórico con 0,1 M Na₂S₂O₅ y 0,25 M EDTA con DHBA y oxalato de N ω -metil-5-hidroxitriptamina (N ω) como estándares internos para las catecolaminas y las indolaminas respectivamente. Se sonicaron al 30 % de intensidad durante 10 s intermitentes manteniendo las muestras en hielo

(Branson Digital Sonifier, modelo 250, Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT, USA). Finalmente se alicuotaron y se mantuvieron a -80°C hasta su análisis.

La preparación del extracto cerebral para la determinación de NT en las muestras en las que se determinaron tanto los niveles de NT como proteínas se realizó el siguiente protocolo.

- Extracto de proteínas: Las muestras de tejido cerebral fueron pesadas y homogenizadas a 0,3 g de tejido/mL en el tampón de lisis consistente en 0,15 M NaCl, 0,05 M Tris-HCl pH 8,0 y 1,0 % Triton X-100 con inhibidor de proteasas (cocktail inhibidor de proteasas, Sigma, St. Louis, MO, USA) y DHBA y Nw como estándares internos para las catecolaminas y las indolaminas respectivamente. Se sonicaron al 30 % de intensidad durante 10 s intermitentes manteniendo las muestras en hielo (Branson Digital Sonifier, model 250, Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT, USA), se alicuotaron y se mantuvieron a -80°C hasta su análisis.

- Determinación de BDNF: Para la determinación de BDNF en el hipocampo, una alícuota procedente de la preparación de las muestras del punto anterior fue diluida 1:5 en DPBS (2,68 mM KCl, 137 mM NaCl, 1,47 mM KH_2PO_4 , 8,1 mM Na_2HPO_4 , 0,9 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 0,49 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).

- Determinación de NT: Una alícuota de las muestras procedentes de la preparación de extracto de proteínas, se homogenizó inmediatamente con una dilución 1:2 en el tampón 0,25 M ácido perclórico con 0,1 M Na_2SO_5 y 0,25 M EDTA mediante vórtex intenso, se alicuotó y se mantuvo a -80°C hasta su análisis.

Los NTs se determinaron por HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia) y se siguió el protocolo descrito en (Sabria y cols., 2003) con algunas modificaciones. Se realizó la puesta a punto del sistema HPLC (Elite LaChrom, Merck, Hitachi, Japan) equipado con la columna Chromolith Rp-18e 100 x 4,6 mm (Merck KgaA, Darmstadt, Germany) con detección electroquímica (ESA Coulochem II 5200, Bedford, MA, USA) para la detección de NA, A, L-dopa, DA, DHBA, HVA, 5-HT y 5-HIAA. La fase móvil utilizada consistía en tampón citrato 0,5 M a pH 2,8 con 0,05 mM EDTA, 1,2 mM

octilsulfato de sodio (SOS) y 1 % acetonitrilo. El flujo se estableció en 1 mL/min y el voltaje de la celda de detección a 400 mV.

Para llevar a cabo la validación del sistema cromatográfico se determinaron los parámetros de precisión, linealidad, límite de detección y límite de cuantificación de los analitos ensayados. Para la determinación de la precisión se realizaron 6 inyecciones de soluciones de los patrones a concentraciones cercanas al valor nominal en un período de tiempo corto (intradía) o en períodos de tiempo largos (interdía). La precisión tanto intra como interdía fue establecida menor del 4 %. Para determinar la linealidad se realizaron 5 soluciones de concentraciones que cubrieron el rango con el que se trabajó posteriormente y cada una de ellas fue testada en series de 6 inyecciones. La linealidad se cumplía entre 2,5 – 80 pg/ μ L para 5-HT, 5-160 pg/ μ L para N ω , 5-240 pg/ μ L para HVA y 2,5-120 pg/ μ L para el resto de NTs, con un coeficiente de determinación (R²) mayor de 0,999 para todos ellos. Los límites de detección y cuantificación se determinaron a partir de la desviación estándar de la respuesta de la recta de calibración (término libre) y de la pendiente. El límite de detección se estableció entre 2,14 y 4,97 pg/ μ L y el límite de cuantificación entre 6,48 y 15,06 pg/ μ L para todos los analitos.

Las muestras, tanto de suero como de cerebro, utilizadas para la determinación de NT mediante HPLC fueron centrifugadas a 12000 x g durante 10 min a 4 °C previamente a su inyección en el sistema cromatográfico. Se determinó la concentración de catecolaminas (NA, DA, DOPAC y HVA) e indolaminas (5-HT y 5-HIAA) en el tejido cerebral, y de NA y A en las muestras de suero. El DHBA y el N ω como estándares internos para las catecolaminas y las indolaminas respectivamente, permitieron la comparación entre muestras. Como niveles de actividad total de las vías se calcularon los valores del total del sistema dopaminérgico (DA_{total}) como la suma de (DA, DOPAC y HVA); catecolaminérgico (CAT_{total}) como la suma de (NA, DA, DOPAC y HVA) y serotoninérgico (IND_{total}) como la suma de (5-HT y 5-HIAA).

“Este procedimiento llevado a cabo en el estudio de Potes y cols. (2017), forma parte de la Tesis doctoral de Laura Arroyo “Estudio Neurofisiológico del Estrés y el Enriquecimiento Ambiental en ganado Porcino” 2017).”

2.4. Marcadores estrés oxidativo

Se homogeneizaron 0,5 g de músculo en 4,5 ml de Tampón de homogenizado (10mM de K_2HPO_4 (pH 7,4), 50mM NaCl, y 0,1% de Triton-X 100) con un Ultraturrax (IKA, Staufen, Alemania) a 4°C. Los homogeneizados fueron centrifugados a 1500 x g durante 6 minutos a 4°C y se recogieron los sobrenadantes. Se calculó la concentración proteica por el método de Bradford (1976).

Se analizó la concentración de los productos finales de la cascada LPO, el reactivo aldehído malondialdehído (MDA) y el 4 -hidroxi-2- (E) -nonenal (4-HNE), utilizando un LPO AssayKit (No.437634; Calbiochem, San Diego, CA, EEUU) basado en la condensación del cromógeno 1-metil-2-fenilindol con MDA o 4-HNE. Los resultados se expresaron como nmoles de MDA + 4-HNE/g de proteína.

La actividad antioxidante total (AAT) fue determinada usando el método ABTS/ H_2O_2 /HPR descrito por Arnao y cols. (2001) con ligeras modificaciones propuestas por De Gonzalo y cols. (2010) expresándose los resultados como equivalentes de mg Trolox/mg de proteína.

2.5. Ensayo de actividad del Proteasoma

Se utilizó el kit de ensayo de actividad de proteasoma 20S (Chemicon International Inc, Temecula, CA, USA) basado en la detección del fluoróforo 7-amino-4-metilcumarin (AMC) tras ser liberado del substrato marcado IIVY-AMC por la actividad catalítica del proteasoma tipo quimotripsina-like. El AMC libre se detecta por cuantificación fluorimétrica (380/460nm). Las unidades se expresan como como μM de AMC / mg de proteína.

2.6. Análisis de marcadores autofágicos (Western-blot) en el músculo.

Los extractos de tejido muscular obtenidos (100 µg de proteína por muestra) se mezclaron con tampón de muestra Laemmli (1610737, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) y se desnaturalizaron a 100°C durante 5 min. Las muestras se fraccionaron usando SDS-PAGE a 100 V y posteriormente fueron transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno a 100 V (Immobilon TM-P, Millipore Corp., Bedford, MA, USA). Se bloquearon las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente con leche desnatada al 10% (p/v) disuelta en una solución salina tamponada con Tris (TBS) (50 mM de Tris/HCl (pH 7,5) y 150mM de NaCl). Posteriormente, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios respectivos, anti-Beclin1 (3738; Cell Signaling, Danvers, MA, USA), anti-LC3 (PD014; Medical & Biological Laboratories Co. Ltd, Naka-ku Nagoya, Japón) y anti Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (anti-GAPDH) (sc-20356; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), que previamente fueron diluidos en tampón TBS con leche desnatada al 1% (p/v). Después de realizar tres lavados, de 10 minutos (para Beclin1 y GAPDH) o 20 minutos (para LC3) en TBS-T (50mM Tris / HCl (pH 7,5), 150mM NaCl y 0,05% de Tween-20), las membranas se incubaron 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario unido a la peroxidasa de rábano (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) y diluido en tampón TBS con leche desnatada al 1% (p/v), seguido de tres lavados de 10 o 20 min en TBS-T. Las membranas se revelaron utilizando un sustrato quimioluminiscente de peroxidasa de rábano (WBKLS0500, Millipore Corp., Darmstadt, Alemania). Los niveles de expresión de estos marcadores se analizaron cuantitativamente usando el software Quantity One 5.5.1 (Bio-Rad Laboratories Inc.). Los resultados fueron normalizados respecto a GAPDH como control de carga.

2.7. Análisis estadístico

El efecto del sesgo cognitivo sobre los niveles cerebrales de NT se determinó mediante ANOVA utilizando el procedimiento GLM de SPSS vs 15. Para las variables

medidas a diferentes tiempos post-mortem (AAT, LPO, Actividad del proteasoma, expresión de Beclin1 y LC3-II/LC3-I ratio) el modelo incluyó los efectos del sesgo cognitivo, el tiempo post-mortem transcurrido y su interacción como efectos principales. Una vez comprobada la existencia de interacciones entre los factores principales, se analizó el efecto del sesgo cognitivo y del tiempo (con el animal como factor aleatorio). Las diferencias significativas entre los niveles del tiempo post-mortem fueron analizadas mediante post-hoc de Bonferroni.

3. Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos en este experimento muestran como los mecanismos bioquímicos y celulares responsables de la conversión del músculo en carne varían en función de las condiciones psicológicas del animal en el momento del sacrificio, lo que a su vez dependerá en parte del sesgo cognitivo que refleja su estado emocional y su influencia en los procesos cognitivos como la atención, el aprendizaje, la memoria y la toma de decisiones (Mendl y cols., 2009).

Nuestra hipótesis de partida era que el estado emocional de los cerdos puede afectar a la interpretación que hacen de los cambios y estímulos que sufren durante el periodo de tiempo que rodea al sacrificio y en consecuencia este estado emocional podría modular el estrés generado por dichos estímulos en los animales, lo que quedaría reflejado en el perfil de determinados NTs que han sido propuestos como marcadores fisiológicos de estrés (Yeates y Main, 2008). Esta hipótesis estaría apoyada por trabajos en los que se ha descrito que se producen cambios en el perfil de NTs en el cerebro de cerdos genéticamente susceptibles a estrés y sus efectos sobre la agresividad y comportamientos de dominancia (Aldeola y cols., 1993, Poletto y cols., 2010 y 2011).

Los resultados del análisis de NTs realizados en el presente experimento mostraron niveles significativamente menores ($P < 0,001$) de dopamina en el cortex cerebral de los cerdos NB respecto a los PB. Además, se observaron concentraciones significativamente superiores de Serotonina (5HT) ($P < 0,01$) y valores superiores

(aunque no significativamente) de noradrenalina (NA) y de Acido 5-hidroxiindolacético (5HIAA) en el hipocampo de los individuos con NB en comparación con los PB (Tabla 5).

La relación entre los NTs cerebrales y el comportamiento relacionado con el miedo ya había sido demostrada anteriormente por nuestro grupo en un estudio previo donde se comprobó que someter animales temerosos a un manejo estresante incrementaba los niveles de catecolaminas e indolaminas, y especialmente de la serotonina, en el hipocampo (Arroyo y cols., 2016).

A pesar de que nuestros resultados concuerdan con los trabajos previos, es necesario indicar que debido al escaso número de animales clasificados como NB no se puede extraer conclusiones generales. Los cerdos NB en este estudio parecían tener mayor predisposición a la sospecha y al miedo frente a situaciones desconocidas y amenazantes como las que se suceden durante proceso de sacrificio, mostrando mayores niveles de serotonina en el hipocampo a pesar de haber sido sometidos a un manejo muy cuidadoso, lo que indica que tienen mayor susceptibilidad al estrés durante el sacrificio. Además, la concentración más elevada de serotonina en el hipocampo de individuos NG coincide con otros estudios que describían una mayor liberación de noradrenalina y serotonina en el cerebro de ratas (Mora y cols., 2012) y cerdos (Piekarzewska y cols., 1999) en respuesta a diferentes situaciones de estrés. Esto puede deberse al hecho de que el hipocampo es la primera estructura cerebral que ha sido reconocida como diana de las hormonas de estrés (Moral y cols., 2012). Nuestros resultados también concuerdan con el trabajo de Bauer y cols. (2015) en el que se asociaban niveles más elevados de serotonina con el miedo o la ansiedad. Todos estos resultados apoyan la idea de que aquellos animales que tienen un estado psicológico negativo sufrirán más y tendrán menor control ante situaciones estresantes.

La dopamina (DA) también ha sido relacionada con gran cantidad de procesos psicológicos como son el comportamiento motivado por recompensa, reacciones placenteras frente a un refuerzo positivo, provisión de señales de error durante el aprendizaje, respuesta frente a nuevos estímulos, provisión de señales de refuerzo esenciales para la adquisición de nuevos patrones de actuación y la incentivación de la motivación (Phillips y cols., 2008). Todos estos argumentos refuerzan la idea de que

los mayores niveles de DA en el cortex pre-frontal de los animales PB irían acompañados de una reacción positiva frente a los estímulos nuevos, incluso a aquellos relacionados con el manejo pre-sacrificio.

Tabla 5. Efecto del sesgo cognitivo (sesgo positivo "PB" o sesgo negativo "NB") sobre las concentraciones de catecolaminas e indolaminas en diferentes regiones cerebrales.

Sesgo Cognitivo	Amígdala				Cortex				Hipocampo			
	PB	NB	e.e.	Sign.	PB	NB	e.e.	Sign.	PB	NB	e.e.	Sign.
Catecolaminas (ng/g):												
Noradrenalina (NA)	175,58	166,49	42,48	ns	89,01	104,06	22,85	ns	116,63	150,50	27,89	ns
Dopamina (DA)	407,26	449,42	137,48	ns	30,49	10,52	2,33	***	26,58	23,25	9,41	ns
Ratio NA/DA	0,32	0,42	0,08	ns	2,73	9,83	1,62	ns	5,20	6,97	3,01	ns
Indolaminas (ng/g):												
Ácido 5-Hidroxiindolacético (5HIAA)	289,05	249,51	48,48	ns	82,41	83,85	18,29	ns	120,87	156,29	27,02	ns
Serotonina (5HT)	1138,03	872,01	232,73	ns	275,01	231,35	39,95	ns	241,92	336,51	23,19	**
Ratio 5HIAA/5HT	0,25	0,31	0,04	ns	0,31	0,36	0,06	ns	0,51	0,47	0,12	ns

e,e,: error estandar combinado; Significación: ns: no significativo; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$.

Tabla 6. Efecto del sesgo cognitivo ("CB") (sesgo positivo "PB" o sesgo negativo "NB"), tiempo post-mortem "T" (0, 4, 8, 24 h) y su interacción (CB x T) sobre la actividad antioxidante total (AAT, expresada en mg de Trolox / mg de proteína) y la peroxidación lipídica (LPO, expresada en $\mu\text{mol MDA} + 4\text{HNE} / \text{g proteína}$) en el músculo.

Sesgo Cognitivo	PB				NB				e.e.	Significación		
	0 h	4 h	8 h	24 h	0 h	4 h	8 h	24 h		Sesgo Cogn.	T	Sesgo Cogn. x T
Tiempo post-mortem (T)												
AAT	24,05	21,77	27,08	25,18	37,88	28,43	32,48	31,73	10,56	***	ns	ns
LPO	34,96 ^a	30,54 ^{ab}	31,81 ^{ab}	26,31 ^b	59,02 ^a	30,02 ^a	26,31 ^b	22,42 ^b	16,04	ns	***	***

Para cada grupo de sesgo cognitivo, los promedios de cada tiempo seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes para $P < 0,05$; PB: sesgo positivo, NB: sesgo negativo; T: Tiempo; CB*T: Interacción sesgo cognitivo por tiempo; e,e.: error estándar combinado; Significación: ns: no significativo; ***: $P < 0,001$.

El manejo pre-sacrificio es probablemente la situación más estresante para los animales destinados a la producción de carne y sus efectos claramente dependerán de la capacidad del animal de lidiar con dicha situación de estrés. Un trabajo reciente mostraba relación entre los trastornos emocionales como ansiedad y estrés, con diversos procesos que contribuyen al estrés oxidativo celular y proponían la LPO como un buen indicador de desórdenes por ansiedad (Salim, 2014). Además, se ha demostrado que el estrés psicológico resulta en daño oxidativo en el músculo (Li y cols., 2011; Rubio-González y cols., 2015). En el presente estudio se ha evaluado el efecto del sesgo cognitivo sobre dos biomarcadores habituales de estrés oxidativo la LPO muscular (indicador de daño oxidativo) y la AAT (defensa antioxidante) cuyos resultados se recogen en la Tabla 6.

Los resultados muestran diferencias, en función del sesgo cognitivo, en el balance oxidativo del músculo, de modo que en los cerdos NB se producía una mayor actividad antioxidante ($P < 0,001$) en comparación con los PB en todos los tiempos analizados durante el post-mortem. Incrementos en los sistemas de defensa antioxidante ya se habían relacionado anteriormente con una posible respuesta adaptativa al estrés bajo diferentes circunstancias en vacuno y porcino (Caballero y cols., 2006; Rubio-González y cols., 2015).

En este estudio las diferencias en la respuesta antioxidante se observaron desde los primeros momentos tras el sacrificio del animal (0h post-mortem) lo que parece indicar que en los animales NB se disparen antes los mecanismos de defensa antioxidante como la respuesta de las células musculares al incremento de radicales libres generados en el sacrificio y los mantengan durante todo el post-mortem temprano. Sin bien, esta respuesta antioxidante, no parece ser lo suficientemente rápida como para evitar los elevados niveles de LPO que se producen en el tejido muscular de los animales NB a las 0 h (demostrando la relación existente entre el estrés psicológico al sacrificio y el daño en las células musculares), aunque sí que parece contribuir a la disminución significativa del daño oxidativo en etapas posteriores del post-mortem temprano ($P < 0,001$) tanto en los animales NB como PB. Esta disminución de LPO en el post-mortem temprano (0-4 h) fue mayor ($P < 0,001$) en los animales NB que en los PB lo que explica la interacción significativa encontrada

entre el sesgo cognitivo y el tiempo post-mortem al evaluar el daño oxidativo de la carne mediante LPO.

Todos estos procesos, junto con el sesgo cognitivo del animal y su susceptibilidad al estrés podrían tener importantes efectos sobre el debilitamiento y la desestructuración celular del músculo post-mortem que dependerá a su vez de los fenómenos proteolíticos que tienen lugar sobre determinadas proteínas estructurales clave y que estará regulada por la acción sinérgica y combinada de diferentes sistemas proteolíticos como el lisosomal o el proteasoma (Houback y cols., 2008; Ouali y cols., 2013). El efecto de las catepsinas (enzimas lisosomales) sobre la calidad de la carne ha sido demostrado en estudios previos (Maribo y cols., 1999; Caballero y cols., 2007) así como la ocurrencia de permeabilización lisosomal y liberación de catepsinas en las fases tempranas de la respuesta celular al estrés oxidativo (Conus y Simon, 2008). También es conocido el papel del proteasoma en la degradación de la mayoría de proteínas intracelulares, tanto las de vida corta como larga, siendo el complejo Ubiquitina con la subunidad catalítica del proteosoma 20S el responsable de esta degradación (Ouali y cols., 2013). Sin embargo, hasta la fecha, el papel del proteasoma en la tenderización temprana no ha sido totalmente clarificado, aunque se sabe que su activación es una de las primeras respuestas celulares al estrés.

De un modo similar a lo que ocurre en el estado oxidativo muscular los resultados obtenidos para la actividad del Proteasoma 20S en este estudio mostraban una actividad significativamente mayor ($P < 0,001$) en el tejido muscular de cerdos NB a 0 h post-mortem (Figura 15a) mientras que los cerdos PB mostraron una actividad del proteasoma 20S significativamente mayor a las 4 h post-mortem ($P < 0,001$) (Figura 15b), mostrando un retardo evidente en el sistema de respuesta celular tras el sacrificio en estos animales. El descenso significativo y gradual en la actividad del proteasoma a lo largo del tiempo ($P < 0,001$) fue similar en ambos casos (Figura 15b). Estos resultados parecen indicar una mayor y más rápida producción de radicales libres en los tejidos musculares de los animales NB debido a que perciben de forma más estresante los procesos a los que se les somete durante el sacrificio, mientras que este efecto se observa de un modo más ralentizado en cerdos con sesgo cognitivo positivo (PB).

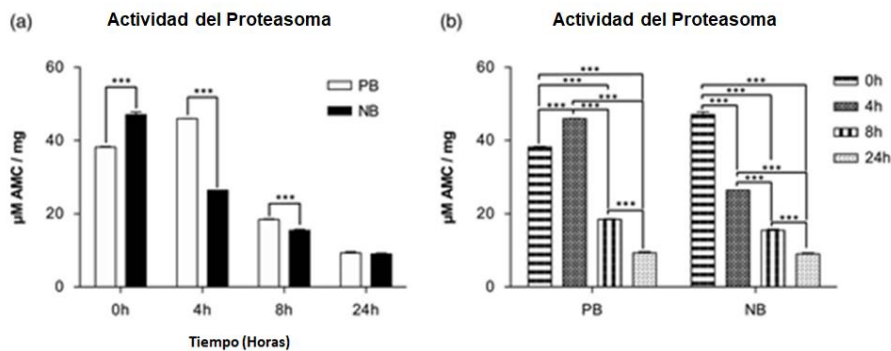


Figura 15. Actividad del proteasoma en el músculo (media \pm SEM), expresada como μM 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) / mg de proteína; **(a)** Efecto del sesgo cognitivo (sesgo positivo "PB" o sesgo negativo "NB") sobre la actividad del proteasoma a diferentes tiempos post-mortem; **(b)** Efecto del tiempo post-mortem (0, 4, 8 y 24 h) sobre la actividad del proteasoma muscular dentro de los diferentes grupos de animales para la prueba de sesgo cognitivo (comportamiento positivo (PB) y comportamiento negativo (NB), *** P < 0,001.

El estrés oxidativo producido en el tejido muscular como consecuencia del estrés al sacrificio conduce a la activación de otro mecanismo proteolítico importante, la autofagia (Rubio-González y cols., 2015). Esto puede ir relacionado con un incremento de los niveles de EROs en los tejidos, que podrían activar la autofagia como un mecanismo de defensa para prevenir el daño celular. Basándonos en resultados previos de nuestro grupo en los que habíamos demostrado la ocurrencia de autofagia en la fase pre-rigor al inicio de la maduración (García-Macía y cols., 2014) y que demostraban que sufrir un cierto grado de estrés afectaba a la evolución en el tiempo de determinados biomarcadores de autofagia en el músculo post-mortem de los cerdos (Rubio-González y cols., 2015), en este experimento se analizó la evolución de distintos marcadores de autofagia para tratar de establecer su relación con el sesgo cognitivo y la susceptibilidad al estrés peri-sacrificio de los animales.

Para ello se analizaron los niveles de expresión de algunos de los principales biomarcadores de autofagia como Beclin1 y la proteína ligera asociada a microtúbulos (LC3). Beclin1 es una proteína (60kDa) que interacciona con la fosfatidilinositol-3-quimasa clase III y juega un papel relevante en la autofagia. Los análisis mediante inmunoblot mostraron expresión de Beclin1 y por tanto actividad autofágica en el tejido muscular post-mortem de ambos grupos de animales (PB y NB), aunque con

claras diferencias en función del sesgo cognitivo (Figura 16). Los animales NB mostraban un comportamiento similar al observado en el caso de la actividad proteasoma, con niveles de expresión significativamente mayores que los cerdos PB a las 0 (P<0,05) y 4 h post-mortem (P<0,001) (Figura 16a), seguido de un descenso gradual durante el oreo de las canales (4-24 h post-mortem). Por el contrario, en el caso de los músculos de los cerdos PB se invertía esta tendencia, observándose un incremento significativo de la expresión de Beclin1 a medida que se incrementa el tiempo post-mortem de estudio, en concreto de las 4 a las 24 h (Figura 16b).

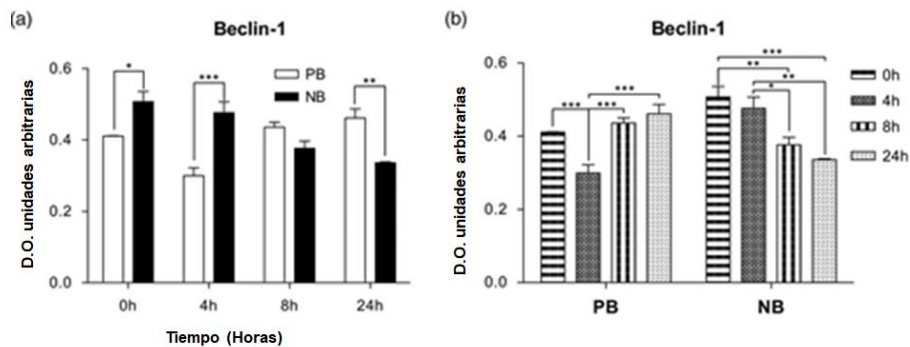


Figura 16. (a) Efecto del sesgo cognitivo (sesgo positivo (PB) o sesgo negativo (NB)) en la expresión de Beclin1 a lo largo del post-mortem temprano (0-24 h); **(b)** efecto del tiempo post-mortem (0, 4, 8 y 24 h) sobre la expresión de Beclin1 dentro de los diferentes grupos de animales para la prueba de sesgo cognitivo (PB y NB), * P <0,05. ** P <0,01. *** P <0,001. Datos expresados como densidad óptica semicuantitativa (unidades arbitrarias) de bandas de transferencia normalizadas con respecto a GAPDH.

La conversión de LC3-I (forma soluble) a LC3-II (forma conjugada con fosfolípidos y unida a las membranas) se correlaciona con la formación de autofagosomas completos y autolisosomas y por tanto inevitablemente con la ocurrencia de autogagia, por ello el estudio del flujo autofágico (ratio LC3-II/LC3-I) es un marcador muy útil de actividad autofágica en las células. En los análisis por Western-blot para dicho marcador aparecían dos bandas de 18 y 16kDa que se correspondían con LC3-I y LC3-II respectivamente, y que mostraron diferencias en cuanto a sus niveles de expresión en función del sesgo cognitivo. Se observaron niveles significativamente mayores del flujo autofágico (ratio LC3-II/LC3-I) en el LT de cerdos NB al inicio del post-mortem (0 h) seguido de un descenso significativo durante el oreo (Figura 17). Por el contrario, en el caso del LT de los cerdos con sesgo positivo se

observó un retardo en el incremento de estos marcadores autofágicos, observándose niveles mayores de expresión ($P < 0,001$) que en los NB a tiempos post-mortem más largos (8 h).

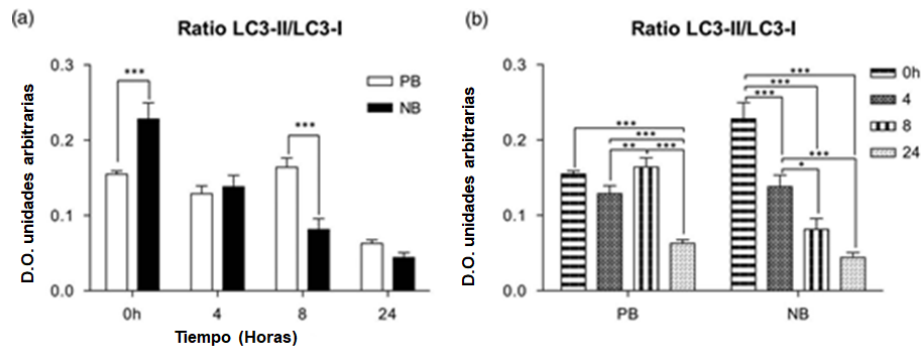


Figura 17. (a) Efecto del sesgo cognitivo (sesgo positivo (PB) o negativo (NB)) en el flujo autofágico (ratio LC3-II / LC3-I) a distintos tiempos post-mortem; (b) efecto del tiempo post-mortem (0, 4, 8 y 24 h) sobre el flujo autofágico para cada grupo de animales en función del sesgo cognitivo (PB y NB). * $P < 0,05$. ** $P < 0,01$. *** $P < 0,001$. Datos expresados como densidad óptica semicuantitativa (unidades arbitrarias) de las bandas normalizadas por GAPDH.

Los resultados obtenidos en este experimento muestran como los mecanismos bioquímicos y celulares responsables de la conversión del músculo en carne varían en función de las condiciones psicológicas del animal en el momento del sacrificio, lo que a su vez depende en parte del sesgo cognitivo. El Sesgo cognitivo modula la respuesta al estrés al sacrificio del metabolismo muscular y tendrá gran influencia en el balance de estrés oxidativo muscular, la actividad del proteasoma y el disparo autofágico durante las primeras fases del de la tenderización post-mortem (Figura 18).

Estos resultados sugieren el potencial de algunos de estos biomarcadores de proteólisis, autofagia y estrés oxidativo en las células musculares como indicadores de estrés al sacrificio.

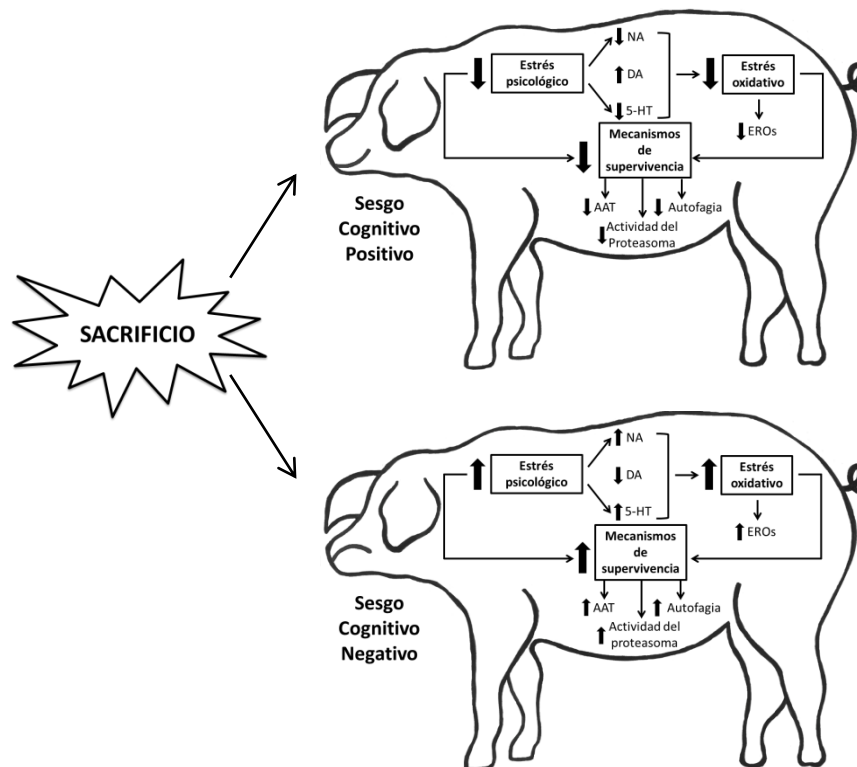


Figura 18. Resumen de los principales factores implicados en este estudio y la relación establecida entre ellos. La susceptibilidad de un animal al estrés en el sacrificio depende de su sesgo cognitivo y muestra algunas variaciones de los neurotransmisores, que inducen respuestas fisiológicas y cambios en la respuesta muscular al estrés oxidativo, desencadenando la autofagia como mecanismo de supervivencia de las células musculares. NA = noradrenalina; DA = dopamina; 5HT = serotonina; EROs = especies reactivas de oxígeno; AAT = actividad antioxidante total.

CAPÍTULO 5: EFECTO DE LA MEZCLA CON ANIMALES EXTRAÑOS EN GRANJA Y DURANTE EL TRANSPORTE Y ESPERA PREVIOS AL SACRIFICIO SOBRE EL METABOLISMO POST-MORTEM DEL MÚSCULO Y LA CALIDAD DE LA CARNE EN PORCINO

1. Introducción

El bienestar animal en granja está ganando importancia desde el punto de vista del consumidor, tanto en términos éticos como por su influencia sobre la calidad de los alimentos. Sin embargo, la evaluación del bienestar animal no es un tema sencillo y requiere un enfoque multidisciplinar (Velarde y Dalmau, 2018). Las diferencias individuales de los animales en cuanto a su capacidad física, reactividad emocional y susceptibilidad al estrés hacen incluso más difícil establecer el estado de bienestar de cada individuo, que podría diferir del estado medio del grupo. Por ese motivo, hay un creciente interés en el desarrollo de metodologías fiables que permitan evaluar percepciones individuales del estrés y su posible efecto en la salud y el estado de bienestar de los animales y por tanto en la calidad final de la carne.

Mezclar animales desconocidos en algún momento del período de cría es una práctica común en la producción porcina, pero puede ocasionar lesiones y estrés social dentro del grupo. Estudios previos han demostrado que la mezcla de cerdos desconocidos desemboca en una lucha con el fin de crear una nueva jerarquía (Andersen y cols., 2000; Peden y cols., 2018). Además, retirar uno o más animales en un cubículo puede afectar al orden jerárquico establecido y generar estrés en los animales restantes, o incitarlos a la lucha (Fàbrega y cols., 2013).

Exponer un animal a un estrés pre-sacrificio, inicia una cascada de reacciones fisiológicas que pueden afectar a la calidad de la carne, principalmente de forma negativa. Este fenómeno está bien descrito en cerdos, y hay evidencias que sugieren que el estrés antes del sacrificio explica una gran parte de la variabilidad en el metabolismo post-mortem del músculo, y en consecuencia en las características de la calidad de la carne. (Bertram y cols., 2010; Gajana y cols., 2013; Goumon y Facitano, 2017).

La mayoría de los procesos que ocurren en el músculo post-mortem están regulados por proteasas y otras proteínas. Por ese motivo, la proteómica es una herramienta útil para la comprensión bioquímica de las rutas y los eventos celulares involucrados así como para la identificación de biomarcadores de estrés animal. Hasta

la fecha, varios trabajos han investigado las proteínas como posibles biomarcadores de calidad cárnica utilizando enfoques proteómicos (Lametsch y cols., 2003; Jia y cols., 2009; Sierra y cols., 2012; Gagaoua y cols., 2015; Oliván y cols., 2018) algunos de ellos centrados en la susceptibilidad del animal al estrés (Morzel y cols., 2004; Kim y cols., 2010). Sin embargo, la alta discrepancia de resultados refleja la complejidad de los procesos involucrados.

El objetivo de este trabajo ha sido aplicar la proteómica para ampliar nuestro conocimiento del efecto que produce la mezcla de animales desconocidos en diferentes etapas del proceso de producción del porcino sobre la susceptibilidad individual del animal al estrés y además en su respuesta fisiológica al sacrificio así como en el metabolismo post-mortem muscular, con el fin de identificar biomarcadores de estrés pre-sacrificio.

2. Material y métodos

2.1. Animales y manejo

Se utilizaron 96 lechones machos ((Large White x Landrace) x Duroc). La mitad de los animales se mezclaron con animales extraños en dos ocasiones (a los 12 días y 60 días de edad) durante el período de cría en granja, la otra mitad se mantuvo todo el tiempo en el mismo grupo (mezclados en granja “MF” vs no mezclados en granja “UF”). Cuando los animales alcanzaron los 120 kg de peso, se procedió al transporte de los animales al matadero (distancia 1 km) para lo cual en cada uno de dichos tratamientos (MF o UF) la mitad de los animales se mezclaron con animales extraños y la otra mitad no (Mezclados durante Transporte y Espera “MTL” vs No mezcla durante Transporte y Espera “UTL”).

De entre todos los animales se seleccionaron aleatoriamente 15 cerdos para el estudio bioquímico y proteómico, pertenecientes al mismo lote de sacrificio de modo que se tenían 5 animales de cada uno de los tres tratamientos de manejo aplicados: MF-MTL (Mezcla en Granja-Mezcla en el Transporte y Espera), MF-UTL (Mezcla en

Granja-No Mezcla en el Transporte y Espera) y UF-UTL (No Mezcla en Granja-No Mezcla en el Transporte y Espera).

2.2. Toma de muestras y medidas de calidad en matadero

En el momento de la exsanguinación se recogió sangre (aprox 10 ml) en tubos sin anticoagulante. Se extrajo el suero por centrifugación a 2000 xg durante 10 minutos que fue alicuotado y conservado a -80°C.

La calidad de la carne se evaluó en la media canal izquierda donde se midió el pH muscular a los 45 min (pH45) y a las 24 h (pH24) post-mortem en el *Músculo Semimembranoso* (SM), usando un medidor de pH portátil Crison equipado con un electrodo xerolítico. La CE también se midió a las 24 h post-mortem en el SM usando un Pork Quality Meter (PQM-I, INTEK Aichach, Alemania). Además se tomaron muestras de carne (20 g) del LT inmediatamente después del sacrificio (t= 0 h) y después de 4 h, 8 h y 24 h de acondicionamiento de la carne a 4°C, para el análisis del perfil de proteínas y AAT. Estas muestras musculares se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

El color de la carne se midió a las 24h post-mortem con un espectrofotómetro Minolta C2002, iluminante C (Konica Minolta Inc., Madrid, España) sobre tres puntos distintos (de 10 mm de diámetro) de la superficie de corte expuesta de la última costilla del músculo LT. Dicho equipo mide L*, a* y b*. Los valores recogidos en los tres puntos analizados fueron promediados.

La pérdida por goteo en carne (% de exudados) se determinó por duplicado en muestras frescas de 25 mm de diámetro extraídas del LT a las 24 h post-mortem y colocadas en un recipiente especial (Meat juice collector, Sarstedt, Alemania), según el método de Rasmussen y Andersson (1996) con pequeñas modificaciones.

2.3. Parámetros bioquímicos y fisiológicos en la sangre

Se analizaron, por duplicado, los siguientes metabolitos:

- Marcadores para la utilización de la glucosa: glucosa (método Hexokinase,) y lactato (método enzimático LOD-Lactato Oxidasa-).
- Marcadores del metabolismo del nitrógeno: creatinina (método Jaffé,), urea (método GLDH y proteínas totales (método Biuret).
- Marcadores del metabolismo lipídico: triglicéridos (método GPO-PAP), colesterol total (método CHOP-PAP,), colesterol HDL (HDLchol, método de inmunoinhibición,), colesterol LDL (LDL-chol, método de protección selectiva,), ácidos grasos no esterificados (NEFA, NEFA-C reactivo, Wako Chemicals) y 3-hidroxibutirato (BHB, reactivo de Ranbut, Randox Laboratories, Ltd).
- Proteínas de fase aguda "APPs" como marcadores inflamatorios: haptoglobina (Phase Haptoglobin, Tridelta Ltd), proteína C-reactiva (PCR, método inmunturbidimétrico,) y PigMAP (ELISA, PigChamp ProEuropa).
- Marcador de músculo esquelético: creatin quinasa (CK, método IFCC,).
- Marcador de estrés oxidativo: glutatión peroxidasa GPx (método Cumene Hydroperoxyde, Ransel, Randox Laboratories Ltd).
- Hormona de estrés: cortisol (ELISA, DRG Diagnostics, Alemania).

Todos los parámetros se determinaron mediante técnicas espectrofotométricas en el analizador Olympus AU400 (beckman coulter Inc., Barcelona, Spain), con la excepción de Pig-MAP y cortisol, que se determinaron mediante ELISA.

2.4. Actividad antioxidante del músculo

La AAT se determinó en muestras de tejido muscular tomadas a las 0h post-mortem, utilizando el método ABTS/H₂O₂/HRP (de Gonzalo-Calvo y cols., 2010). Los resultados se expresan como equivalentes de mg Trolox / mg de proteína.

2.5. Extracción proteica de la fracción sarcoplásmica y electroforesis

A partir de 2g de carne se extrajo la fracción sarcoplásmica de las proteínas, que contiene la mayoría de las enzimas de la vía glicolítica y otras proteínas metabólicas siguiendo el método descrito por Jia y cols. (2009). Para ello, se homogeneizaron en 2 ml de tampón () Fosfato 0.1M [pH 7,4], usando un Polytron PT1200 E (Kinematica Inc., Lucerna, Suiza) tres veces durante 15 segundos a velocidad máxima. El homogeneizado se centrifugó (30 min a 1000 xg) a 4°C para eliminar las proteínas insolubles en dicho tampón. Los sobrenadantes fueron filtrados y las muestras fueron congeladas a -20°C.

Las concentraciones de proteína se determinaron por Bradford (Bradford, 1976) usando seroalbúmina como estándar 120 microgramos de proteína de cada muestra fueron desnaturalizadas mezclando con tampón (62.5 mM Tris/HCl pH 6,8, 2% SDS, 20% glicerol 5% mercaptoetanol y 0.025% azul de bromofenol) y calentando a 95°C durante 5 minutos, y sometieron a electroforesis unidimensional en geles verticales de 1mm de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), (Xi Protean II, Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA) según el procedimiento descrito por Sierra y cols. (2012).

El gel de resolución contenía 11% y el gel de empaquetamiento 4% de acrilamida al 30% (p/vol): bisacrilamida y una mezcla de 375mM de Tris/HCl pH 8,8, 10% (p/vol) SDS, 10% (p/vol) de Persulfato de Amonio (APS), 0.1% TEMED y agua milli-Q. Además en cada gel se cargaron marcadores de peso molecular preteñidos (Precision Plus Protein All Blue Standards, Bio-Rad Laboratories Inc., Hércules, CA, USA) con el fin de determinar los pesos moleculares de las bandas de proteína. Los geles (tamaño 20 cm x 20 cm) se corrieron a 80 V durante 2 h, 160 V durante 2 h, 250 V durante 10 h y 500 V durante 20 min (Universal PowerPack 500, Bio-Rad), se tiñeron con una mezcla de 30% (vol/vol) de metanol, 10 % (vol/vol) de ácido acético y 0,01% (p/vol) de Coomassie Brilliant Blue R-250 y se destiñeron usando una mezcla de 40% (vol/vol) de metanol y 10% (vol/vol) de ácido acético. Se hicieron tres geles por muestra.

2.6. Análisis de imagen e identificación de proteínas por huella peptídica

Una vez teñidos los geles se escanearon con el densitómetro de imágenes GS-800 (Bio-Rad) y posteriormente esas imágenes fueron analizadas con el software de análisis de imágenes Quantity One 5.5.1 (Bio-Rad). Para ello se calculó la densidad relativa de las bandas de cada gel para corregir posibles diferencias de carga. Las bandas de interés se cortaron manualmente y se enviaron para su identificación al laboratorio de proteómica Inbiotec S.L. (León, España), donde las proteínas fueron digeridas siguiendo el método de Havlis y cols. (2003) y procesadas para un análisis posterior según lo indicado por Jami y cols. (2010). Las muestras se analizaron con un espectrómetro de masas 4800 Proteomics Analyzer (ABSciex, MA, USA) con fuente de ionización tipo MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization) y dos analizadores de tiempo de vuelo (TOF). Se usó una mezcla de calibración 4700 (Cal Mix 5, ABSciex) como calibración externa. Todos los espectros de MS se calibraron internamente utilizando péptidos de la digestión con tripsina. El análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF produjo huellas de masas de péptidos y los péptidos observados (hasta 65 péptidos por punto) se recogieron y se representaron como una lista de pesos moleculares monoisotópicos con una relación señal/ruido (S/N) mayor que 20 utilizando el software 4000 Series Explorer v3.5.3 (ABSciex). Todos los iones contaminantes conocidos (péptidos derivados de tripsina y queratina) se excluyeron para el posterior análisis MS/MS. Por lo tanto, a partir de cada espectro MS, los 10 precursores más intensivos con S/N mayor que 20 se seleccionaron para análisis MS/MS con CID en modo de reflector iónico de 2-kV y ventanas de masa precursora de ± 7 Da. La calibración predeterminada se optimizó para los espectros de MS/MS.

Para la identificación de proteínas, se usaron archivos genéricos Mascot que combinan espectros MS y MS/MS para consultar una base de datos de proteínas no redundantes utilizando una licencia local de Mascot v 2.2 de Matrix Science a través de Global Protein Server v 3.6 (ABSciex). Los parámetros de búsqueda para las huellas de masas de péptidos y los espectros de MS en tándem obtenidos se establecieron de la siguiente manera: i) se utilizaron las bases de datos de secuencias NCBI nr (24-07-

2012); ii) taxonomía: todas las entradas; iii) se consideraron modificaciones fijas y variables (Cys como derivado de S carbamidometilo y Met como metionina oxidada); iv) se permitió un sitio de escisión perdido; v) la tolerancia del precursor fue de 100 partes por millón y la tolerancia del fragmento MS / MS fue de 0,3 Da; vi) carga peptídica: 1+; y vii) el algoritmo se estableció para usar tripsina como enzima. Las proteínas candidatas producidas por esta combinación de huellas peptídicas de masa/búsqueda de EM en tándem se consideraron válidas cuando el puntaje global de la Mascot fue superior a 85 con un nivel de significación de $P < 0,05$.

2.7. Análisis estadístico

El efecto del tratamiento de mezcla (UF-UTL, MF-UTL o MF-MTL) sobre las características de la calidad de la carne y sobre las variables bioquímicas y proteómicas estudiadas se analizó mediante ANOVA usando el procedimiento del GLM de SPSS (v 15.0, 2006, SPSS Inc, Chicago, USA). Para las variables medidas a diferentes tiempos post-mortem (perfil de proteínas sarcoplásmicas), el modelo incluyó los efectos del tratamiento de mezcla, el tiempo post-mortem y su interacción como efectos principales. Una vez descartada la interacción entre el tratamiento de mezcla y el tiempo, se analizó por separado el efecto de la mezcla y el efecto del tiempo (con el animal como factor aleatorio). En los casos donde el efecto era significativo, se analizaron las diferencias entre niveles mediante la prueba post hoc de Tukey (prueba de Games-Howell cuando las varianzas no fueron homogéneas).

Se calcularon modelos de regresión lineal múltiple para la predicción de las principales características de calidad de la carne (pH45, EC24, L*, pérdidas por goteo) a partir de las variables independientes (metabolitos detectados en el suero en el sacrificio, AAT muscular y perfil sarcoplásmico muscular obtenido a las 0 h, 4 h, 8 h y 24 h post-mortem) que fueron seleccionadas por el método “paso a paso”, que incluyó o eliminó variables independientes del modelo de acuerdo con su significación ($P < 0,05$). El objetivo del modelo era determinar qué biomarcadores (metabolitos y bandas de péptidos) contribuían a la calidad final de la carne. La capacidad predictiva de los modelos obtenidos se evaluó en términos del coeficiente de determinación (R^2),

raíz del error cuadrático medio de predicción (RMSEP) y la desviación residual predictiva I (RPD) que es la relación entre el error de predicción (SEP) y la desviación estándar de los valores de referencia (SD) y se utiliza para probar la precisión de los modelos de predicción.

Con el fin de determinar si los bioindicadores (variables bioquímicas y bandas/péptidos) incluidos en los modelos de regresión podrían ser utilizados para la discriminación de productos cárnicos en función del manejo del animal antes del sacrificio ("Mezcla" o "No-Mezcla"), se realizó un análisis discriminante mediante regresión por mínimos cuadrados parciales también conocida como regresión "dummy" con los perfiles bioquímicos/electroforéticos que resultaron significativos para predecir algún parámetro de calidad mediante la aplicación del software Unscrambler® (v 9.8, CAMO, Trondheim, Noruega). Así a las muestras de carne de cada nivel del tratamiento mezcla se le asignó un valor "variables dummy" (sin mezcla = 1, mezcla = 2) a continuación se realizó una regresión PLS (mínimos cuadrados parciales) para generar un modelo matemático que fue cross-validado para seleccionar los componentes PLS más relevantes. Según este modelo, una muestra de carne se clasificó correctamente como perteneciente a una categoría de manejo específica (sin mezcla/mezcla) si el valor predicho estaba dentro de $\pm 0,5$ del valor ficticio "dummy".

3. Resultados y discusión

3.1. Parámetros de calidad de la carne

El tratamiento de mezcla produjo un efecto significativo ($P = 0,009$) sobre el pH medido en el músculo SM a los 45 minutos post-mortem (pH45, Tabla 7), observándose una disminución más rápida del pH en los tratamientos con mezcla de animales, ya fuera mezcla en granja (MF-UTL) o mezcla en granja y también durante el transporte y la espera (MF-MTL), aunque el pH final (24 h) fue similar en todos los grupos analizados (pH24 = 5,5). Esto concuerda con los resultados obtenidos por Støier y cols. (2001), quienes encontraron que el manejo previo al sacrificio (tradicional vs aturdimiento con bajo estrés) producía variaciones significativas en el descenso del pH

en la carne de cerdo en las primeras 6 h post-mortem, aunque el pH muscular se igualaba a las 24 h post-mortem.

Rosenvold y Andersen (2003) demostraron que las cinéticas de pH y temperatura del músculo post-mortem influyen en la velocidad y el grado de desnaturalización, oxidación y proteólisis de las proteínas musculares así como en las características del color y en la capacidad de retención de agua de la carne.

En este experimento se observaba en los animales sometidos a tratamientos de mezcla (MF-UTL y MF-MTL) una mayor tendencia a producir carne más exudativa (es decir, con mayores pérdidas por goteo, $P = 0,157$) que en el tratamiento sin mezcla (UF-US), aunque dicha diferencia no fue significativa (Tabla 7). Esto podría deberse al pequeño tamaño de la muestra, pero también podría reflejar una gran variabilidad individual, especialmente en el grupo MF-UTL, en el que la desviación estándar excedió la media. Esta variabilidad individual podría deberse a diferencias importantes en cuanto a la susceptibilidad animal al estrés.

Esta diferente susceptibilidad explicaría las discrepancias encontradas en la literatura, habiendo trabajos que describen un efecto negativo del estrés previo al sacrificio sobre la calidad de la carne (Rosenvold y Andersen, 2003; Terlouw y cols., 2005), mientras que otros no encontraron efectos significativos (Warris y Brown, 1985; Costa y cols., 2002).

Tabla 7. Efecto del manejo sobre la calidad de carne

	UF-UTL	MF-UTL	MF-MTL	SEM	P
pH45	6,63±0,10 a	6,41±0,16 b	6,33±0,12 b	0,058	0,009
pH24	5,48±0,03	5,53±0,07	5,49±0,09	0,031	0,490
CE24 (mS)	4,25±0,29	4,53±0,83	5,23±1,22	0,389	0,226
Pérdidas por goteo (%)	1,26±0,60	2,92±3,35	4,56±2,70	1,122	0,157
L*	48,38±1,24	49,78±1,98	49,74±2,08	0,807	0,407

**Los resultados se muestran como medias \pm DS (desviación estándar); Por filas, los datos medios seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes para $P < 0,05$; SEM: error estándar de la media; CE: conductividad eléctrica*

3.2. Parámetros bioquímicos y fisiológicos

Los resultados medios para cada tratamiento de los parámetros bioquímicos y fisiológicos medidos en muestras de suero y músculo se presentan en la Tabla 8. Se puede observar que en la mayoría de los parámetros analizados no se encontraron diferencias significativas respecto a los distintos manejos de los animales, solamente se observan, en el caso de AAT a las 0 h post-mortem diferencias significativas ($P < 0,001$) siendo más elevada en el músculo de animales no sometidos a mezcla (UF-UTL = 19,55 mg de Trolox/mg de proteína) que en animales mezclados en granja (MF-UTL = 11,62 mg/mg) o mezclados en granja y durante el transporte y espera (MF-MTL = 12,40 mg/mg). Esto parece indicar que los animales procedentes del tratamiento sin mezcla presentan un tejido muscular con un estado oxidativo más saludable que los animales mezclados, probablemente debido a un nivel más bajo de estrés previo al sacrificio.

A pesar de que el manejo no influye significativamente sobre otras variables fisiológicas, si se observó un marcado aumento en las concentraciones de glucosa, haptoglobina y CK en el suero sanguíneo según aumentaba el nivel de mezcla en el manejo animal (UF-UTL <MF-UTL <MF-MTL) y también niveles más altos de triglicéridos e hidroxibutirato en el suero de animales procedentes del tratamiento de doble mezcla (en granja y previo al sacrificio: MF-MTL).

Estos resultados parecen indicar que el estrés social debido a la mezcla con animales extraños podría imponer una mayor demanda en el metabolismo energético, que se tradujo en niveles más altos de glucosa en sangre (debido a los efectos gluconeogénicos de los glucocorticoides, como encontraron Becker y cols. (1985), asociados con estrés animal durante el transporte), CK (marcador del músculo esquelético y buen indicador de actividad física intensa o daño tisular y fatiga (Knowls y Warris, 2000; De la Lama y cols., 2010)) y haptoglobina (bioindicador de estrés animal durante el transporte y marcador de inflamación (Saco y cols., 2003; Salamano y cols., 2008)).

Tabla 8. Efecto del manejo sobre parámetros bioquímicos en suero y músculo

	UF-UTL	MF-UTL	MF-MTL	SEM	P
Glucosa (mg/dL)	121,84±23,77	129,76±31,73	139,70±40,21	14,579	0,694
Colesterol (mg/dL)	100,68±8,69	91,78±8,43	92,90±17,08	5,406	0,470
Colesterol HDL (mM)	1,106±0,11	0,998±0,16	1,006±0,18	0,068	0,483
Colesterol LDL (mM)	1,568±0,12	1,468±0,11	1,450±0,29	0,086	0,596
Triglicéridos (mg/dL)	63,40±8,29	55,40±9,29	70,0±29,05	8,161	0,471
Lactato (mmol/L)	8,694±3,17	8,394±4,05	8,806±5,03	1,858	0,987
Proteína total (g/dL)	7,164±0,31	7,210±0,34	7,170±0,23	0,131	0,964
Haptoglobina (mg/mL)	0,096±0,03	0,126±0,06	0,210±0,24	0,066	0,470
Creatin quinasa (U/L)	1140,46±277,07	1444,28±682,39	1564,98±767,80	274,706	0,547
NEFAs (mmol/L)	0,558±0,10	0,496±0,14	0,592±0,21	0,070	0,625
Hidroxibutirato (mmol/L)	0,085±0,02	0,085±0,02	0,097±0,03	0,011	0,683
Glutatión peroxidasa (U/L)	6115,0±543,21	5649,6±138,39	5670,4±730,74	237,795	0,329
AAT (mg Trolox/mg prot)	19,550±3,19 a	11,619±2,36 b	12,395±2,73 b	1,243	0,001

*Los resultados se muestran como medias \pm DE (desviación estándar); Por filas, los datos medios seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes para $P < 0,05$; SEM: error estándar de la media; HDL: lipoproteína de alta densidad, LDL: lipoproteína de baja densidad, NEFA: ácidos grasos no esterificados; AAT: actividad antioxidante total.

3.3. Patrón electroforético de los extractos musculares

Los geles 1D SDS-PAGE permitieron la separación y cuantificación de un total de 27 bandas proteicas con pesos moleculares que van desde los 260 a 23 kDa (figura 19). La Tabla 9 recoge la identificación de las diferentes bandas proteicas observadas en los geles.

Conviene señalar que varias de las bandas analizadas (B1, B2, B8, B11, B17, B22, B23, B24 y B26) mostraron un descenso significativo en intensidad a lo largo del tiempo de maduración a independientemente del manejo. La mayoría de esas bandas se corresponden con proteínas con funciones estructurales y de mantenimiento del tejido muscular, por lo que su desaparición durante las primeras 24 h post-mortem

parece estar relacionada con la desorganización celular y la proteólisis que tiene lugar en el proceso de conversión del músculo en carne. Así por ejemplo la banda B1 (Isoforma 2 de Filamina-C), $P < 0,05$), los fragmentos de miosina B2 (miosina-2, $P < 0,001$) y B26 (cadena ligera de miosina "MLC1f", $P < 0.01$), B8 (transferrina, $P < 0.05$), B11 (albúmina, $P < 0,001$) y B22 (La proteína 1 de cuatro dominios y medio LIM isoforma C "FHL1C", $P < 0,001$), que se encuentran en la línea Z del músculo esquelético y cuya proteólisis se ha correlacionado con el debilitamiento de la línea Z durante la maduración de la carne (Morzel y cols., 2004).

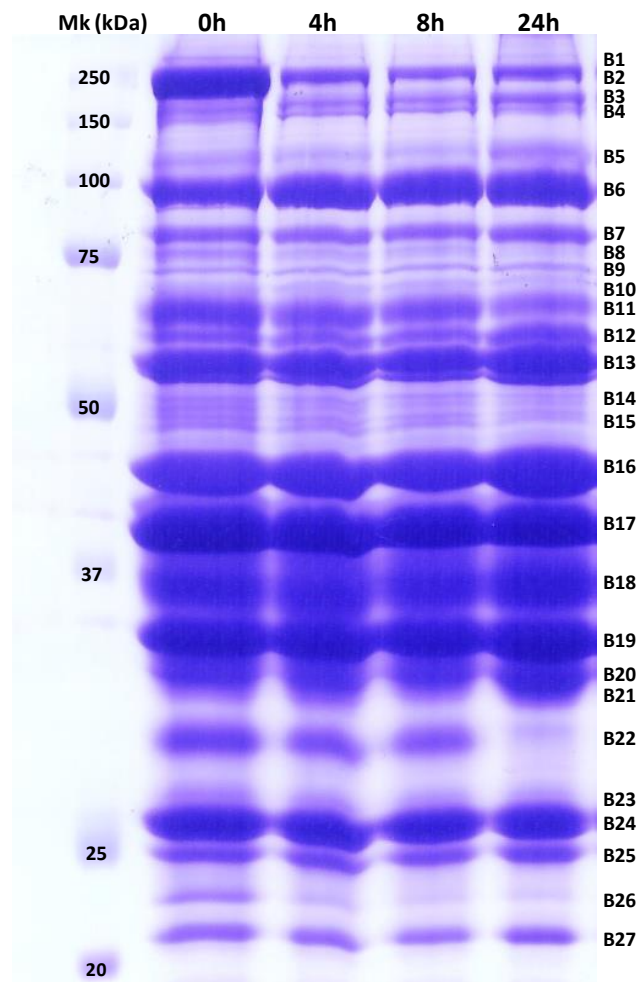


Figura 19. Imagen en gel 1D SDS-PAGE del extracto sarcoplásmico del tejido muscular a diferentes tiempos post-mortem (0h, 4h, 8h, 24h).

Dentro del grupo de proteínas con un patrón post-mortem decreciente también encontramos una proteína metabólica, B17 (creatina quinasa "CK", $P < 0,001$), relacionada con el metabolismo de la glucólisis. Este resultado concuerda con trabajos previos en los que se ha descrito una reducción más rápida de CK en la carne de cerdo de glucólisis rápida (Joo y cols., 1999; Ryu y cols., 2005).

En este grupo también encontramos las bandas B23 y B24 (Anhidrasa Carbónica 3 ($P < 0,01$ y $P < 0,05$ respectivamente), que es una enzima que cataliza la conversión rápida de dióxido de carbono y agua a bicarbonato y protones y que juega un papel importante en el secuestro de radicales libres protegiendo por tanto a las células de daños oxidativos. (Zimmerman y cols., 2004).

Por el contrario, algunas bandas de proteínas mostraron un patrón creciente con la maduración, como B5 (sarco/retículo endoplasmático Ca^{2+} -ATPasa 1 "SERCA 1", $P < 0,05$), relacionada con la translocación de calcio desde el citosol al lumen del retículo sarcoplásmico, y otras relacionadas con la vía de la glucólisis y el metabolismo de la conversión del músculo en carne, como B6 (glucógeno fosforilasa, $P < 0,001$), B7 (fosfofructoquinasa muscular 6, $P < 0,05$), B12 (fosfoglucomutasa-1 "PGM1", $P < 0,01$), B13 (PK "piruvato quinasa", $P < 0,001$), B16 (β -enolasa, $P < 0,001$), B18 (fructosa-bisfosfato aldolasa A, $P < 0,001$) y B20 (L-lactato deshidrogenasa cadena A "LDHA", $P < 0,001$), alguna de estas proteínas ya habían mostrado diferencias relevantes en estudios proteómicos previos en los que se comparaban en vacuno grupos extremos de terneza, indicando que estas proteínas pueden tener un papel relevante en los procesos de conversión de músculo en carne (Picard y cols., 2014). Además, la mayoría de estas proteínas se han relacionado con diferentes situaciones de degradación muscular o maduración de la carne, como β -enolasa (Chosa y cols., 2000; Lametsch y cols., 2003) o PK (Lametsch y cols., 2002; Sierra y cols., 2012).

El efecto del manejo (mezcla de animales) fue significativo en cuatro bandas proteicas: B10 (proteína de choque térmico 70kDa 1B "HSP70-1B", $P < 0,05$), B19 (GAPDH, $P < 0,05$), B20 (LDHA), $P < 0,001$) y B27 (Adenilato quinasa isoenzima 1 "AK1", $P < 0,001$).

La proteína HSP70-1A/1B ha sido relacionado con la vía anti-apoptótica y en la inhibición de la formación de EROS (Laufen y cols., 1999) además se sabe que actúa

como chaperona junto con la HSP40 para asegurar un buen funcionamiento del músculo en condiciones de estrés oxidativo (Guillemin y cols., 2011). En este estudio, la banda correspondiente a HSP70 mostró mayores intensidades en el músculo de los animales mezclados en la granja (MF-UTL), siendo las diferencias significativas a las 4 h post-mortem ($P < 0.01$).

Por el contrario, LDHA mostró menor intensidad en la carne de animales mezclados en granja (MF-UTL), siendo significativamente menor en estos a las 0 ($P < 0.01$) y 24 h ($P < 0.05$) post-mortem. De manera similar, la banda 19 correspondiente a GAPDH, enzima implicada en la glucólisis, mostró menor intensidad en la carne de animales sometidos a manejos con mezcla, tanto MF-UTL como MF-MTL.

Con respecto a AK1 (banda B27), que cataliza la transferencia reversible del grupo fosfato terminal entre ATP y AMP, se encontraron valores significativamente mayores en la carne del grupo de animales no mezclados (UF-UTL) a las 4 h ($P < 0.001$) post-mortem. En el músculo esquelético, AK1 juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis energética celular, por lo tanto su mayor intensidad en carne de animales no mezclados podría indicar que la mezcla de animales (MF-UTL y MF-MTL) produce desequilibrio en la homeostasis celular que conduce al agotamiento temprano y por lo tanto la disminución de AK1.

Tabla 9. Identificación de proteínas de bandas individuales de extractos sarcoplásmicos separados por 1D SDS-PAGE.

Banda (MWe ^a)	Identificación	Nº de acceso, ^b	Puntuación ^c		Consultas coincidentes	MWt ^e
			MOWSE	Cobertura de sec. ^d (%)		
B1 (316,5)	Filamina-C isoforma 2 [Sus scrofa]	gi 311275459	876	26	50	289,6
B2 (244,0)	Miosina-2 [Sus scrofa]	gi 55741490	899	20	33	223,9
B3 (184,5)	Enzima desramificante del glucógeno [Bos Taurus]	gi 300794727	600	23	33	176,2
B4 (162,2)	Proteína C de union a miosina, tipo rápido [Sus scrofa]	gi 335290041	628	35	32	128,4
B5 (113,1)	SERCA 1: Retículo Sarco/endoplasmico Ca ²⁺ -ATPasa 1 [Sus scrofa]	gi 324120946	831	33	30	110,4
B6 (95,1)	Glucogeno fosforilasa, isoforma muscular 1 [Sus scrofa]	gi 335281566	1140	57	44	97,7
B7 (82,5)	Fosfofructoquinasa 6 muscular [Sus scrofa]	gi 95117652	666	48	26	82,4
B8 (76,5)	Transferrina [Sus scrofa]	gi 833800	464	16	18	78,9
B9 (72,3)	Proteína de choque térmico 70kDa- 8 "HSP70-8" [Sus scrofa]	gi 345441750	683	45	22	71,0
B10 (68,7)	Proteína de choque térmico 70kDa 1B "HSP70-1B" [Sus scrofa]	gi 47523308	344	36	15	70,3
B11 (64,4)	Albúmina [Sus scrofa]	gi 833798	1020	53	27	71,4
B12 (60,2)	Fosfoglucomutasa-1 [Sus scrofa]	gi 350538593	751	41	19	62,0
B13 (56,4)	Piruvato quinasa isoenzima M1/M2 "PK" [Sus scrofa]	gi 335292434	826	50	28	68,5
B14 (51,6)	ATP sintasa subunidad alfa, mitocondrial [Sus scrofa]	gi 297591975	467	37	15	55,3
B15 (48,8)	ATP sintasa H+ transporte, mitocondrial F1 complejo subunidad beta "ATP5B"[Sus scrofa]	gi 89574051	297	54	14	47,1
B16 (44,8)	β-enolasa [Sus scrofa]	gi 113205498	757	70	23	47,4
B17 (40,3)	Creatina quinasa tipo M [Sus scrofa]	gi 194018722	851	65	23	43,3
B18 (37,2)	Fructosa-bisfosfato aldolasa A [Bos taurus]	gi 156120479	556	53	15	39,9
B19 (34,4)	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (fosforilada) "GAPDH" (EC1,2,1,12)-cerdo	gi 65987	736	53	13	35,9
B20 (32,8)	L-lactato dehidrogenasa cadena A "LDHA" [Sus scrofa]	gi 288860136	637	70	17	36,8
B21 (31,2)	Precursor Malato deshidrogenasa (EC 1,1,1,37), parcial [Sus scrofa]	gi 164541	207	12	12	32,2
B22 (29,7)	Cuatro y medio proteína LIM dominio 1 , isoforma C [Sus scrofa]	gi 47523806	566	67	19	35,6
B23 (27,4)	Anhidrasa carbónica 3 [Sus scrofa]	gi 56711366	277	60	14	29,7
B24 (26,4)	Anhidrasa carbónica 3 [Sus scrofa]	gi 56711366	655	57	20	29,7
B25 (25,4)	Triosafofosfato isomerasa 1 [Sus scrofa]	gi 262263205	872	77	17	26,9

B26 (24,0)	Cadena ligera de miosina MLC1f [Sus scrofa]	gi 117660874	556	57	18	21,0
B27(22,5)	Adenilato quinasa isoenzima 1 "AK1" [Sus scrofa]	gi 350579688	623	69	19	23,6

^a MWe: Peso molecular experimental (kDa); b: El número de acceso corresponde a la base de datos NCBI; c: puntuación MOWSE que es un descriptor numérico de la probabilidad de que la identificación sea correcta, Las puntuaciones de proteína mayores de 69 son significativas ($P < 0,05$); d: Porcentaje de cobertura de la secuencia de aminoácidos completa; MWt: Peso molecular teórico (kDa)

3.4. Relación entre los parámetros de calidad de la carne y las variables bioquímicas y electroforéticas

La Tabla 10 muestra el mejor modelo de predicción para cada parámetro de calidad de la carne (variable dependiente) y el tiempo de muestreo al que se ha obtenido, así como los biomarcadores incluidos en el modelo.

El pH45 se podía predecir adecuadamente ($R^2 = 0,961$, RPD = 2,25) a partir de los niveles séricos de colesterol LDL y triglicéridos (ambos relacionados con el metabolismo de las grasas) y la intensidad de algunas bandas proteicas, a las 4 h post-mortem, que juegan un papel importante en el metabolismo de nucleótidos de adenina (AK-1) y en la regulación de la glucólisis (PK y GAPDH). Esto concuerda con estudios previos que describen una gran influencia del estrés fisiológico sobre el metabolismo de los lípidos y el potencial glucolítico del músculo (Hambrecht y cols., 2005; White y cols., 2013).

En nuestro estudio, todas las variables significativas incluidas en el modelo de predicción para pH45 se correlacionaban positivamente, excepto PK que mostró una relación negativa, lo que indica niveles de esta enzima más altos en la carne con pH45 inferior, es decir, carne que muestra un metabolismo de glicolisis post-mortem más intenso o acelerado, lo cual concuerda con lo descrito previamente en carne de vacuno por nuestro grupo (Sierra y cols. (2012).

La mejor predicción de la medida de conductividad eléctrica (CE24), que refleja la exudación de la carne, se obtuvo justo tras el sacrificio del animal (0h) ($R^2 = 0,994$, RPD = 3,26) a partir de la presencia en los extractos musculares de algunos péptidos implicados en la contracción muscular y/o la síntesis/hidrólisis de ATP (miosina-2, SERCA 1, ATP-sintasa- α mitocondrial) combinada con los resultados de los metabolitos grasos en suero (NEFA, hidroxibutirato y triglicéridos), mostrando así una relación significativa entre la exudación de la carne (CE superior) y los cambios relacionados con la homeostasis metabólica, la desorganización de la estructura muscular así como el metabolismo de las grasas.

Para otras características fundamentales de la calidad de la carne estudiadas, como L* y las pérdidas por goteo también se consiguieron modelos de predicción significativos ($P < 0,001$) a partir de la presencia de ciertos péptidos detectados en el músculo a las 4h (goteo) o 24h (L*) post-mortem (Tabla 10), aunque con un porcentaje mejor de varianza explicada menor explicación de varianza ($R^2 < 0,85$) y con un RPD menor que 2, por lo que estos modelos no tienen garantías para ser utilizados con fines analíticos

Tabla 10. Modelos de regresión lineal múltiple para la predicción de la calidad de la carne (pH45, CE24, L*, pérdidas por goteo) basados en biomarcadores (variables bioquímicas en sangre y perfil electroforético de los extractos sarcoplásmicos) del músculo.

Variable dependiente	Predictores incluidos en el modelo (positivo "+" o negativo "-" contribución)	Tiempo Post-mortem	R^2 (sign.)	RPD	RMSEP
pH45	AK1(+)	4h	0,961 ^(***)	2,25	0,077
	Colesterol LDL (+)				
	PK (-)				
	GAPDH (+)				
EC24	Triglicéridos (+)	0h	0,994 ^(***)	3,26	0,272
	NEFAs (+)				
	SERCA 1 (+)				
	Miosina-2 (-)				
	Hidroxibutirato (+)				
	ATP sintasa subunidad alfa, mitocondrial (+)				
	Triglicéridos (+)				
ATP5B (+)					
L*	HSP70-8 (-)	24h	0,811 ^(***)	0,65	1,216
	Haptoglobina (+)				
	Anhidrasa Carbónica 3 (-)				
Pérdidas por goteo	Enzima desramificadora del glucógeno (-)	4h	0,828 ^(***)	1,83	1,439
	AK1 (-)				
	PK (+)				

CAPÍTULO 6: EFECTO DEL MANEJO EN GRANJA Y DE LA MEZCLA CON ANIMALES EXTRAÑOS COMO FACTORES DE ESTRÉS SOBRE EL PERFIL PROTEÓMICO MUSCULAR, LA AUTOFAGIA Y EL ESTRÉS OXIDATIVO Y SU INFLUENCIA EN LA CALIDAD DE LA CARNE DE VACUNO

1. Introducción

Las estrategias de manejo animal en granja y durante el transporte son factores que afectan considerablemente al estrés al sacrificio de los animales y que tienen efectos negativos sobre la calidad final de la carne (Gallo y cols., 2003; Apple y cols., 2005; Muchenje y cols., 2009; Peña y cols., 2014). De entre ellos el sistema de cría tiene especial relevancia, no solo por el efecto que los distintos constituyentes de la dieta tiene sobre la tasa de crecimiento y las características finales del músculo y por tanto de la carne (Priolo y cols., 2001; O'Sullivan y cols., 2004; Andersen y cols., 2005) sino también por cómo éstos pueden influir en la fisiología del animal, su comportamiento social y su respuesta al estrés (Bouissou y cols., 2001, Marco-Ramell y cols., 2012).

Las prácticas habituales de cría frecuentemente recurren a mezclas sociales y reagrupamientos animales. El ganado bovino se agrupa en rebaños en los que se establecen órdenes sociales con animales dominantes y otros sumisos. Por ello, mezclar grupos jerarquizados puede comprometer el bienestar animal, debido a que incrementa el estrés social, así como el comportamiento agresivo y las peleas (Craig 1989; Bouissou y cols., 2001; Disanto y cols., 2014). Además, la experiencia previa y el número y composición de animales sometidos a la mezcla pueden modular sus efectos (Boe y Faerevick, 2003).

Se ha demostrado que la mezcla con animales extraños tiene importantes efectos significativos en el comportamiento y la fisiología animal, generando en algunos casos una situación de estrés crónico (Chen y cols., 2015). También se ha descrito que mezclar animales desconocidos en los momentos previos al sacrificio produce agresiones entre animales, que pueden generar miedo y dolor y afectar al metabolismo post-mortem (Terlouw y cols., 2008).

Los efectos del estrés en la tasa de descenso post-mortem del pH muscular son bien conocidos en carne de ave y en cerdo, pero existe menos información relativa al vacuno (para una revisión más profunda del tema ver Terlouw y cols., 2008).

En la carne de vacuno, los defectos de calidad (carnes DFD) ocurren cuando hay una limitada acidificación post-mortem del músculo, que generalmente va ligada a unos

niveles bajos de glucógeno en el momento del sacrificio (Warris 1990; Muchenje y cols., 2009). Se sabe que la utilización del glucógeno en el músculo se produce rápidamente como consecuencia del incremento de adrenalina circulante o por alta actividad muscular (Tarrant 1989; Romero y cols., 2011). Además, el glucógeno es lentamente consumido en situaciones de ayuno. Por lo tanto, cualquier comportamiento o circunstancia ambiental que dispare este consumo de glucógeno puede causar una pérdida en la calidad de la carne si la situación estresante para el animal es mantenida el tiempo suficiente.

La exposición de los animales a factores de estrés pre-sacrificio inicia una cascada de reacciones fisiológicas que tienen un claro efecto en el metabolismo post-mortem muscular, que dependerá de la disponibilidad de ATP y de las reservas de glucógeno en el momento del sacrificio.

En el músculo tras la muerte del animal se sucede una situación de anoxia causada por el corte repentino del flujo sanguíneo (como consecuencia de la exsanguinación) lo cual reduce de forma drástica la producción de energía mitocondrial y que conduce a la acumulación de especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo, que poco a poco agotan los mecanismos de defensa celulares incapaces de recargarse sin la formación aeróbica de ATP (Lana y Zolla, 2015).

Llegados a este punto, las células musculares deben reaccionar en respuesta a al estrés, de tal modo que pueden disparar diferentes rutas de muerte celular como la apoptosis (Ouali y cols., 2006; Herrera-Mendez y cols., 2006) o la autofagia (García-Macia y cols., 2014; Rubio-González y cols., 2015). Dependiendo del programa de muerte celular que se produzca se activarán diversas proteasas en distinto grado, lo que puede afectar a la tenderización (Sierra y Oliván, 2013).

Trabajos previos de nuestro grupo han demostrado en porcino que el manejo de los animales (Intensivo vs Extensivo) y la mezcla previa al sacrificio con animales extraños produce incrementos del estrés oxidativo en el tejido muscular y dispara autofagia (Oliván y cols., 2014; Rubio-Gonzalez y cols., 2015), lo que influye en la conversión del músculo en carne. Además, la proteómica ha sido aplicada para la detección de cambios proteómicos dependientes de situaciones de estrés (Marco-

Ramell y cols., 2012; Franco y cols., 2015; Oliván y cols. 2016, 2018; Fuente-García y cols., 2019) afectando a proteínas relacionadas con las rutas metabólicas que influyen en la calidad final de la carne.

El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto del manejo en granja (Intensivo vs Semi-Extensivo) y la mezcla con animales extraños durante el transporte y espera previos al sacrificio (Mezcla vs NoMezcla) tiene sobre la evolución post-mortem de posibles biomarcadores del metabolismo muscular en la carne, sobre todo sobre las variaciones que se producen en los biomarcadores de glicólisis, autofagia y estrés oxidativo y su influencia en los procesos de adquisición de calidad de carne.

2. Material y métodos

2.1. Animales y manejo experimental

Veinticuatro terneros añejos de la raza "Asturiana de los Valles" fueron sacrificados entre los 13 y 15 meses de edad, con aproximadamente 500 kg de peso vivo. Los terneros se criaron con sus madres desde el nacimiento hasta el destete, se alimentaron durante el invierno con concentrado y paja de cebada *ad libitum* y fueron sometidos en primavera a dos tratamientos finales diferentes durante 100 días antes del sacrificio: 1) "Intensivo" [8 kg / día de concentrado (840 g kg⁻¹ harina de cebada, 100 g kg⁻¹ harina de soja, 30 g kg⁻¹ grasa, 30 g kg⁻¹ minerales, vitaminas y oligoelementos) + 2 kg / día de paja de cebada]. 2) "Semi-Extensivo" (pastoreo en pastizales de ballico y trébol + 3.5 kg / día de concentrado). Los animales del tratamiento Intensivo se manejaron en cuadra, en dos cubículos de 6x6 m (6m² por animal), y los animales del tratamiento Semi-Extensivo se manejaron al aire libre en dos parcelas de 1.5 ha (6 animales por parcela).

Durante la fase de manejo previo al sacrificio (6 horas antes del sacrificio) se aplicaron dos tratamientos diferentes: Mezcla (la mitad de los animales de cada tratamiento de granja se mezclaron con animales desconocidos de otros grupos) o

NoMezcla (el resto de los animales se mantuvieron en su grupo original durante las fases de transporte y espera antes del sacrificio).

2.2. Recogida de sangre

El sacrificio se realizó en un matadero comercial siguiendo los procedimientos aprobados por la UE. La sangre se extrajo en la exsanguinación en dos tubos de 10 ml, sin anticoagulante. El suero se obtuvo por centrifugación a 3000xg durante 15 min y se mantuvo en alícuotas a -80°C para el posterior análisis de los parámetros metabólicos.

2.3. Parámetros bioquímicos y fisiológicos de la sangre

La medición de los parámetros metabólicos séricos se determinó con kits comerciales. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado. Los biomarcadores analizados fueron:

- Hormona del estrés: Cortisol mediante el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), kit ADI-900-071 de Enzo Life Sciences (Suiza).
- Marcadores del metabolismo energético: Glucosa y Lactato por determinaciones enzimáticas-ultravioleta (R-Biopharm, Darmstadt, Alemania).
- Marcadores del proceso inflamatorio: Haptoglobina por ensayo colorimétrico (Ensayo de Fase de Haptoglobina, Tridelta Ltd, Maynooth, County Kildare, Irlanda), y Amiloide en suero por Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (Suero de fase Amiloide A, Tridelta Ltd, Maynooth, County Kildare, Irlanda).

2.4. Toma de muestras musculares y mediciones de calidad de la carne

Después del sacrificio y el faenado, las canales se llevaron a una cámara fría a 3°C dentro de las 2 h posteriores al sacrificio. Se tomaron muestras musculares (20 g)

del *Longissimus thoracis et lumborum* (LTL) de la mitad izquierda de la canal de cada animal al nivel de la 13ª costilla a las 2 h, 8 h y 24 h post-mortem para el análisis de biomarcadores de autofagia y estrés oxidativo y para la separación electroforética del extracto sarcoplásmico. Estas muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta que se analizaron.

A las 24 h posteriores al sacrificio, se midió la temperatura y el pH de la LTL a nivel de la 6ª costilla, utilizando un electrodo de penetración acoplado con una sonda de temperatura (InLab Solids Go-ISM, Mettler-Toledo S.A.E., Barcelona, España).

El color de la carne se midió en tres puntos de 10 mm de diámetro en la superficie de corte expuesta del músculo LTL al nivel de la 7ª costilla. Se tomaron indicadores de L*, a*, b*, Chroma ($C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$) y Hue ($\tan^{-1}b^*/a^*$) que fueron medidas con un espectrofotómetro Minolta CM-2300d, iluminant C (Konica Minolta Inc., Madrid, España) y se usó el valor promedio de tres puntos.

La pérdida por goteo de la carne (% de exudados) se determinó por duplicado en 50 g de muestras frescas tomadas a las 24 h post-mortem y colocadas en un recipiente especial (recolector de jugo de carne, Sarstedt, Alemania), de acuerdo con el método de Honikel (1998).

El resto del LTL se cortó en filetes de 3,5 cm de grosor, se envasó al vacío y se maduró en condiciones de refrigeración ($4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) a diferentes tiempos de maduración post-mortem (3, 7, 14 días). Después de la maduración, los filetes se congelaron y se almacenaron a -20°C para un posterior análisis de la dureza de la carne, que se midió mediante la prueba de WB en carne cocida a 75°C durante 30 minutos por inmersión en un baño de agua. Después de enfriar, se extrajeron ocho trozos de carne (1 cm^2 en sección transversal) y se sometieron a un corte perpendicular mediante una cuchilla de corte WB utilizando el Texturómetro TA.XT Plus (Stable Micro Systems, Londres, Reino Unido). Se registró el máximo peso (kg) requerido para la excisión total. Los resultados se expresan como el valor medio del peso máximo de WBSF para cada filete.

2.5. Mediciones bioquímicas musculares

Los extractos sarcoplásmicos musculares se obtuvieron de 0,5 g de muestras musculares homogeneizadas en tampón TES (Tris 10 mM [pH 7,6], EDTA 1 mM [pH 8,0], sacarosa 0,25 M y cóctel inhibidor de proteasa al 0,6%), utilizando un Polytron PT1200 E (Kinematica). Inc., Luzern, Suiza) dos veces durante 15 s a 20000 rpm. El homogeneizado se centrifugó (20 min a 13000 rpm) a 4°C y se recogió el sobrenadante. El contenido de proteína se midió mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando un espectrofotómetro.

El nivel de ATP de los extractos musculares se midió en extractos donde hubo mezcla de cada tratamiento (pool), utilizando el kit de ensayo bioluminiscente de adenosina 5'-trifosfato (ATP) (FLAA, Sigma-Aldrich). Este ensayo se basa en el consumo de ATP cuando la luciferasa de luciérnaga cataliza la oxidación de D-luciferina. El contenido de ATP se determinó por la medida de la emisión de luz con un luminómetro. Las concentraciones de ATP se expresan como nmol ATP / g de proteína.

La AAT se determinó en cada extracto de músculo utilizando el método ABTS / H₂O₂ / HRP (Arnao y cols., 2001, de Gonzalo-Calvo y cols., 2010). Los resultados se expresan como equivalentes de mg de Trolox / mg de proteína.

Las concentraciones de los productos finales de la LPO (MDA y 4-HNE) se determinaron en todos los extractos utilizando un kit de ensayo LPO (No. 437634; Calbiochem, San Diego, CA, EE. UU.) que se basa en la condensación del cromógeno 1-metil-2-fenilindol con MDA o 4-HNE. Los resultados se expresan como nmol (MDA + 4-HNE) / g de proteína.

2.6. Western Blot muscular

Los homogeneizados de tejido muscular (100 µg de proteína por muestra) se mezclaron con el tampón de carga Laemmli (1610737, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EE. UU.) Y se desnaturalizaron hirviendo a 100°C durante 5 min. Las muestras se fraccionaron utilizando geles de SDS al 12-14% (SDS-PAGE). También se

corrió un marcador de peso molecular (Precision Plus Protein All Blue Standards, BioRad) en las calles exteriores de todos los geles. Los geles de SDS-poliacrilamida se pusieron en un Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad) lleno de tampón de buffer (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS al 0,1%) y se conectaron a una fuente de alimentación básica PowerPac (Bio-Rad) a 200 V. La separación electroforética de proteínas se realizó a temperatura ambiente. Después de eso, los geles de SDS-poliacrilamida se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (Immobilon TM-P; Millipore Corp., Bedford, MA, EE. UU.) Que se activaron previamente en metanol (20847.295, VWR) y se equilibraron en un tampón de transferencia (25 mM Tris). Glicina 190 mM y metanol al 20%), utilizando un Mini Trans-Blot Cell System (BioRad) enfriado lleno con tampón de transferencia y funcionando a 100 V durante 180 min.

Las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con leche en polvo desgrasada al 10% (Bio-Rad) disuelta en solución salina tamponada con Tris (TBS) (Tris / HCl 50 mM (pH 7,5) y NaCl 150 mM). Posteriormente, las membranas se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios anti-Beclin1 (3738; Cell Signaling, Danvers, MA, EE. UU.) Y anti-cadena ligera 3 (LC3) (PD014; Medical & Biological Laboratories Co. Ltd, Naka- ku Nagoya, Japón), que se diluyeron previamente en tampón TBS que contenía leche en polvo desgrasada al 1% (Bio-Rad) durante la noche a 4°C bajo agitación continua. Después de tres lavados de 10 min (para Beclin1) y de 20 min (para LC3) en TBS-T (Tris / HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM y Tween-20 al 0,05%), las membranas se incubaron con la peroxidasa de rábano picante correspondiente al anticuerpo secundario conjugado (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE. UU.), que se diluyó en tampón TBS que contenía leche en polvo desgrasada al 1% (Bio-Rad), durante 2 horas a temperatura ambiente, seguido de tres lavados de 10 o 20 minutos en TBS-T.

En las membranas se utilizó un sustrato de peroxidasa de rábano picante quimioluminiscente (WBKLS0500; Millipore Corp., Darmstadt, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los niveles de proteínas se analizaron utilizando el software Image Studio Lite 3.1. Los resultados de densitometría se expresaron como densidad óptica semicuantitativa (unidades arbitrarias) de bandas de transferencia (de triplicados) normalizadas a Ponceau como control de carga.

2.7. Separación de proteínas sarcoplásmicas (SDS-PAGE) e identificación.

Los homogeneizados de tejido muscular (15 µg de proteína por muestra) se desnaturalizaron mezclando con tampón de muestra (Tris / HCl 65,8 mM, pH 6,8, SDS al 2%, glicerol al 21%, beta-mercaptoetanol al 5%, 0,026% de azul de bromofenol) y se calentaron a 95°C durante 4 min. Las muestras se cargaron en geles de placas verticales dobles de 1 mm (Mini-protean, Bio-Rad Laboratories Inc., CA, EE. UU.) Para SDS-PAGE, el gel de resolución contenía 11% y el gel de empaquetamiento 4% de acrilamida / Bis (30% de acrilamida), 10% (p / v) SDS, 1,5 M Tris / HCl pH 8,8, 0,5 M Tris / HCl, pH 6,8, 10% (p / v) Persulfato de amonio (diario fresco), 0,1% TEMED. Los geles se corrieron en un BioRad Mini-PROTEAN® Tetra Cell con tampón de buffer y las muestras se separaron electroforéticamente durante aproximadamente 3 horas a 150 V. El marcador de peso molecular preteñido (Precision Plus Protein™ All Blue Standards, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA) también corrió en cada gel para determinar los pesos moleculares de la banda de proteína. Después de correr, los geles se tiñeron (metanol al 50%, ácido acético al 10% y Coomassie coloidal de control de calidad) y luego se destiñeron con agua destilada. Se hicieron tres geles por muestra y se calculó el valor medio para cada animal con técnicas de análisis de imagen.

2.8. Análisis de imágenes e identificación de proteína

Las imágenes de gel teñidas se capturaron utilizando el ImageScanner UMAX (Amersham Biosciences). El análisis de densitometría de SDS-PAGE y la cuantificación de la banda se llevaron a cabo utilizando el software ImageQuant TL por medio de su herramienta de análisis de gel 1D (versión 7.0, GEHealthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). Para tener en cuenta las ligeras variaciones en la carga de proteínas, las bandas de proteínas de densidad se expresaron como abundancia relativa (volumen normalizado) y se expresaron en unidades arbitrarias.

Las bandas de interés se extrajeron manualmente de los geles y se enviaron para su identificación al laboratorio de proteómica de Inbiotec S.L. (León, España). Las proteínas se digirieron siguiendo el método de (Havlis y cols., 2003) y se procesaron para un análisis adicional según lo indicado por Jami y cols. (2010). Las muestras se analizaron con un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (MALDI-TOF / TOF) de desorción láser asistida por matriz de 4800 Proteomics Analyzer (ABSciex, MA, EE. UU.). Se utilizó una mezcla de calibración del analizador proteómico 4700 (Cal Mix 5, ABSciex) como calibración externa. Todos los espectros de MS se calibraron internamente utilizando péptidos de la digestión con tripsina. El análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF / TOF produjo huellas de masa peptídicas (PMF) y los péptidos observados se recopilaron y representaron como una lista de pesos moleculares monoisotópicos con una relación señal / ruido (S / N) superior a 20 utilizando la serie 4000 Software Explorer v3.5.3 (ABSciex). Todos los iones contaminantes conocidos (péptidos derivados de tripsina y queratina) se excluyeron para un análisis posterior de MS / MS. Por lo tanto, de cada espectro de MS, se seleccionaron los 10 precursores más intensivos con un S / N mayor que 20 para los análisis de MS / MS con CID (se usó gas atmosférico) en modo de reflector de iones de 2 kV y ventanas de masa de precursores de ± 7 Da.

La calibración por defecto fue optimizada para los espectros MS / MS. Para la identificación de proteínas, los archivos genéricos de Mascot que combinan los espectros PMF y MS / MS se crearon automáticamente y se utilizaron para interrogar una base de datos de proteínas no redundantes utilizando una licencia local de Mascot v 2.2 de Matrix Science a través del Servidor de proteínas globales v 3.6 (ABSciex). Los parámetros de búsqueda para PMF y espectros de MS en tándem obtenidos se establecieron de la siguiente manera: i) se utilizaron las bases de datos de secuencias NCBIprot 05-12-2017; ii) taxonomía: todas las entradas (20363435 secuencias, 6986060206 residuos); iii) se consideraron modificaciones fijas y variables (Cys-carbamidometilo y metionina oxidada); iv) se permitió un sitio de escisión perdido; v) la tolerancia del precursor fue de 100 partes por millón y la tolerancia del fragmento MS / MS fue de 0,3 Da; vi) carga peptídica: 1+; y vii) el algoritmo se estableció para usar tripsina como la enzima. Los candidatos a proteínas se consideraron válidos

cuando la puntuación global de Mascot fue mayor que 94 con un nivel de significación de $P < 0.05$.

2.9. Análisis estadístico de resultados

Los datos sin procesar se examinaron para detectar errores de entrada de datos y valores atípicos. Se analizó el efecto del manejo de animales en la granja “F” (Intensivo / Semi-extensivo) y durante el transporte y la espera “TL” (Mezcla / No mezcla) y su interacción (FxTL) en las características de calidad de la carne, las variables bioquímicas de la sangre y las variables proteómicas musculares fueron estudiadas por ANOVA utilizando el procedimiento GLM de SPSS v 15.0 2006, SPSS Inc, Chicago, EE. UU.).

La evolución post-mortem de los biomarcadores del metabolismo celular y el estrés oxidativo (ATP, AAT, LPO), del perfil proteómico del músculo y de la dureza de la carne (fuerza máxima de corte de Warner Bratzler) se analizó mediante GLM, incluyendo Granja (F), Transporte / Espera (TL), el tiempo de maduración (t) y sus interacciones como factores fijos y animal como factor aleatorio. Se estudiaron las diferencias significativas entre los tiempos post-mortem utilizando la prueba de Tukey a un nivel de significación de $P < 0,05$. Si los datos no alcanzaban normalidad, se aplicó la prueba no paramétrica de Friedman, seguida de la prueba post-hoc de Wilcoxon si se obtenían diferencias significativas.

El PCA se utilizó para estudiar las relaciones entre la calidad de la carne y la autofagia, y las variables bioquímicas y proteómicas estudiadas XLStat 2013 (Addinsoft Inc, París, Francia). El test de Kaiser-Meyer-Olkin se realizó para medir la adecuación del muestreo para cada variable en el modelo, y solo se seleccionaron las variables con KMO por encima de 0,6. La medida general de KMO del PCA realizada fue de 0,725.

3. Resultados y discusión

3.1. Parámetros bioquímicos y fisiológicos en sangre

Los resultados se muestran en la Tabla 11. Los animales del tratamiento Semi-Extensivo mostraron niveles significativamente más altos de cortisol ($P < 0,05$) y de suero Amiloide A (SAA) ($P < 0,001$). Se observó una tendencia similar para el lactato, que mostró valores más altos en animales procedentes del sistema Semi-Extensivo (0,79 vs 0,55), aunque la diferencia no fue significativa ($P = 0,078$). Estos resultados reflejan un mayor estrés y la consecuente respuesta de fase aguda de individuos criados en condiciones semi-extensivas, como una forma de restablecer la homeostasis o eliminar la causa de cualquier perturbación (Tothova y cols., 2014).

Desde un punto de vista diagnóstico, las proteínas de fase aguda más importantes en rumiantes son SAA y haptoglobina (Hp) (Eckersall y Bell, 2010). En este estudio, ambas proteínas séricas mostraron un patrón de respuesta diferente, siendo mayor en SAA ($P < 0,01$) en los animales procedentes del sistema semi-extensivo, mientras que la Hp sérica tuvo un valor promedio significativamente mayor ($P < 0,001$) en los terneros del tratamiento intensivo, debido al alto nivel de Hp de los animales de este tratamiento sometidos a mezcla social (Intensivo-Mezcla). De hecho, Hp es el único marcador para el que hubo un efecto significativo de mezclar animales desconocidos durante el transporte y la espera (aumentó en animales sometidos al factor de estrés social de mezcla, $P < 0,001$) y la única variable con una interacción significativa entre granja y tratamientos de transporte / espera ($P < 0,001$), que parecen reflejar una mayor susceptibilidad de los animales criados en interior, es decir, que se mantienen siempre en condiciones estables y rutinarias, al estrés social inducido por la mezcla con animales desconocidos.

Este grupo de animales del tratamiento combinado en Intensivo/Mezcla también mostró el nivel más alto de glucosa sérica en el sacrificio, lo que refleja un aumento de la actividad de glucogenólisis que podría ser el resultado de un mayor estrés en el sacrificio, aunque la diferencia no fue significativa (Tabla 11).

Sin embargo, el aumento de SAA en suero en animales criados en condiciones semi-extensivas (87,72 vs 17,65; $P < 0,01$) parece ser contradictorio, ya que la

producción al aire libre generalmente está relacionada con un mejor bienestar animal. Pero los cambios de SAA podrían tener diferentes interpretaciones. Se sabe que la SAA es inducida por la liberación de citoquinas como la interleucina-1 (IL-1), la interleucina-6 (IL-6) y el TNF- α de macrófagos y monocitos cuando hay lesiones o infecciones inflamatorias y, por lo tanto, es utilizado con éxito como marcador de inflamación sistémica, infección o lesión tisular (Jain y cols, 2011, Sevimli y Kus, 2015).

Sin embargo, la reciente identificación del músculo esquelético como un órgano endocrino expande el conocimiento de cómo el sistema inmunológico puede contribuir al mantenimiento de la homeostasis, especialmente cuando aumentan las demandas de energía. En este contexto, la mayor cantidad de SAA en suero en animales criados al aire libre podría producirse por una mayor liberación de interleucina-6 (mediador principal de SAA) por parte del músculo en respuesta al ejercicio prolongado, como se ha demostrado en estudios previos con humanos (Pedersen y Febbraio , 2008).

Tabla 11. Efecto del manejo de animales en granja y durante el transporte y espera en biomarcadores séricos.

Manejo en granja	Intensivo		Semi-Extensivo		Significación		
	UM	M	UM	M	Granja (F)	Transporte (TL)	FxTL
Cortisol (ng/ml)	123,27	209,78	329,28	291,97	*	NS	NS
Lactato (g/l)	0,423	0,686	0,719	0,856	NS	NS	NS
Glucosa (g/l)	1,030	1,304	1,128	0,987	NS	NS	NS
Amiloide A (μ g/ml)	21,849	13,451	89,882	45,549	**	NS	NS
Haptoglobina (mg/ml)	0,179	0,262	0,170	0,173	***	**	***

3.2. Canal y calidad de carne

No hubo un efecto significativo del manejo de los animales en granja (Intensivo/Semi-Extensivo) y durante el Transporte y la Espera (Mezcla/NoMezcla) sobre el pH muscular o la pérdida por goteo a las 24 h post-mortem, aunque hubo una interacción significativa entre estos factores (FxTL) en la pérdida por goteo de la carne,

debido a que mostró un aumento elevado en el músculo de los animales criados en interior (intensivo) debido a la mezcla social pero disminuyó en los animales criados al aire libre (semi-extensivo) (Tabla 12).

Hubo un efecto significativo del sistema de manejo en granja en las características del color de la carne, ya que el músculo de los animales acabados en pasto (sistema semi-extensivo) tenía un L^* significativamente menor ($P < 0,01$), a^* , b^* y C^* ($P < 0,001$) y mayor h^* ($P < 0,001$), es decir, era más oscuro y marrón que la carne de animales del sistema intensivo. Esto concuerda con las revisiones de Priolo y cols. (2001) y Dunne y cols. (2011), quienes concluyeron que la carne de vacuno alimentado con pasto era más oscura que la carne de animales alimentados con granos.

Varios factores pueden ser responsables de esto, principalmente relacionados con la dieta y el grado de ejercicio físico o por una combinación de ambos. Se sabe que la ingesta de forraje fresco aumenta la deposición de pigmentos naturales en el músculo, principalmente carotenoides (Vestegaard y cols., 1997; Prache y cols. 2005) que obviamente afectan el color de la carne (Priolo y cols., 2001). Además, el nivel más alto de algunos componentes como los ácidos grasos insaturados (en particular el ácido α -linolénico, C18: 3n-3), los antioxidantes (vitaminas C y E) y los minerales (manganeso) en las dietas de pastos pueden influir en las propiedades metabólicas del músculo, según lo descrito por Jurie y cols. (2006), quienes encontraron una mayor actividad de algunas enzimas oxidativas musculares cuando se dio pasto al ganado en comparación con el ensilaje de maíz.

Además, las propiedades musculares pueden cambiar como respuesta al ejercicio, debido a la alta plasticidad de las fibras musculares, es decir, la capacidad de cambiar de un tipo de fibra a otra (Aalhus y cols., 2009; Greaser y cols., 2001). Sin embargo, en este estudio, la duración del tratamiento de acabado (100 días) probablemente no fue lo suficientemente larga como para producir cambios significativos en la estructura de la fibra, aunque algunas diferencias metabólicas debido a la dieta (presencia de algunos componentes específicos y la ingesta de energía resultante) y el ejercicio podrían esperarse.

Tabla 12. Efecto del manejo de animales en granja y durante el transporte y espera en las principales características de calidad de la carne.

Manejo en granja	Intensivo		Semi-Extensivo		Significación		
	UM	M	UM	M	Granja (F)	Transporte (TL)	FxTL
pH24	5,48	5,52	5,50	5,44	NS	NS	NS
Pérdida por goteo (%)	1,60	2,24	2,20	1,70	NS	NS	**
L*(0)	41,46	39,68	36,60	38,12	*	NS	NS
a*(0)	18,87	23,86	9,29	9,13	***	**	***
b*(0)	9,95	13,65	7,63	7,43	***	**	**
C*(0)	21,34	27,51	12,09	11,84	***	***	***
h(0)	27,81	29,66	39,47	39,37	***	NS	NS
WB3d (kg)	9,13	12,04	11,54	10,91	NS	NS	*
WB7d (kg)	6,96	10,20	10,50	9,68	NS	NS	*
WB14d (kg)	6,37	7,76	9,47	8,81	***	,454	*

Con respecto a una característica clave de calidad, como la dureza de la carne, medida como resistencia máxima a la fuerza de corte de Warner-Braztler, encontramos que disminuyó a lo largo de los 14 días de maduración post-mortem (Tabla 12) a medida que avanzaba el proceso de tenderización de la carne y eso mostró una tendencia a ser más baja en el tratamiento intensivo, lo que concuerda con los informes anteriores de Vestergaard y cols. (2000) y Nuernberg y cols. (2005), aunque la diferencia entre los tratamientos fue significativa solo a los 14 días post-mortem, probablemente debido a la alta variabilidad individual dentro de cada grupo en tiempos de maduración más cortos.

Es importante tener en cuenta que hubo una interacción significativa FxTL en la dureza de la carne, porque el tratamiento mezcla incrementó la dureza de la carne en animales del tratamiento intensivo pero se redujo en los criados al aire. Esto concuerda con la interacción FxTL mencionada anteriormente en la SAA sérica y parece indicar que los animales criados en intensivo tenían menos capacidad para hacer frente a los factores de estrés previos al sacrificio.

3.3. Biomarcadores de energía celular, estrés oxidativo y autofagia

La disponibilidad de ATP en las células musculares disminuyó significativamente ($P < 0,05$) a lo largo de las primeras 24 h post-mortem ($P < 0,05$), como se muestra en la Figura 20, y fue significativamente menor ($P < 0,001$) en el músculo del grupo "intensivo-mezcla" que en cualquier otro tratamiento, que de nuevo parece estar relacionado con un mayor estrés de estos animales al sacrificio.

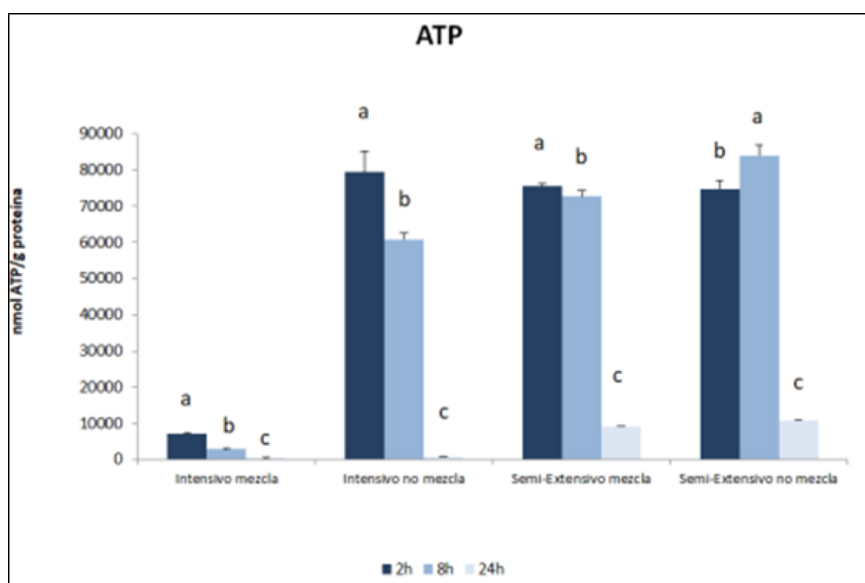


Figura 20. Efecto del tiempo post-mortem en la disponibilidad de ATP en el músculo

Las figuras 21 y 22 muestran los resultados de los biomarcadores de estrés oxidativo, es decir, la actividad antioxidante total del músculo (AAT), que es una medida global de toda su defensa antioxidante, y la LPO muscular que es un indicador del daño oxidativo.

No hubo efectos significativos del manejo de los animales en granja o durante el transporte y espera en la AAT muscular, aunque hubo una tendencia a ser mayor a las 24 h post-mortem en el grupo de animales del tratamiento de "Intensivo-Mezcla",

que mostró los valores medios más altos y también la variabilidad más alta (Figura 21) porque algunos animales mostraron valores extremos.

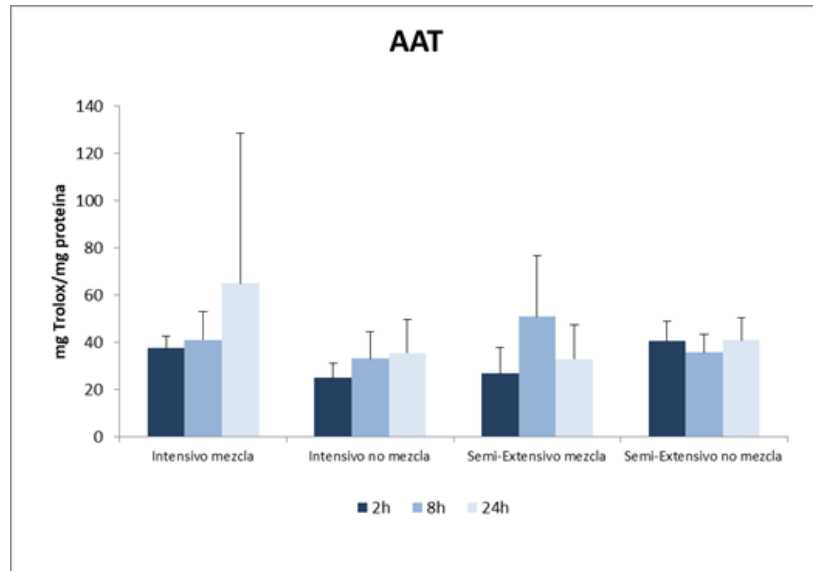


Figura 21. Efecto del tiempo post-mortem en la AAT muscular

Se observó una tendencia similar para la LPO (Figura 22), con valores y variabilidad más altos de los resultados a las 24 horas post-mortem en el grupo de "intensivo mezcla", que parece indicar una mayor susceptibilidad al estrés en el sacrificio en animales bajo este tratamiento. Se ha demostrado en estudios anteriores que el estrés psicológico al sacrificio provoca un aumento de los sistemas antioxidantes enzimáticos de las células musculares como una respuesta adaptativa para contrarrestar el aumento de la producción de EROs y que este proceso no podría contrarrestar el daño de lípidos producido (Caballero y cols., 2006; Rubio-González y cols., 2015; Potes y cols., 2017).

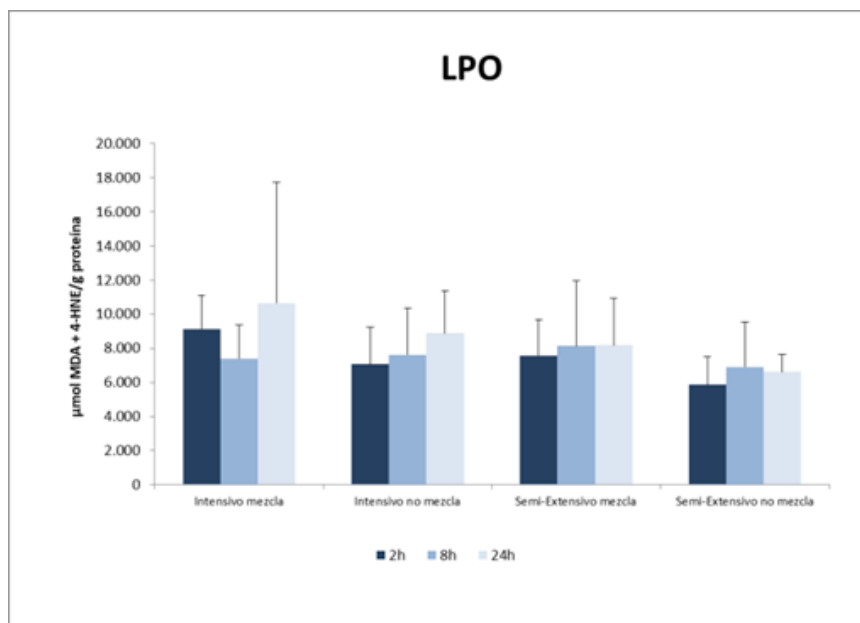


Figura 22. Efecto del tiempo post-mortem en la LPO muscular

Además, se sabe que, en respuesta a este desafío oxidativo, las células pueden desencadenar el recambio fisiológico de los orgánulos a través de la autofagia como un mecanismo que se activa en un intento por restaurar la homeostasis (Hollung y cols., 2014). En este estudio, las técnicas de inmunotransferencia permitieron detectar biomarcadores autofágicos (Beclin1, ratio LC3-II / LC3-I) (Figuras 23 y 24) en los extractos musculares bajo todas las condiciones estudiadas. Esto está de acuerdo con informes anteriores que demostraron que el estrés en el sacrificio junto con las condiciones anóxicas causadas por el corte repentino del flujo sanguíneo pueden inducir la autofagia como un mecanismo de supervivencia en el tejido muscular y que influye en el metabolismo muscular post-mortem (García-Macia y cols., 2014; Rubio-González y cols., 2015).

El análisis de inmunotransferencia también mostró que no hubo cambios significativos debido al manejo de los animales en granja (F) o durante el transporte y espera (TL), aunque hubo un patrón decreciente en la actividad de Beclin1 a lo largo de los tiempos estudiados (t = 2h, 8h, 24h) que fue significativo solo en el grupo de animales criados en condiciones semi-extensivas, por lo que hubo una interacción significativa F x t (P <0,001) debido a un nivel inicial más alto y un agotamiento más rápido de los biomarcadores autofágicos en las células musculares de toros criados al

aire libre. Esto podría reflejar las diferencias de la estructura de la fibra muscular y su defensa antioxidante, probablemente debido a la diferente dieta y nivel de ejercicio. Además, los animales criados al aire libre podrían tener diferente susceptibilidad al estrés debido a su exposición continua a una mayor cantidad de estímulos durante el período de cría en la granja, es decir, una mayor variabilidad de los estímulos debido a los movimientos humanos y mecánicos y ruidos.

Bajo estas condiciones, los animales podrían desarrollar una mayor resistencia a los nuevos eventos que desafían su capacidad de adaptación, mientras que los animales criados en interior mostraron una mayor susceptibilidad a cualquier cambio, incluido el estrés de mezclar animales desconocidos, y esa podría ser la razón de los cambios fisiológicos que producen un mayor consumo de ATP y bloqueo de la autofagia en el músculo post-mortem.

La ratio de conversión LC3-II / LC3-I, que es un indicador de autofagia, también mostró un patrón general decreciente durante las primeras 24 h post-mortem en todos los tratamientos estudiados, siendo este cambio significativo ($P < 0,05$) en animales no sometidos a mezcla social, es decir, los tratamientos "sin mezcla" (Figura 25), independientemente de si se criaron en interior o al aire libre. Esto indica una bajada en la autofagia en individuos sometidos a estrés al mezclarse con animales desconocidos, que fue más evidente en el grupo de toros criados en interior.

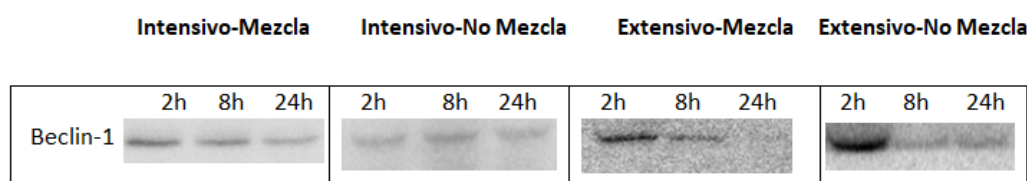


Figura 23. Western-Blot mostrando la evolución post-mortem de Beclin1 en el tejido muscular de las cuatro condiciones estudiadas.

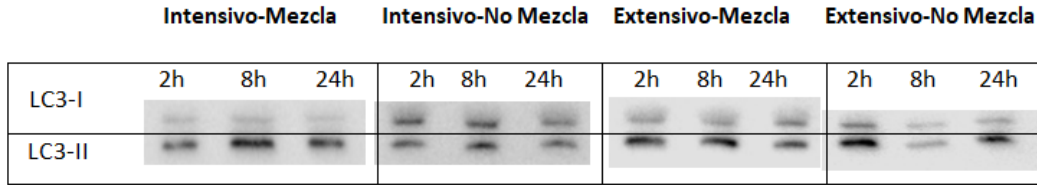


Figura 24. Western-Blot mostrando la evolución post-mortem de LC3-I y LC3-II en el tejido muscular de las cuatro condiciones estudiadas.

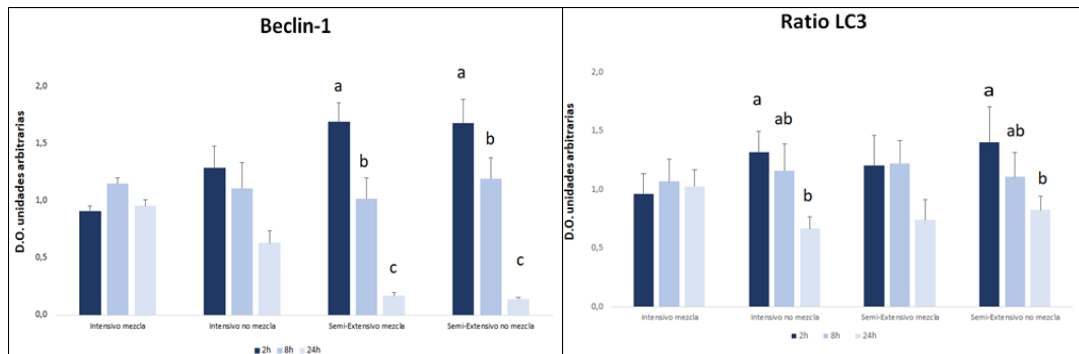


Figura 25. Evolución post-mortem de biomarcadores de autofagia (Beclin1 y ratio LC3II/LC3I) en la célula muscular.

3.4. Proteínas musculares

Se identificaron un total de 29 bandas de proteínas (200 a 21 kDa) mediante geles 1D SDS-PAGE, como se muestra en la Figura 26, donde los nombres de las bandas se indican con B, seguido de un número (1 a 29).

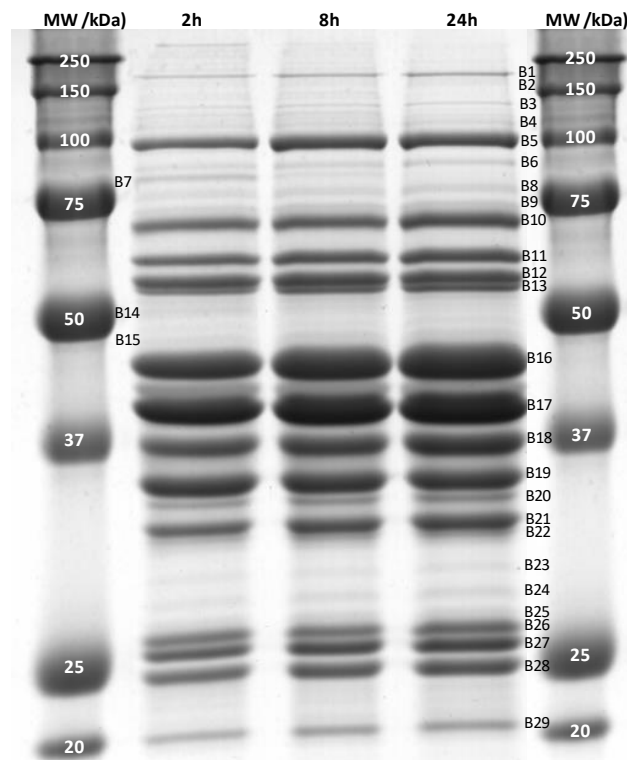


Figura 26. Imagen de gel de SDS-PAGE de un extracto sarcoplásmico del músculo LTL en diferentes tiempos post-mortem (2h, 8h, 24h). Los nombres de las bandas se indican con B seguido de un número.

La Tabla 13 proporciona la identificación y cuantificación de las bandas de proteínas con expresión diferencial entre tratamientos y el efecto de los factores principales (Granja, Transporte / Espera, tiempo post-mortem) y la única interacción significativa (FxLT).

Tabla 13. Efecto del manejo de animales en la granja y durante el transporte y la espera en el perfil de proteínas sarcoplásmicas del músculo

Código de banda	Identificación	MW (kDa)	Intensivo		Semi-Extensivo		Significación			
			UM	M	UM	M	F	TL	t	FxTL
B1:GDBE	Enzima desramificante del glucógeno [Bos taurus]	200,6	1,038	1,549	1,036	1,293	NS	***	NS	NS
B2: MYOM2	Miomesina 2 isoforma X2 [Bos taurus]	171,5	0,549	0,694	0,223	0,291	***	NS	NS	NS
B5: PYGM	Glucógeno fosforilasa muscular [Bos taurus]	98,4	4,939	6,597	4,418	4,686	***	***	*	**
B7: PFK	ATP Fosfofructoquinasa 6, muscular [Bos taurus]	81,9	0,893	0,858	0,712	0,866	NS	NS	***	NS

B8: TF	Precursor serotransferrina [Bos taurus]	79,4	1,030	1,174	1,098	1,267	NS	*	NS	NS
B10: ALB	Precursor seroalbúmina [Bos taurus]	68,8	4,650	3,882	4,894	5,110	***	NS	NS	**
B11: PGM1	Fosfoglucomutasa 1 [Bos taurus]	60,8	4,366	4,166	4,765	4,657	***	*	**	NS
B14: PKM	Piruvato quinasa isoforma X1 [Bos taurus]	52,2	1,104	1,393	0,993	1,208	NS	*	**	NS
B15: ENO3	β -enolasa "ENO3"	49,4	0,888	0,762	0,556	0,484	*	NS	NS	NS
B17: CKM	Creatin quinasa muscular [Bos taurus]	40,2	13,710	11,734	14,963	13,632	***	***	NS	NS
B18: ALDOA	Fructosa bifosfato aldolasa A [Bos taurus]	37,1	8,133	7,890	8,622	8,235	*	NS	NS	NS
B19: GAPDH	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa [Bos taurus]	34,7	9,131	8,110	8,200	7,878	*	*	***	NS
B23: GAPDH	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa [Bos taurus]	30,1	1,500	1,027	0,982	1,104	**	*	NS	***
B24: CKM	Creatin quinasa muscular [Bos taurus]	28,9	1,413	1,431	1,168	1,262	**	NS	NS	NS
B28: TPI	Triosa fosfato isomerasa [Bos taurus]	25,0	4,663	4,201	4,486	4,489	NS	**	NS	**
B29: AK1	Adelinato quinasa isoenzima 1 [Bos taurus]	21,3	2,613	2,531	2,811	2,799	***	NS	NS	NS

3.5. Efecto del manejo en granja

El sistema de manejo en granja tuvo un efecto significativo en la presencia de bandas B2 (Miomesina-2 isoforma X2 "MYOM2", $P < 0,001$), B5 (glicógeno fosforilasa "PYGM", $P < 0,001$), B10 (precursor de albúmina sérica "ALB", $P < 0,001$), B11 (Fosfoglucomutasa-1 "PGM1", $P < 0,001$), B15 (β -enolasa "ENO3", $P < 0,05$), B17 (Creatin quinasa muscular de 40 kDa "CKM-40", $P < 0,001$), B18 (fructosa bifosfato aldolasa "ALDOA", $P < 0,05$), B19 (gliceraldehido-3 fosfato deshidrogenasa de 35kDa "GAPDH-35", $P < 0,05$), B23 (gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa de 30 kDa "GAPDH-30", $P < 0,01$), B24 (creatina quinasa muscular de 29 kDa "CKM-29", $P < 0,01$) y B29 (Adenilato quinasa isoenzima 1 "AK1", $P < 0,001$).

De estos, MYOM2, el componente principal de la banda miofibrilar M con importantes propiedades mecánicas (Larissa Tskhovrebova y Trinick, 2012), mostró una mayor expresión (tres veces) en el músculo de los animales criados en intensivo, lo que podría estar relacionado con el nivel más bajo de ejercicio físico, comparado con animales del sistema semi-extensivo.

Otras proteínas con mayor presencia en el músculo de los terneros criados en Intensivo fueron los enzimas involucrados en la glucogenólisis muscular (PYGM), que proporciona glucosa cuando es necesario a través de la descomposición del glucógeno y los enzimas que regulan la glucólisis (ENO3 y GAPDH) que en conjunto muestran un mayor proceso catabólico de carbohidratos y mayor glucólisis en el músculo post-mortem de animales criados en interior, probablemente como una mayor demanda de energía debido a un estrés agudo en el sacrificio.

Además, el tratamiento Intensivo produjo una mayor presencia del fragmento más corto de CKM (29 kDa) y más bajo del fragmento más largo de CKM (40 kDa). La creatin quinasa es una enzima esencial que se encuentra en tejidos con fluctuaciones periódicas en los requisitos energéticos, como el músculo esquelético, y cataliza la transferencia reversible del gamma fosfato del ATP a la creatina formando fosfato de creatina (CrP) y ADP, El ciclo de creatina y CrP desempeña un importante papel homeostático, ya que la CKM cataliza la síntesis de ATP a partir de CrP y ADP cuando los requerimientos de energía son altos, y su mayor degradación en el músculo post-mortem de los animales criados en interior podría reflejar nuevamente un mayor estrés al sacrificio con el pico posterior de demanda de energía y un mayor estrés oxidativo, una respuesta más rápida de la CKM y un agotamiento más temprano de la respuesta homeostática. Otra proteína con un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis energética celular es AK1, que muestra niveles más altos en el músculo de los toros del sistema intensivo, que parece estar relacionado nuevamente con un mayor estrés previo al sacrificio.

El precursor de albúmina sérica (ALB) fue una proteína con menor presencia en el músculo de los animales del tratamiento intensivo (Tabla 13), junto con PGM1 y AK1. En humanos, se ha descrito que el 40% del ALB corporal total es intravascular, con el 60% restante distribuido en el espacio de varios órganos, principalmente músculo (Levitt y Levitt, 2016). A pesar de su fuerte carga negativa, ALB se une a una amplia gama de compuestos con carga positiva y negativa, lo que reduce su concentración libre y limita su actividad y distribución biológica, por lo tanto, ALB muestra una amplia variedad de funciones, incluyendo detección redox (Holderman y cols., 2002),

almacenamiento temporal de aminoácidos, mantenimiento de la presión osmótica y transportador de ácidos grasos libres (Ellmerer y cols., 2000).

PGM1 también mostró una menor presencia en el músculo de los animales criados en interior. Esta enzima regula uno de los puntos del tráfico metabólico de carbohidratos más importantes en el organismo eucariótico, catalizando la interconversión reversible de glucosa-1-fosfato y glucosa-6-fosfato, que son intermediarios importantes para el metabolismo de la glucosa y el glucógeno, pero su mecanismo de regulación es en gran parte desconocido. Esta enzima disminuye en la carne blanda en comparación con la dura (Picard y cols., 2010) y se ha encontrado que es más baja en la carne DFD, lo que podría deberse al agotamiento del glucógeno antes del sacrificio debido al estrés (Fuente-García y cols., 2019).

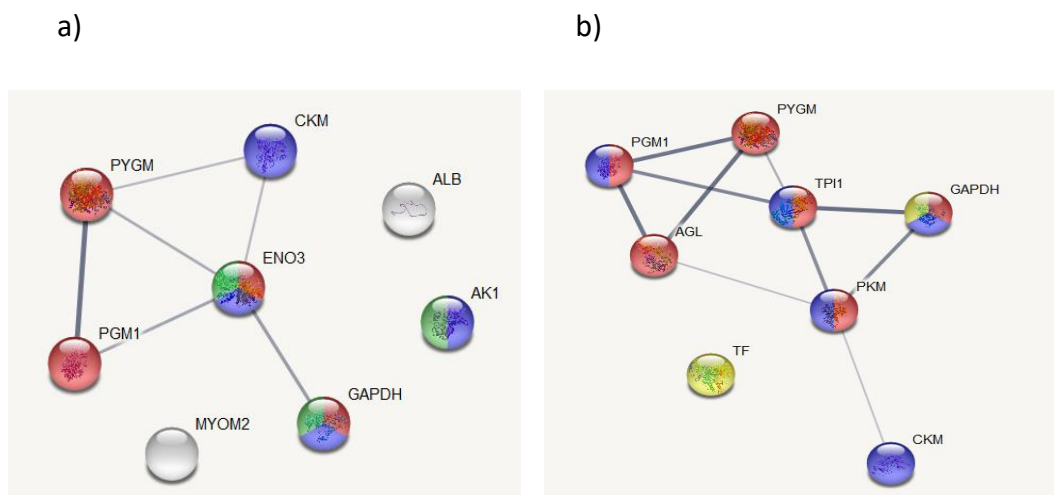


Figura 27. Análisis de interacción proteína-proteína realizado por String 11.0 de proteínas expresadas en el músculo *Longissimus* de la raza AV según los tratamientos de manejo: **a)** Manejo en granja, **b)** Mezcla de animales desconocidos. El grosor de la línea indica la contundencia con la base de datos. Los diferentes colores indican diferentes procesos biológicos: Rojo: Proceso catabólico de carbohidratos, Verde: Proceso metabólico de ATP (GO: 0046034). Azul: Fosforilación (GO: 0016310), Amarillo: Regulación de la estabilidad proteica (GO: 0031647). AGL es el código en String para GDBE.

La red de interacción proteína-proteína entre estas proteínas mostró cambios relacionados con el tratamiento en granja que se muestra en la Figura 27a, donde se observa un grupo principal de proteínas involucradas en el metabolismo catabólico de los carbohidratos (GO: 0016052) conectado a proteínas del proceso metabólico de ATP

(verde, GO: 0046034) y fosforilación (azul, GO: 0016310), siendo la ENO3 el centro del grupo mientras que las proteínas con funciones estructurales (MYOM2) y de unión (ALB) y la (AK1) con funciones relacionadas con el metabolismo energético y la homeostasis de nucleótidos de adenina permanecen fuera de la red de proteínas sin interacción entre estas proteínas y las otras, probablemente debido a la falta de información en la base de datos del programa para relacionar estas proteínas con el resto

3.6. Efecto mezcla de animales desconocidos

El tratamiento de mezcla afectó significativamente a B1 (enzima "GDBE" desramificante de glucógeno, $P < 0,001$), B5 (glucógeno fosforilasa "PYGM", $P < 0,001$), B8 (precursor de serotransferrina "TF", $P < 0,05$), B11 (Fosfoglucomatasa-1 "PGM1", $P < 0,05$), B14 (isoforma de la piruvato quinasa X1 "PKM", $P < 0,05$), B17 (Creatin quinasa muscular 40 kDa "CKM-40", $P < 0,001$), B19 (Gliceraldehido-3- fosfato deshidrogenasa de 35 kDa "GAPDH-35", $P < 0,05$), B23 (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa de 30 kDa "GAPDH-30", $P < 0,05$) y B28 (triosfosfato de isomerasa "TPI", $P < 0,01$).

GDBE es una enzima que facilita la descomposición del glucógeno, que sirve como almacén de glucosa, a través de la actividad glucosiltransferasa y glucosidasa. Tanto GDBE como PYGM movilizan las reservas de glucosa de los depósitos de glucógeno, y su sobreexpresión en los tratamientos de mezcla de animales indica el aumento de la demanda de energía y la movilización de glucógeno debido al estrés agudo en el sacrificio, Razón similar puede explicar el aumento de TF en estos tratamientos. Las transferrinas son proteínas transportadoras de unión al hierro que son responsables del transporte de hierro a esos sitios de almacenamiento y utilización, por lo que debe esperarse una mayor presencia cuando hay una mayor demanda energética. También, la PKM mostró una mayor presencia en el músculo de los animales del tratamiento de mezcla, lo que indica un mayor metabolismo glucolítico post-mortem debido al estrés, como se encontró anteriormente en la carne de cerdo (Oliván y cols., 2016) y la carne de vacuno (Sierra y cols., 2012).

Las proteínas con menor presencia en animales sometidos al tratamiento de mezcla fueron PGM1, CKM-40, GAPDH-35, GAPDH-30, y TPI, es decir, aquellos enzimas del metabolismo de carbohidratos (glucogenólisis, glucólisis) que podrían agotarse en el músculo post-mortem debido al aumento de la demanda energética durante la fase de transporte y espera con animales desconocidos.

La red de interacción proteína-proteína afectada por el tratamiento de mezcla se muestra en la Figura 27b, donde se aprecia un grupo principal de proteínas involucradas en el metabolismo catabólico de carbohidratos (en rojo, GO: 0016052), unidas a proteínas relacionadas con la fosforilación (en azul, GO: 0046034), que es un mecanismo regulador importante y la modificación post-traducciona más abundante.

3.7. Efecto del tiempo post-mortem

Algunas bandas de proteínas mostraron un aumento de la intensidad a lo largo del tiempo post-mortem estudiado (2 a 24 horas), como PYGM y PGM1, lo que parece reflejar un aumento de la demanda de glucogenólisis en el tejido muscular a lo largo de las primeras 24 horas post-mortem, como un intento de obtener energía para mantener el metabolismo muscular. Es importante mencionar que los niveles de PYGM fueron más altos en el tratamiento intensivo-mezcla que en el resto de los grupos y no cambiaron a lo largo del tiempo.

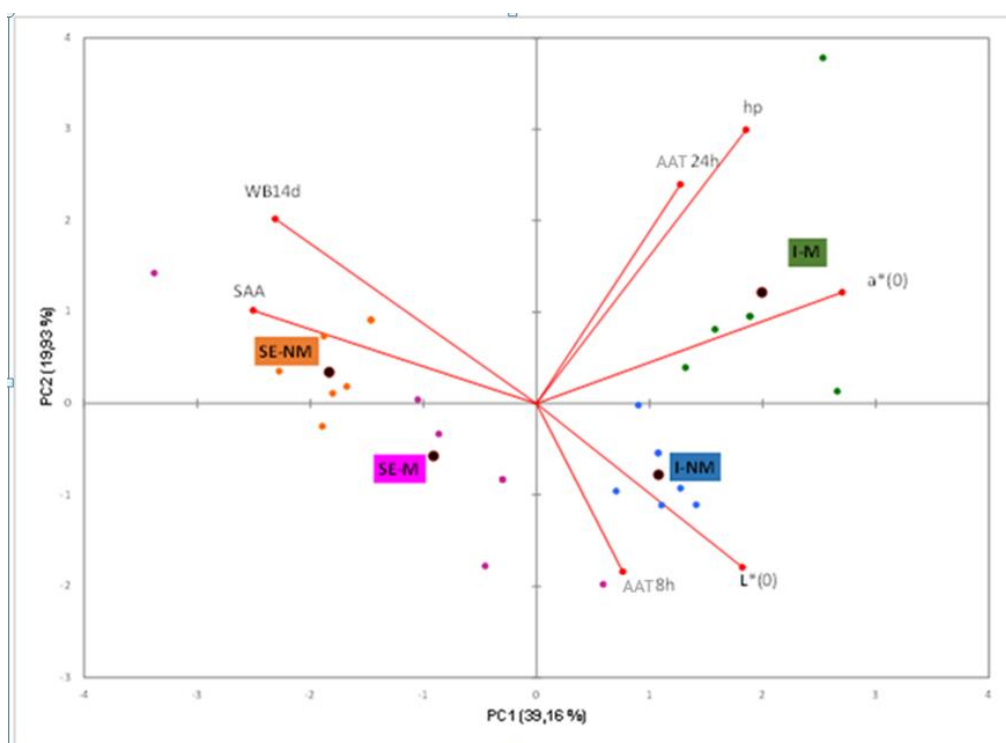
Sin embargo, las enzimas de la vía glucolítica, como PFK, PKM y GAPDH-35, mostraron un patrón decreciente a lo largo del tiempo post-mortem estudiado, lo que probablemente refleja una disminución de la glucólisis y el agotamiento y degradación de las enzimas debido al sustrato continuo (glucosa), agotamiento y desorganización celular.

3.8. Análisis multivariante

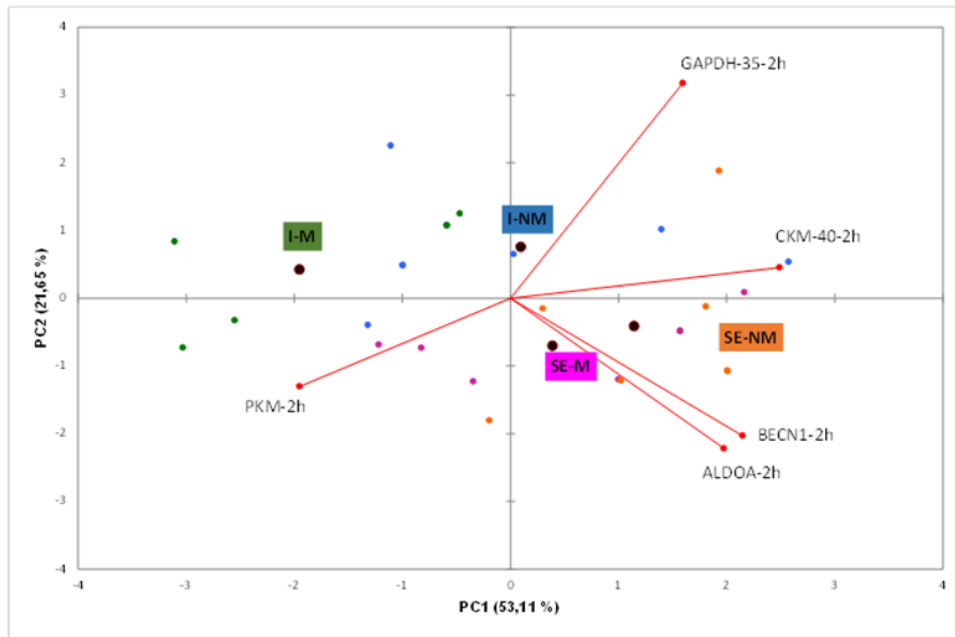
Se aplicó un análisis multivariante para obtener una visión global de las complejas relaciones entre variables que mostraron diferencias significativas entre los

tratamientos, incluyendo solo aquellos que encajan para el modelo ($KMO > 0,5$). Se realizaron tres análisis de componentes principales, incluyendo diferentes parámetros: 1) biomarcadores de suero y características de calidad de la carne; 2) proteínas musculares medidas en el post-mortem muy temprano (2 h), y 3) proteínas musculares medidas después de la desorganización celular (24 h).

A)



B)



C)

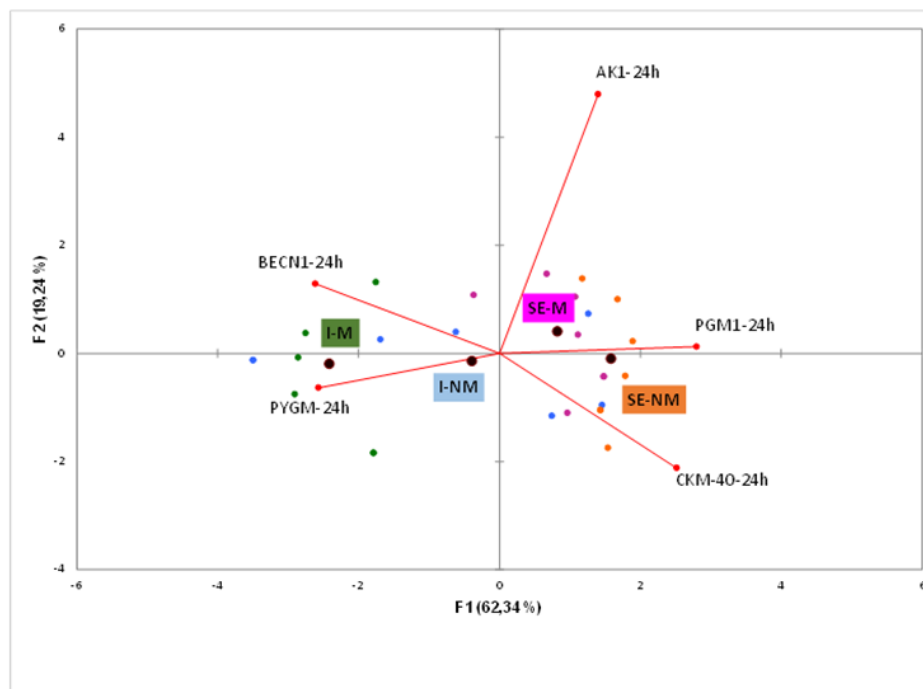


Figura 28. Análisis de diagramas de dispersión biespaciales de componentes principales de tratamientos: I-M (Intensivo-mezcla), I-NM (Intensivo-no mezcla), SE-M (Semi-extensivo-mezcla y SE-NM (Semiextensivo-No mezcla); y variables: A) biomarcadores séricos y características de calidad de la carne, B) proteínas musculares medidas en el post-mortem muy temprano, 2 horas después del sacrificio y C) proteínas musculares medidas después de la desorganización celular (24 horas).

Los diagramas de dispersión biespaciales obtenidos por PCA describen la relación entre las variables medidas y los tratamientos. El primer PCA (Figura 28A) correlaciona los biomarcadores séricos y las características de calidad de la carne y explicó el 59,1% de la variabilidad total de los datos. En este PCA, el primer componente (PC1) discrimina claramente entre las muestras de carne del sistema intensivo, con resultados de factores positivos relacionados con una mayor L^* y a^* , y las muestras de carne del sistema semi-extensivo, con valores negativos, mostrando mayor dureza y SAA sérica. El segundo componente (PC2) se separó claramente dentro del tratamiento intensivo, las muestras de carne del tratamiento de mezcla (I-M) con Hp sérico más alto y AAT alta a las 24 h, y las muestras de los individuos del grupo de no mezcla (AAT más alta a las 8h). Sin embargo, las muestras de semi-extensivo formaron un grupo, ya que el efecto de mezclar animales desconocidos no mostró diferencias significativas entre las muestras en sus características principales, lo que parece reflejar una mayor resistencia de los animales criados al aire libre y una mejor adaptación al estrés social antes del sacrificio. Esto concuerda con los resultados anteriores en cerdos que demuestran que los animales criados al aire libre responden de manera diferente al estrés asociado con el transporte que los animales crecidos en interior, lo que indica una capacidad diferente para hacer frente a ambientes desconocidos (Arroyo y cols., 2019).

El diagrama de dispersiones biespaciales del modelo de PCA hecho con el perfil proteico muscular obtenido a las 2 h post-mortem (Figura 28B) explicó el 74,76% de la variabilidad de los datos. En este modelo, el primer PC separó las muestras de músculo de los animales del tratamiento de intensivo-mezcla (resultados negativos de resultados positivos), mostrando mayor PKM, enzima que actúa en el último paso de la glucólisis y menor CKM-40 y GAPDH-35, enzimas utilizados para el metabolismo energético y de los carbohidratos que podrían agotarse debido a la mayor demanda de energía antes del sacrificio. Las muestras de carne del tratamiento semi-extensivo mostraron un mayor BECN1, lo que indica el desencadenante de la autofagia como una forma de respuesta de las células musculares a los cambios derivados del proceso de sacrificio.

Finalmente, el diagrama de dispersión biespacial del modelo de PCA calculado con el proteoma muscular analizado a las 24h post-mortem (Figura 28C), es decir, después de la desorganización celular, explicó con dos PC el 81,5% de la variabilidad de los datos. El primer PC explica el 62% de la variabilidad de las muestras con una clara discriminación entre los tratamientos Intensivo y Semi-Extensivo. A las 24 h post-mortem, la carne de los animales criados en Semi-Extensivo se relacionó con las bandas de proteína AK1, CKM y PGM1, mientras que las muestras de Intensivo aparecieron con resultados negativos y se relacionaron con PYGM y Beclin1-24h, lo que indica una autofagia retardada en el músculo post-mortem de estos animales.

En definitiva, los resultados de este estudio indican mayor estrés al sacrificio en los animales criados en Intensivo y sometidos a Mezcla con animales extraños (mayor concentración de haptoglobina en sangre, reducción rápida del ATP muscular post-mortem y disparo de la actividad antioxidante total), especialmente en algunos individuos, que mostraron datos extremos. El manejo en Granja influyó sobre la calidad de la carne de vacuno (más clara, roja y tierna en Intensivo) y sobre la susceptibilidad animal al estrés en el momento del sacrificio (mayor en Intensivo), observándose cambios en el proteoma muscular que afectaron a proteínas estructurales (MYOM2) y otras relacionadas con la homeostasis celular (AK-1), el transporte y almacenamiento (ALB), el metabolismo energético (PYGM, PGM1, ENO3, CKM, ALDOA, GAPDH) y la autofagia (Beclin1). La Mezcla con animales extraños produjo un agotamiento más rápido de la energía muscular y cambios en proteínas del metabolismo energético (GDBE, PYGM, PGM1, PKM, GAPDH, CKM, TPI), proteínas de transporte (TF) y la autofagia (relación LC3-II/LC3-I).

CAPÍTULO 7: DISCUSIÓN GENERAL

Esta Tesis aborda el estudio del efecto de distintos factores de manejo del ganado sobre el estrés animal en el momento del sacrificio y sus implicaciones en el proceso de conversión del músculo en carne y en la calidad final del producto. Se ha realizado un estudio exhaustivo, enfocado en el análisis proteómico, de posibles biomarcadores presentes en el tejido muscular que pueden servir para la predicción de la calidad cárnica, tanto en porcino como en vacuno.

Este trabajo ha formado parte de un estudio multidisciplinar, en el que han participado investigadores de distintas entidades científicas, nacionales e internacionales, a través del desarrollo de tres proyectos de investigación del Plan Nacional (AGL2010-21578-C03-02, AGL2011-30598-C03-03, RTA2014-00034-C04-01) que han dado lugar a diversas publicaciones, de las cuales, parte están recogidas en los capítulos de esta Tesis y otras complementan dicho estudio (Rubio-González y cols., 2015; Carreras y cols., 2015; Valent y cols., 2017; Arroyo y cols., 2019, Fuente-García y cols., 2019).

El estudio del estrés animal es difícil debido a la complejidad de las distintas situaciones intrínsecas y extrínsecas del animal que pueden ocasionar estrés físico y/o psicológico. De hecho, a día de hoy ni siquiera hay una definición precisa de “estrés animal”, que algunos expertos describen como “el estado fisiológico y psicológico y el comportamiento del animal cuando se enfrenta con una situación que, desde el punto de vista del animal, es potencialmente peligrosa” (Terlouw, 2005). Hay que tener, por tanto, en cuenta que el nivel de estrés del animal depende indirectamente de la situación y directamente de la evaluación que el propio animal realiza de la situación. Esto dificulta enormemente la predicción del efecto del estrés sobre cada individuo, por ese motivo, los científicos muestran un interés creciente por la identificación de biomarcadores de estrés basados en medidas individuales.

Hasta la fecha, se han utilizado como indicadores de estrés ciertos biomarcadores séricos, fundamentalmente moléculas resultantes del metabolismo, hormonas y biomarcadores de estrés oxidativo y de inflamación sistémica, aunque presentan el inconveniente de que pueden confundirse con el efecto de traumas o infecciones subclínicas no detectadas. Por otro lado, estos análisis precisan la

obtención de una muestra de sangre en vivo o en el momento del sacrificio, lo que no resulta viable para la industria cárnica, que sin embargo tiene un creciente interés por el desarrollo de métodos que permitan una identificación temprana de carnes con defectos de calidad, en muchas ocasiones producidas por estrés al sacrificio.

En este campo, la proteómica es una herramienta muy prometedora para los científicos de la carne, ya que permite describir y conocer los mecanismos moleculares y bioquímicos que participan en la transformación del músculo en carne. Los avances tecnológicos permiten analizar simultáneamente cientos de proteínas e incluso investigar sobre proteínas o péptidos no analizados hasta la fecha, lo que proporciona información novedosa y relevante.

Actualmente, se está trabajando activamente en la aplicación de la proteómica en estudios de calidad de la carne, especialmente para la identificación de biomarcadores de parámetros básicos de calidad, como son el color y la ternura. En este sentido, destacan los trabajos realizados por el equipo de Picard en el INRA (Francia), que se han centrado principalmente en aplicaciones de la proteómica para predecir parámetros fundamentales de calidad de la carne como son la ternura (Gagaoua y cols., 2015, Picard y Gagaoua, 2017) y el color (2017).

La mayoría de estos estudios se han realizado mediante la comparación de grupos extremos en cuanto a calidad (p.ej. carne dura vs carne tierna), utilizando distintos métodos proteómicos, lo que les ha permitido desarrollar una lista potencial de biomarcadores de ternura de la carne, que clasifican en 8 grupos funcionales (proteínas de choque térmico, metabolismo glicolítico, metabolismo oxidativo, proteólisis, proteínas del citoesqueleto, estrés oxidativo, apoptosis y transporte y señalización), tal y como muestra el esquema (Figura 29).

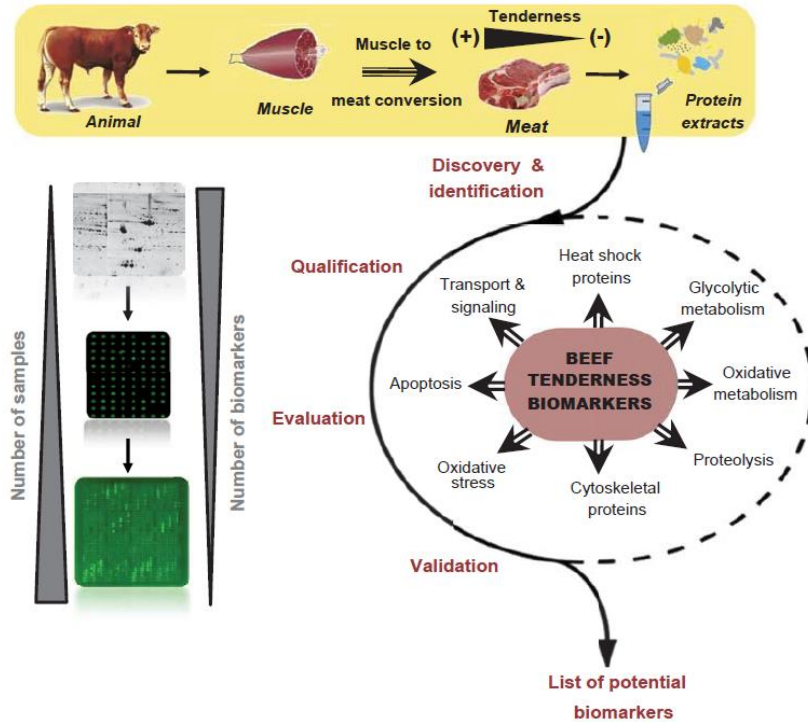


Figura 29. Flujo de trabajo de la estrategia que se utiliza para el estudio proteómico de biomarcadores de calidad de la carne.

También hay algunos trabajos que han estudiado cambios en el proteoma muscular relacionados con el estrés (Marco-Ramell y cols., 2012, 2016b; Franco y cols., 2015), identificando como posibles biomarcadores en el tejido muscular determinadas proteínas estructurales del músculo esquelético (cadena ligera de miosina 2), proteínas de fase aguda y enzimas del metabolismo glucolítico.

El estrés animal altera las funciones metabólicas y la homeostasis celular y produce un agotamiento de los recursos celulares. Esto produce inevitablemente cambios en el metabolismo post-mortem muscular, que pueden afectar a distintos tipos de rutas metabólicas. En esta Tesis Doctoral se ha abordado el estudio del proteoma muscular contenido en la fracción sarcoplásmica del tejido muscular, elegido por la mayoría de los científicos ya que contiene la mayor parte de los enzimas metabólicos (Hollung y cols., 2007), aunque otros estudios utilizan extractos totales (Franco y cols., 2015), que son más complejos, lo cual dificulta las comparaciones entre los distintos resultados. Otro aspecto que limita la comparativa entre estudios son las

distintas técnicas electroforéticas disponibles, así como las distintas opciones utilizadas para el análisis bioinformático de los resultados.

Los resultados obtenidos en esta Tesis nos han permitido identificar, en ganado porcino y vacuno, cambios significativos de algunos de estos biomarcadores en situaciones de manejo en las que se incluía algún factor de estrés, tanto intrínseco (sexo, genotipo, sesgo cognitivo) como extrínseco (sistema de cría, mezcla con animales extraños). Para facilitar la discusión de los resultados y siguiendo la metodología utilizada por la comunidad científica, los hemos clasificado en los siguientes grupos:

- Marcadores fisiológicos: Séricos y Cerebrales
- Metabolismo energético muscular
- Proteínas de choque térmico
- Estrés oxidativo
- Proteínas estructurales.
- Proteínas de mantenimiento de la homeostasis celular
- Proteínas de transporte, señalización y almacenamiento
- Muerte celular programada (autofagia, apoptosis)

Biomarcadores de estrés en ganado porcino:

En los experimentos realizados con ganado porcino, hemos podido comprobar el papel relevante que determinados factores intrínsecos (sexo, genotipo, sesgo cognitivo) tienen sobre la susceptibilidad animal al estrés y su relación con la calidad de la carne. En ningún caso el factor de estrés utilizado en el manejo animal fue tan elevado como para producir carnes con problemas de calidad, que en el caso del porcino se caracterizan por tener un descenso del pH muscular post-mortem más acelerado y producir carnes pálidas y exudativas (tipo PSE: Pale, Soft, Exudative). Esto se debió a que en nuestros estudios los factores de estrés estudiados cumplían con la normativa vigente en términos de bienestar animal, con lo cual los cambios en la susceptibilidad animal al estrés se tuvieron que monitorizar a través de los

biomarcadores fisiológicos en sangre (metabolitos, hormonas, marcadores de inflamación) y en el cerebro (neurotransmisores).

A pesar de no tener situaciones extremas de estrés, los estudios realizados nos han permitido definir claramente ciertos factores que influyen sobre la susceptibilidad del animal al estrés y los cambios que se producen en el metabolismo muscular y cómo afectan al proceso de conversión del músculo en carne. Así, en los estudios realizados en porcino hemos podido comprobar los cambios producidos en el proteoma muscular a lo largo de las primeras 24 h post-mortem, que incluyen proteínas o fragmentos peptídicos relacionados con la estructura y composición de las fibras musculares, el metabolismo energético (glucogenolisis, glucólisis), la homeostasis celular y la defensa antioxidante del músculo.

Dentro de las variables proteómicas destacan cambios en el perfil de proteínas sarcoplásmicas musculares que juegan un papel crucial en la regulación de la glucólisis, como la PKM y GAPDH, lo cual coincide con resultados de estudios previos realizados en vacuno y porcino (Sierra y cols., 2012; Ouali cols., 2013; Marco-Ramell y cols., 2016b) y el mantenimiento de la homeostasis celular (AK1). También han resultado significativos los cambios en ENO3 y fosfoglucomutasa, lo que indica una regulación coordinada de las enzimas glucolíticas durante la hipoxia (Wulff y cols., 2012). En nuestros experimentos, tanto al estudiar el efecto del sexo y del genotipo, como la mezcla con animales extraños, los enzimas glucolíticos en el tejido muscular post-mortem tienden a incrementarse debido al estrés pre-sacrificio, que dispara la glucólisis, y esto concuerda con los resultados obtenidos por otros investigadores en vacuno (Gagaoua y cols., 2017).

Otro enzima muy importante es la PYGM, que participa en la glucogenólisis y provee al músculo de glucosa cuando es necesario, a través de la rotura del glucógeno. En este estudio hemos podido comprobar que disminuye su expresión ante niveles más elevados de estrés, lo que coincide con los resultados de Wang y cols. (2017). También observamos un patrón decreciente en la expresión de la CK que está relacionada con el estrés, daño muscular y se encarga del mantenimiento de la energía al formar ATP a partir de fosfocreatina que puede ser utilizada por el músculo cuando

se produce ese daño muscular. Esto coincide con resultados de estudios previos, como los realizados, que relacionan niveles bajos de CK con un incremento de las pérdidas por goteo y baja capacidad de retención de agua con la desnaturalización de CK (Daroit cols. (2008).

Todos estos cambios celulares tienen como denominador común el estrés a nivel psicológico, frente al cual cada animal en función de su sesgo cognitivo tendrá distinto grado de susceptibilidad individual al estrés. Las respuestas celulares al estrés se dispararán a través de ciertos neurotransmisores, como DA, NA y 5-HT, que desencadenan cambios tanto a nivel de estrés oxidativo con la generación de ERO's como en la actividad del proteosoma y el desarrollo de los procesos autofágicos que tienen lugar durante las primeras etapas de la tenderización post-mortem.

Para estudiar las interacciones entre los distintos marcadores proteómicos detectados, utilizamos la herramienta String (Figura 30), que nos ha definido una red de relaciones que permiten observar la interacción entre el metabolismo glucolítico y el metabolismo de nucleótidos, que guardan relación ya que la glucólisis pretende obtener energía y la AK1 que se encarga como hemos comentado anteriormente, de la homeostasis de la energía celular mediante la transferencia de un fosfato entre el ATP y AMP. Con el resto de proteínas que resultaron significativas en nuestros estudios no se han podido establecer relaciones debido a que pertenecen a diferentes rutas y las bases de datos carecen de información relativa a las relaciones entre estas, como por ejemplo la albúmina que interviene en el transporte, la HSP70 que tiene un papel de protección celular, PGM2 que interviene metabolismo del glucógeno o la ACIII que es un enzima antioxidante.

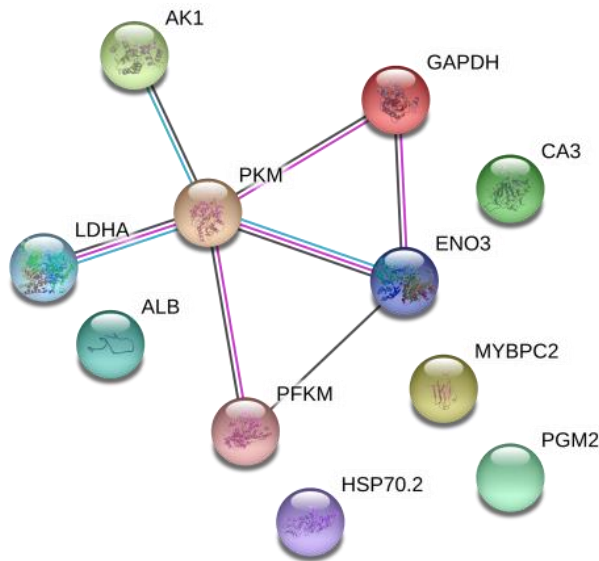


Figura 30. Análisis de interacción proteína-proteína hecho con String 11.0 de proteínas musculares del extracto sarcoplásmico. Las líneas de unión entre proteínas representan diferentes tipos de interacción (Cian=Base de datos; Rosa=Determinado experimentalmente; Negro=Coexpresión). Proteína C de unión a la miosina, tipo rápido (MYBPC2), Fosfofructoquinasa 6 muscular (PFKM), Albúmina (ALB), Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH), β -enolasa (ENO3), Anhidrasa carbónica 3 (CA3), Fosfoglicerato mutasa 2 (PGM2), Adenilato quinasa isoenzima 1 (AK1), Proteína de choque térmico 70kDa 1B (HSP70.2), Lactato deshidrogenasa cadena A (LDHA), Piruvato quinasa muscular (PKM).

Con respecto al estudio de los procesos de muerte celular, en concreto de los procesos autofágicos, en el porcino podemos concluir que la autofagia tiene lugar durante las primeras horas tras el sacrificio y que sus principales biomarcadores muestran un incremento significativo en función de los niveles de estrés de los animales durante las primeras horas post-mortem en un intento de resolver los daños derivados del estrés oxidativo, sin embargo en los animales menos estresados estos procesos estarían retrasados en el tiempo.

Biomarcadores de estrés en ganado vacuno:

En el ganado vacuno, el estrés pre-sacrificio provoca la aparición de carnes conocidas como DFD (Dark, Firm, Dry), que se identifican por una bajada del pH muscular post-mortem defectuosa ($\text{pH}_{24\text{h}} > 6,0$) y que muestran serios problemas de calidad, lo cual disminuye su valor comercial.

En los experimentos realizados en esta Tesis, no hemos detectado un nivel tan elevado de estrés como para producir tales defectos de calidad. Por un lado, porque trabajamos con una raza de vacuno dócil, como es la Asturiana de los Valles, que se adapta con facilidad a diversas condiciones de manejo. Por otro lado, porque los manejos estudiados (intensivo vs extensivo en granja, mezcla con animales extraños) pueden influir en el estado emocional del animal y producir algunos cambios en su capacidad de adaptación y en sus susceptibilidad al estrés, pero son manejos permitidos por la normativa vigente ya que son respetuosos con el bienestar animal.

No obstante, los distintos marcadores fisiológicos analizados en sangre en el momento del sacrificio y los estudios de los cambios en las moléculas energéticas (ATP) en los extractos celulares durante las primeras horas post-mortem, nos han permitido detectar mayor nivel de estrés en algunos de los manejos utilizados para criar y transportar los terneros. Así, los animales que se criaron en intensivo y que fueron sometidos a mezcla con animales extraños durante el período de transporte y espera previos al sacrificio (últimas 6 horas de vida) mostraron cambios que parecen reflejar mayor estrés en el momento del sacrificio. Por el contrario, los animales criados en extensivo mostraron mayor resiliencia, es decir, capacidad de adaptación a cambios ambientales, y no mostraron cambios significativos cuando se vieron mezclados con animales extraños.

El manejo en granja generó cambios a nivel de proteínas del metabolismo energético (gluconeogénesis, glucólisis), oxidativo y de proteínas implicadas en los procesos de muerte celular. En la figura 27a se muestra la relación entre los principales marcadores peptídicos que mostraron diferencias significativas en función del tratamiento empleado, observándose un núcleo central con las proteínas que forman parte del metabolismo catabólico de carbohidratos (en rojo, GO:0016052) ligado a proteínas del proceso metabólico del ATP (verde, GO:0046034) y la fosforilación (GO:0016310), mientras que hay cambios en proteínas estructurales (MYOM2) y de transporte y señalización (ALB), que no aparecen ligadas debido a la carencia de información al respecto en el programa String.

En cuanto al manejo de mezcla con animales extraños, se encontraron sobre todo cambios en enzimas del metabolismo de carbohidratos (glucogenolisis, glucólisis), debido probablemente a una drástica reducción de las reservas de glucógeno muscular durante la fase de transporte y espera y el estrés producido por la lucha social entre animales extraños. Además, en el caso de los terneros criados en intensivo, se detectó un proceso glucolítico post-mortem más rápido, por lo que la reserva energética del músculo se agotó con mayor velocidad.

La figura 27b muestra un núcleo central con las proteínas que forman parte del metabolismo catabólico de carbohidratos (en rojo, GO:0016052) ligado con proteínas relacionadas con la fosforilación (en azul, GO:0046034), que es un importante mecanismo regulatorio y la modificación traslacional más abundante.

Con respecto a los cambios producidos en las proteínas relacionadas con los procesos autofágicos en el ganado vacuno, los resultados mostraron la ocurrencia de autofagia en el post-mortem temprano, sin embargo al contrario de lo que ocurría en porcino no se observaron diferencias significativas entre animales en función de los distintos tratamientos analizados (Intensivo vs Semi-Extensivo o Mezcla vs NoMezcla) aunque sí que se observó una interacción significativa entre estos factores (FxTL) de modo que se producía un inicio más temprano junto con agotamiento más rápido de la expresión de los marcadores de autofagia en los animales criados en Semi-Extensivo. Esto indicaría que, en el vacuno, al contrario de lo observado en porcino, el disparo de la autofagia estaría ralentizado en los individuos sometidos a mayor estrés, siendo este fenómeno más evidente en los animales criados en Intensivo y que sufrieron mezcla con animales extraños en los momentos peri-sacrificio.

Existe un creciente interés por el estudio de los procesos de muerte celular, tales como autofagia y apoptosis, que ocurren en las primeras horas post-mortem y que pueden tener gran influencia sobre el proceso de conversión del músculo en carne. Ambos procesos pueden coexistir, y su estudio ayuda a entender e interpretar la complejidad de interacciones entre distintas rutas metabólicas, cuya evolución en las primeras horas post-mortem influirán sobre la calidad final de la carne. Esta Tesis Doctoral ha permitido describir la influencia significativa que tiene la autofagia sobre los cambios

metabólicos post-mortem del músculo. La información aportada hasta la fecha por los distintos estudios publicados, permiten postular los mecanismos biológicos que participan en la conversión del músculo en carne, que incluyen numerosas rutas biológicas que están siendo descubiertas gracias a la proteómica, tal y como se muestra en la Figura 31.

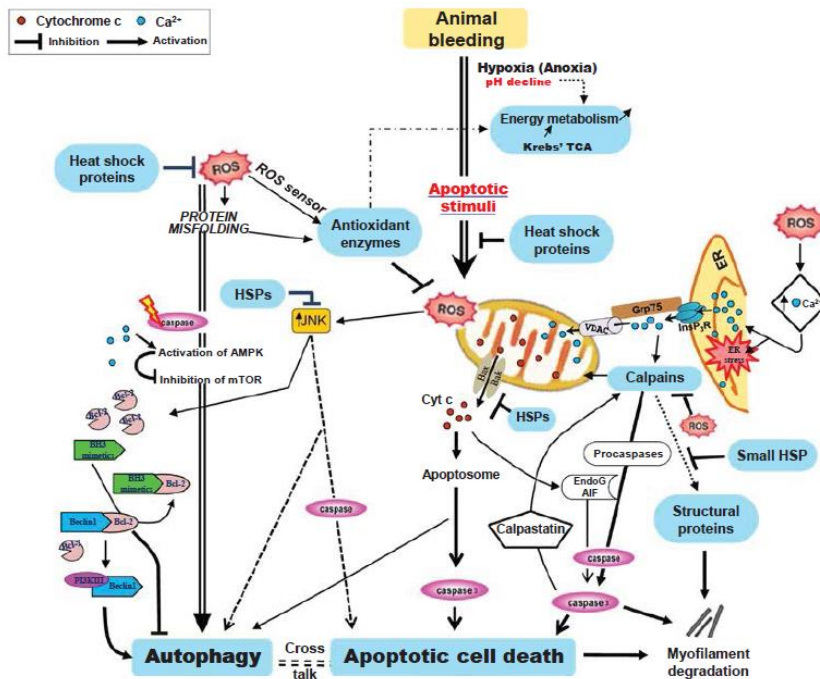


Figura 31. Esquema de los principales mecanismos biológicos involucrados en el proceso de conversión del músculo en carne y las rutas metabólicas que incluyen.

¿Existe un biomarcador universal de la calidad?

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral se han tratado de resumir en la siguiente tabla 14, que describe los distintos biomarcadores que mostraron cambios significativos en los distintos experimentos realizados y las rutas metabólicas a las que pertenecen:

Biomarcador	GANADO PORCINO			GANADO VACUNO	
	Sexo y Genotipo	Sesgo Cognitivo	Mezcla animales extraños	Manejo en granja	Mezcla animales extraños
Proteínas de choque térmico					
HSP70-1B			+		
Metabolismo energético					
Glicolítico					
EN03 (Beta enolasa)	+			+	
ALDOA (fructosa-bisfosfato aldolasa-A)	+				
GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa)	+		+	+	+
LDH-A (lactato deshidrogenasa-A)			+		
PKM (piruvato quinasa muscular)			+		+
PFKM (6- fosfofructoquinasa muscular)	+				
TCP1-13 (Proteína del complejo T 1-13)					
TPI Triosa isomerasa					+
Glucogenólisis					
PYGM (Glucógeno fosforilasa)	+			+	+
GDBE (Enzima desramificante del glucógeno)					+
Oxidativo					
CKM (creatinquinasa muscular)	+			+	+
Transporte, señalización y almacenamiento					
ALB (Precursor seroalbúmina)				+	
Homeostasis					
AK-1 (adenilato-quinasa isoenzima-1)	+		+	+	
Prot. estructurales					
Fast MyBP-C (Proteína de unión a miosina C, tipo rápido)	+				
MYOM2 (Miomesina-2 isoforma X)				+	
Autofagia					
Beclin-1	+	+	+	+	
Ratio LC3-II/LC3-I	+	+	+		+
Estrés Oxidativo					
ACIII (anhidrasa carbónica III)	+				
AAT (actividad antioxidante total)	+	+	+	+	+
CAT (catalasa)			+		
LPO (lipoperoxidación)	+	+		+	

SOD (superóxido dismutasa)			+		
----------------------------	--	--	---	--	--

Tabla 14. Resumen global de los biomarcadores proteómicos que mostraron diferencias significativas con los diferentes tratamientos analizados en vacuno y porcino.

Al observar estos resultados con una perspectiva global, se puede deducir que, independientemente de la especie animal utilizada y del factor de estrés estudiado, existe un denominador común en los procesos celulares que se ven afectados, siendo los principales los que participan en las rutas metabólicas energéticas y las relacionadas con la defensa antioxidante celular. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros grupos de investigación, tanto en porcino como en vacuno (Lametsch y cols., 2003; Polati y cols., 2012; Gagaoua y cols., 2015, 2017).

Nuestros resultados también resaltan la importancia de estudiar no solo los biomarcadores sino su evolución a lo largo del tiempo. Es decir, los procesos metabólicos que conlleva la conversión del músculo en carne van siguiendo las mismas etapas en las distintas condiciones estudiadas, lo que cambia es la velocidad a la que avanzan dichos procesos y cómo afecta esto a la evolución de otros. Esto añade complejidad a los estudios, ya que no sólo se trata de identificar qué molécula puede ser un biomarcador adecuado de los procesos, sino de detectar el tiempo óptimo para medirlo, que además puede variar entre individuos.

Este es un tema de gran actualidad en el que seguimos estudiando. Hasta la fecha los distintos científicos no se han puesto de acuerdo en determinar el momento óptimo de muestreo del tejido muscular para el análisis de los biomarcadores de calidad de la carne, que puede ser distinto según el proceso y la situación que se quiere estudiar. En principio, puede parecer adecuado realizar el análisis del tejido muscular en el post-mortem más temprano (0h-2h), ya que revelará la situación del organismo en vivo así como el estrés sufrido en el momento del sacrificio. Sin embargo, el estudio de las correlaciones entre el proteoma muscular y las variables fisiológicas de estrés/bienestar y de las variables de calidad de la carne nos indican que en la carne de cerdo el tiempo óptimo de muestreo del tejido muscular serían las 4 h post-mortem (Díaz y cols., 2016), mientras que para la carne de vacuno serían las 8 h o

las 24 h (Díaz y cols., 2018). Es decir, es necesario cierto intervalo de tiempo para que ocurran los cambios en el proteoma que reflejan las variaciones en las rutas metabólicas post-mortem del tejido muscular, siendo este intervalo menor en el caso de la carne de cerdo, cuya canal se enfría más rápidamente y que tiene además un metabolismo más rápido.

También merece la pena subrayar que, para hacer más complejo aún el entramado de factores que dificultan el estudio del proteoma muscular, hay que añadir, en el caso de la producción animal y la calidad de la carne, la alta variabilidad individual observada en los estudios, derivada de la heterogeneidad genotípica y fenotípica de las poblaciones, así como del estado emocional de los individuos, que influye en su percepción del riesgo y en las reacciones biológicas ante el peligro y el miedo. Esta complejidad hace imprescindible abordar este tema con el objetivo de identificar biomarcadores que puedan medirse de forma individual.

Sin embargo, vale la pena mencionar que la naturaleza compleja de los procesos que subyacen en el desarrollo post-mortem de la calidad de la carne y la alta diversidad de factores que pueden influir en la susceptibilidad del animal al estrés en el momento del sacrificio hace difícil la tarea de encontrar biomarcadores universales. Por ello se necesita desarrollar más investigaciones, que se basen en la aplicación de técnicas “ómicas” combinadas que permitan la identificación de biomarcadores “clave”, que deberán ser validados en diferentes especies, razas y sistemas de manejo, y cumplir con el reto de ser implantados en la cadena alimentaria como una herramienta de detección temprana de carnes con defectos de calidad

CAPÍTULO 8: CONCLUSIONES

- 1) En el ganado porcino, el sexo y la mutación del gen RYR1 influyen sobre la susceptibilidad animal al estrés. Las hembras mostraron mayor estrés que los machos y los animales portadores de la mutación (Nn) mayor que los no portadores (NN), lo que redundó en carne de peor calidad. El estudio proteómico mostró cambios significativos en proteínas relacionadas con la composición de la fibra muscular (MyBP-C), el metabolismo oxidativo (CAIII), la homeostasis celular (AK1) y el metabolismo energético (ENO3, GAPDH, PFKM y PGM2) que se correlacionaron con diferencias en la calidad de la carne.
- 2) En el ganado porcino, el estado emocional (sesgo cognitivo) del animal influye sobre el estrés en el momento del sacrificio. El músculo de los cerdos de sesgo negativo (que son más propensos a considerar con miedo cualquier estímulo extraño) mostró mecanismos de supervivencia celular inmediatamente después del sacrificio, que se tradujeron en una mayor defensa antioxidante y actividad más temprana del proteasoma y de los biomarcadores de autofagia (Beclin-1, relación LC3-II/LC3-I), como respuesta para contrarrestar el mayor estrés oxidativo del tejido producido por el mayor estrés en el momento del sacrificio.
- 3) La mezcla con animales extraños produce estrés e influye sobre el metabolismo post-mortem del músculo y la calidad de la carne. En porcino, el estrés produjo un descenso post-mortem más rápido del pH muscular, menor actividad antioxidante y cambios en proteínas de choque térmico (HSP70-8), de homeostasis celular (AK1) y del metabolismo energético (GAPDH y LDHA). En vacuno, se observaron cambios significativos en proteínas del metabolismo energético (GDBE, PYGM, PGM1, PKM, GAPDH, CKM, TPI), proteínas de transporte (TF) y marcadores de autofagia (Beclin1), que se vió retardada en los tratamientos con mayor estrés.
- 4) En el ganado vacuno, el manejo en granja influye sobre la calidad de la carne (más clara, roja y tierna la producida en Intensivo) y sobre la susceptibilidad animal al estrés (mayor estrés en Intensivo), observándose cambios en el proteoma muscular que afectaron a proteínas estructurales (MYOM2), ALB, homeostasis celular (AK1) y enzimas del metabolismo energético (PYGM, PGM1, ENO3, CKM, GAPDH).

CAPÍTULO 9: BIBLIOGRAFÍA

- Aalhus, J.L., Robertson, W. M., Ye, J. (2009). Muscle fiber characteristics and their relation to meat quality. In: Du M, McCormick, R. J., editors. *Applied Muscle Biology and Meat Science*. Boca Raton, FL: CRC Press. pp. 97-114.
- Adeola, O., Ball, R.O., House, J.D. and O'Brien P.J. (1993). Regional brain neurotransmitter concentrations in stress-susceptible pigs. *Journal of Animal Science* 71, 968–974.
- Agarwal, A. R., Zhao, L., Sancheti, H., Sundar, I. K., Rahman, I., & Cadenas, E. (2012). Short-term cigarette smoke exposure induces reversible changes in energy metabolism and cellular redox status independent of inflammatory responses in mouse lungs. *American Journal of Physiology: Lung Cell Molecular Physiology*, 303, 889–898.
- Ahmed, A. E., Morton, J. D., Fayaz, Z., & Kong, L. (2018). *Meat Color : Factors Affecting Color Stability*. Encyclopedia of Food Chemistry. Elsevier.
- Albertí, P., Ripoll, G., Goyache, F., Lahoz, F., Olleta, J. L., Panea, B., & Sañudo, C. (2005). Carcass characterisation of seven Spanish beef breeds slaughtered at two commercial weights. *Meat Science*, 71(3), 514–521.
- Aldai, N., Murray, B. E., Oliván, M., Martínez, A., Troy, D. J., Osoro, K., & Nájera, A. I. (2006). The influence of breed and mh-genotype on carcass conformation, meat physico-chemical characteristics, and the fatty acid profile of muscle from yearling bulls. *Meat Science*, 72(3), 486–495.
- Allison, C. P., Johnson, R. C., & Doumit, M. E. (1993). The effects of halothane sensitivity on carcass composition and meat quality in HAL-1843-normal pigs 1, 2. *Society, 1843*, 671–678.
- Ampuero Kragten, S., & Gil, M. (2015). Chapter 5: Instrumental tenderness - shear force. In M. Font-i-Furnols, M. Čandek-Potokar, C. Maltin, & M. Prevolnik Povše (Eds.). *A Handbook of Reference Methods for Meat Quality Assessment* (pp. 45–54). Farm Animal Imaging Cost Action FA1102.
- Andersen, H. J., Oksbjerg, N., Young, J. F., & Therkildsen, M. (2005). MEAT Feeding and meat quality – a future approach, 70, 543–554.
- Andersen, I.L., Andenaes, H., Boe, K.E., Jensen, P., Bakken, M. (2000). The effects of weight asymmetry and resource distribution on aggression in groups of unacquainted pigs. *Appl Anim Behav Sci*, 68:107-20.
- Apple, J. K., Kegley, E. B., Galloway, D. L., Wistuba, T. J., & Rakes, L. K. (2018). Duration of restraint and isolation stress as a model to study the dark-cutting condition in cattle 1, 2, 1202–1214.

Arey, D.S., Franklin, M.F. (1995) Effects of straw and unfamiliarity on fighting between newly mixed growing pigs. *Appl Anim Behav Sci*, 45:23-30.

Arnao, M.B., Cano A. and Acosta M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry* 73, 239–244.

Arroyo, L. (2017). Estudio neurofisiológico del estrés y el enriquecimiento ambiental en ganado porcino (Tesis Doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona.

Arroyo, L., Carreras, R., Valent, D., Pena, R., Mainau, E., Velarde, A., Sabria, J. and Bassols, A. (2016). Effect of handling on neurotransmitter profile in pig brain according to fear related behaviour. *Physiology & Behavior* 167, 374–381.

Arroyo, L., Valent, D., Carreras, R., Pe, R., Sabri, J., Velarde, A., & Id, A. B. (2019). Housing and road transport modify the brain neurotransmitter systems of pigs: Do pigs raised in different conditions cope differently with unknown environments. *PLoS ONE* 14 (1): e0210406.

Arthur, P. (1995). Double muscling in cattle: a review. *Australian Journal of Agricultural Research*, 46(8), 1493.

Averós, X., Martin, S.M., Riu, M., Serratosa, J., Gosalvez, L.F. (2008): Stress response of extensively reared young bulls being transported to growing-finishing farms under Spanish summer commercial conditions. *Livestock Science* 119: 174–182.

Bauer, E.P. (2015). Serotonin in fear conditioning processes. *Behavioural Brain Research* 277, 68–77.

Becerril-Herrera, M., Alonso-Spilsbury, M., Lemus-Flores, C., Guerrero-Legarreta, I., Olmos-Hernández, A., Ramírez-Necoechea, R., & Mota-Rojas, D. (2007). CO₂ stunning may compromise swine welfare compared with electrical stunning. *Meat Science*, 81, 233–237.

Becker, B.A., Mayes, H.F., Hahn, G.L., Nienaber, J.A., Jesse, G.W., Anderson, M.E., et al. (1989). Effect of fasting and transportation on various physiological parameters and meat quality of slaughter hogs. *J Anim Sci*, 67: 334-41.

Bendixen, E. (2005). The use of proteomics in meat science. *Meat Science*, 71(1), 138–149.

Berridge, C.W. and Waterhouse, B.D. (2003). The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Research Reviews* 42, 33–84.

Bertram, H.C., Oksbjerg, N., Young, J.F. (2010). NMR-based metabonomics reveals relationship between pre-slaughter exercise stress, the plasma metabolite profile at time of slaughter, and water-holding capacity in pigs. *Meat Sci*, 84:108-13.

- Bjarnadóttir, S. G., Hollung, K., Frøgestad, E. M., & Veiseth-Kent, E. (2010). Proteome changes in bovine longissimus thoracis muscle during the first 48 h postmortem: Shifts in energy status and myofibrillar stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(12), 7408–7414.
- Blanchard, P. J., Warkup, C. C., Ellis, M., Willis, M. B., & Avery, P. (1999). The influence of the proportion of Duroc genes on growth, carcass and pork eating quality characteristics. *Animal Science*, 68, 495–501.
- Bøe, K. E., and G. Færevik. (2003). Grouping and social preferences in calves, heifers and cows. *App. Anim. Behav. Sci.* 80:175-190.
- Boissy, A., & Veissier, I. (2016). The social behaviour of cattle.
- Boler, D. D., Dilger, A. C., Bidner, B. S., Carr, S. N., Eggert, J. M., Day, J. W., Killefer, J. (2010). Ultimate pH explains variation in pork quality traits. *Journal of Muscle Foods*, 21, 119–130.
- Bolumar, T., Enneking, M., Toep, S., & Heinz, V. (2013). New developments in shockwave technology intended for meat tenderization : Opportunities and challenges.
- Borrás, C., Gambini, J., López-grueso, R., Pallardó, F. V., & Viña, J. (2010). Biochimica et Biophysica Acta Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria. *BBA - Molecular Basis of Disease*, 1802(1), 205–211.
- Boya, P., Andreau, K., Poncet, D., Zamzami, N., Perfettini, J.-L., Metivier, D., Kroemer, G. (2003). Lysosomal Membrane Permeabilization Induces Cell Death in a Mitochondrion-dependent Fashion. *The Journal of Experimental Medicine*, 197(10), 1323–1334.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Brandt, C., & Pedersen, B. K. (2010). The Role of Exercise-Induced Myokines in Muscle Homeostasis and the Defense against Chronic Diseases.
- Broker, L. E., Kruyt, F. A. E., & Giaccone, G. (2005). Cell death independent of caspases: A review. *Clinical Cancer Research*, 11(9), 3155–3162.
- Budd, S. L., & Nicholls, D. G. (1996). A Reevaluation of the Role of Mitochondria in Neuronal Ca²⁺ Homeostasis. *Journal of Neurochemistry* Lippincott—Raven Publishers Philadelphia *J. Neurochem*, 66, 403–411.
- Bùe, K. E., & Gry, F. (2003). Grouping and social preferences in calves, heifers and cows, 80, 175–190.

- Burke, N. C., Scaglia, G., Boland, H. T., & Swecker, W. S. (2009). Influence of two-stage weaning with subsequent transport on body weight, plasma lipid peroxidation, plasma selenium, and on leukocyte glutathione peroxidase and glutathione reductase activity in beef calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 127(3–4), 365–370.
- Caballero, B., Sierra, V., Oliván, M., Vega-Naredo, I., Tomás-Zapico, C., Álvarez-García, O., Tolivia, D., Hardeland, R., Rodríguez-Colunga, M.J. and Coto-Montes, A. (2007). Activity of cathepsins during beef aging related to mutations in the myostatin gene. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87, 192–199.
- Caballero, B., Tomas-Zapico, C., Vega-Naredo, I., Sierra, V., Tolivia, D., Hardeland, R., Rodriguez-Colunga, M.J., Joel, A., Nevo, E., Avivi, A. and Coto-Montes, A. (2006). Antioxidant activity in *Spalax ehrenbergi*: a possible adaptation to underground stress. *Journal of Comparative Physiology* 192, 753–759.
- Calvo, J. H., R. Osta, E. García-Muro, P. (1997). Síndrome de estrés porcino: aplicación y ventajas de la PCR para su diagnóstico. *Med. Vet*, 14(2), 110–113.
- Carbonaro, M. (2004). Proteomics: Present and future in food quality evaluation. *Trends in Food Science and Technology*, 15(3–4), 209–216.
- Carreras, R., Mainau, E., Rodríguez, P., Dalmau, A., Manteca, X. and Velarde, A. (2015). Cognitive bias in pigs: individual classification and consistency over time. *Journal of Veterinary Behavior* 10, 577–581.
- Carvalho, M. E., Gasparin, G., Poleti, M. D., Rosa, A. F., Balieiro, J. C. C., Labate, C. A., Coutinho, L. L. (2014). Heat shock and structural proteins associated with meat tenderness in Nellore beef cattle, a *Bos indicus* breed. *Meat Science*, 96(3), 1318–1324.
- Cava, R., Ruiz, J., Ventanas, J., & Antequera, T. (1999). Oxidative and lipolytic changes during ripening of Iberian hams as affected by feeding regime: Extensive feeding and alpha-tocopheryl acetate supplementation. *Meat Science*, 52(2), 165–172.
- Channon, H. A., Kerr, M. G., & Walker, P. J. (2004). Effect of Duroc content, sex and ageing period on meat and eating quality attributes of pork loin. *Meat Science*, 66(4), 881–888.
- Channon, H. A., Payne, A. M., & Warner, R. D. (2000). Halothane genotype, pre-slaughter handling and stunning method all influence pork quality. *Meat Science*, 56, 291–299.
- Cheah, K. S., Cheah, A. M., & Krausgrill, D. I. (1995). Variations in meat quality in live halothane heterozygotes identified by biopsy samples of *M. longissimus dorsi*. *Meat Science*, 39, 293–300.

- Chen, Y., Arsenault, R., Napper, S., & Griebel, P. (2015). Models and methods to investigate acute stress responses in cattle. *Animals*, 5(4), 1268–1295.
- Chipuk, J. E., Kuwana, T., Bouchier-hayes, L., Droin, N. M., Newmeyer, D. D., Schuler, M., & Green, D. R. (2004). Direct Activation of Bax by p53 Mediates Mitochondrial Membrane Permeabilization and Apoptosis, 303, 1010–1015.
- Chosa, E., Sekimoto, T., Sonoda, N., Yamamoto, K., Matsuda, H., Takahama, K., et al. (2003). Evaluation of human beta-enolase as a serum marker for exercise-induced muscle damage. *Clin J Sport Med*, 13:209-212.
- Chrystall, B. B., & Devine, C. E. (1985). Electrical Stimulation: Its Early Development in New Zealand. In *Advances in Meat Research: Volume 1 Electrical Stimulation* (pp. 73–119). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Ciepielewski, Z. M., Stojek, W., Borman, A., Myślińska, D., Pańczyńska, P., & Kamyczek, M. (2016). The effects of ryanodine receptor (RYR1) mutation on natural killer cell cytotoxicity, plasma cytokines and stress hormones during acute intermittent exercise in pigs. *Research in Veterinary Science*, 105, 77–86.
- Cisneros, F., Ellis, M., Mckeith, F. K., McCaw, J., & Fernando, R. L. (1996). Influence of slaughter weight on growth and carcass characteristics, commercial cutting and curing yields, and meat quality of barrows and gilts from two genotypes. *Journal of Animal Science*, 74, 925–933.
- Conus, S. and Simon, H-U. (2008). Review: cathepsins: key modulators of cell death and inflammatory responses. *Biochemical Pharmacology* 76, 1374–1382.
- Coto-Montes, A., Boga, J. A., Rosales-Corral, S., Fuentes-Broto, L., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2012). Role of melatonin in the regulation of autophagy and mitophagy: A review. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 361(1–2), 12–23.
- Coto-Montes, A., Caballero, B., Sierra, V., Vega-Naredo, I., Tomás-Zapico, C., Hardeland, R., Tolivia, D., Ureña, F, Rodríguez-Colunga, M.J. (2004). Actividad de los principales enzimas antioxidants durante el periodo de oreo de culones de la raza Asturiana de los Valles. *ITEA*. 100A: 43- 55.
- Craig, J. V, & Muir, W. M. (1989). Fearful and associated responses of caged White Leghorn hens: genetic parameter estimates. *Poultry Science*, 68(1976), 1040–1046.
- Cross, H. R., Durland, P., & Seideman, S. C. (1986). Sensory qualities of meat. In P. J. Bechtel (Ed.), *Muscle as food* (pp. 279–320). Orlando, Florida: Academic Press, Inc
- D’Alessandro, A., & Zolla, L. (2013). Meat science: From proteomics to integrated omics towards system biology. *Journal of Proteomics*, 78, 558–577.

D'Souza, D. N., & Mullan, B. P. (2002). The effect of genotype, sex and management strategy on the eating quality of pork. *Meat Science*, 60(1), 95–101.

Dalmau, A., Temple, D., Rodriguez, P., Llonch, P., & Velarde, A. (2009). Application of the Welfare Quality® protocol at pig slaughterhouses. *Animal Welfare*, 18, 497–505.

De Duve, C. & Baudhuin, P. (1966) *Physiol. Rev.* 46, 323-357.

De Gonzalo-Calvo, D., Neitzert, K., Fernandez, M., Vega-Naredo, I., Caballero, B., Garcia-Macia, M., Suarez, F.M., Rodriguez-Colunga, M.J., Solano, J.J. and Coto-Montes, A. (2010). Differential inflammatory responses in aging and disease: TNF-alpha and IL-6 as possible biomarkers. *Free Radical Biology & Medicine* 49, 733–737.

D'Eath, R. B., Turner, S. P., Kurt, E., Evans, G., Thölking, L., Looft, H., Mormède, P. (2010). Pig's aggressive temperament affects pre-slaughter mixing aggression, stress and meat quality. *Animal*, 4, 604–616.

Depreux, F. F. S., Grant, A. L., & Gerrard, D. E. (2002). Influence of halothane genotype and body-weight on myosin heavy chain composition in pig muscle as related to meat quality. *Livestock Production Science*, 73, 265–273.

Di Luca, A., Mullen, A.M., Elia, G., Davey, G., Hamill, R.M. (2001). Centrifugal drip is an accessible source for protein indicators of pork ageing and water-holding capacity. *Meat Sci*, 88:261-70.

Disanto, C., Celano, G., Varvara, M., Fusiello, N., Fransvea, A., Bozzo, G., & Celano, G. V. (2014). Stress factors during cattle slaughter. *Italian Journal of Food Safety*, 3(3), 1–2.

Dokmanovic, M., Baltic, M. Z., Duric, J., Ivanovic, J., Popovic, L., Todorovic, M., Pantic, S. (2015). Correlations among stress parameters, meat and carcass quality parameters in pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 28(3), 435–441.

D'Souza, D. N., & Mullan, B. P. (2002). The effect of genotype, sex and management strategy on the eating quality of pork. *Meat Science*, 60, 95–101.

D'Souza, D. N., Dunshea, R. R., Warner, R. D., & Leury, B. J. (1998). The effect of handling pre-slaughter and carcass processing rate post-slaughter on pork quality. *Meat Science*, 50, 429–437.

Dunne, J. A. (2005). The Network Structure of Food Webs. *Structure*, 27–86.

Eckersall, P.D., Bell, R. (2010). Acute phase proteins: Bio-markers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Veterinary Journal* 185, 23–27.

Edwards, L. N., Engle, T. E., Correa, J. A., Paradis, M. A., Grandin, T., & Anderson, D. B. (2010). The relationship between exsanguination blood lactate concentration and carcass quality in slaughter pigs. *Meat Science*, 85, 435–440.

Edwards, L. N., Grandin, T., Engle, T. E., Porter, S. P., Ritter, M. J., Sosnicki, A. A., & Anderson, D. B. (2010). Use of exsanguination blood lactate to assess the quality of pre-slaughter pig handling. *Meat Science*, 86, 384–390.

El Golli-Bennour, E., & Bacha, H. (2011). Hsp70 expression as biomarkers of oxidative stress: Mycotoxins' exploration. *Toxicology*, 287(1–3), 1–7.

Ellmerer, M., Schaupp, L., Brunner, G. A., Sendlhofer, G., Wutte, A., Wach, P., & Pieber, T. R. (2000). Measurements of interstitial albumin in human skeletal muscle and adipose tissue by open-low microperfusion. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 285, E352–E356.

Ertbjerg, P., & Puolanne, E. (2017). Muscle structure, sarcomere length and influences on meat quality: A review. *Meat Science*, 132(February), 139–152.

Esterbauer, H., Dieber-Rotheneder, M., Striegl, G., Waeg, G. (1991). Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein. *Am J Clin Nutr*; 53(1 Suppl): 314S-321S.

EU (2010). Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Communities*, 276, 33–79.

European Union (2007). Amendments to the treaty on European Union and to the treaty establishing the European community. *Official Journal of the European Communities* 50, 1–271.

European Union (2010). Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Communities* L276, 33–79.

EUROSTAT, 2017. <https://ec.europa.eu/eurostat/web/agriculture/data/database> ["Fecha consulta": enero 2019]

Fàbrega, E., Manteca, X., Font, J., Gispert, M., Carrión, D., Velarde, A., Diestre, A. (2004). A comparison of halothane homozygous negative and positive pietrain sire lines in relation to carcass and meat quality, and welfare traits. *Meat Science*, 66, 777–787.

Fàbrega, E., Puigvert, X., Soler, J., Tibau, J., Dalmau, A. (2013). Effect of on farm mixing and slaughter strategy on behaviour, welfare and productivity in Duroc finished entire male pigs. *Appl Anim Behav Sci*, 143:31-9.

- Fàbrega, E., Velarde, A., Cros, J., Gispert, M., Suarez, P., Tibau, J., & Soer, J. (2010). Effect of vaccination against gonadotropin-releasing hormone, using Improvac®, on growth performance, body composition, behaviour and acute phase proteins. *Livestock Science*, 132, 53–59.
- Fernandez, X., Neyraud, E., Astruc, T., & Sante, V. (2002). Effects of halothane genotype and pre-slaughter treatment on pig meat quality. Part 1. Post mortem metabolism, meat quality indicators and sensory traits of m. Longissimus lumborum. *Meat Science*, 62, 429–437.
- Fiedler, I., Ender, K., Wicke, M., Maak, S., Lengerken, G. V., & Meyer, W. (1999). Structural and functional characteristics of muscle fibres in pigs with different malignant hyperthermia susceptibility (MHS) and different meat quality. *Meat Science*, 53, 9–15.
- Fiems, L. O., De Campeneere, S., Van Caelenbergh, W., De Boever, J. L., & Vanacker, J. M. (2003). Carcass and meat quality in double-musled Belgian Blue bulls and cows. *Meat Science*, 63(3), 345–352.
- Fontanesi, L., Davoli, R., Nanni Costa, L., Beretti, F., Scotti, E., Tazzoli, M., Tassone, F., Colombo, M., Buttazoni, L., & Russo, V. (2008). Investigation of candidate genes for glycolytic potential of porcine skeletal muscle: Association with meat quality and production traits in Italian Large White pigs. *Meat Science*, 80, 780–787.
- Fontanesi, L., Davoli, R., Nanni Costa, L., Scotti, E., & Russo, V. (2003). Study of candidate genes for glycolytic potential of porcine skeletal muscle: identification and analysis of mutations, linkage and physical mapping and association with meat quality traits in pigs. *Cytogenetic and Genome Research*, 102, 145–151.
- Franco, D., Mato, A., Salgado, F. J., López-Pedrouso, M., Carrera, M., Bravo, S., Zapata, C. (2015). Tackling proteome changes in the longissimus thoracis bovine muscle in response to pre-slaughter stress. *Journal of Proteomics*, 122, 73–85.
- Franco, D., Mato, A., Salgado, F. J., López-Pedrouso, M., Carrera, M., Bravo, S., Zapata, C. (2015). Quantification of proteome changes in bovine muscle from two-dimensional electrophoresis data. *Data in Brief*, 4, 100–104.
- Fuente-garcia, C., Aldai, N., Sentandreu, E., Oliván, M., García-torres, S., Franco, D., Angel, M. (2019). Search for proteomic biomarkers related to bovine pre-slaughter stress using liquid isoelectric focusing (OFFGEL) and mass spectrometry. *Journal of Proteomics*, 1–7.
- Fujii, J., Otsu, K., Zorzato, F., De Leon, S., Khanna, V. K., Weiler, J. E., MacLennan, D. H. (1991). Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*, 253, 448–451.

Gagaoua, M., Claudia Terlouw, E. M. C., Boudjellal, A., & Picard, B. (2015). Coherent correlation networks among protein biomarkers of beef tenderness: What they reveal. *Journal of Proteomics*, 128, 365–374.

Gagaoua, M., Terlouw, E. M. C., & Picard, B. (2017). The study of protein biomarkers to understand the biochemical processes underlying beef color development in young bulls. *Meat Science*, 134, 18–27.

Gagaoua, M., Terlouw, E. M. C., Micol, D., Boudjellal, A., Hocquette, J. F., & Picard, B. (2015). Understanding early post-mortem biochemical processes underlying meat color and pH decline in the Longissimus thoracis muscle of young blond d'Aquitaine bulls using protein biomarkers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 6799–6809.

Gajana, C.S., Nkukwana, T.T., Marume, U., Muchenje, V. (2013). Effects of transportation time, distance, stocking density, temperature and lairage time on incidences of pale soft exudative (PSE) and the physico-chemical characteristics of pork. *Meat Sci*, 95: 520-5.

Gallo, C., Lizondo, G., & Knowles, T. G. (2003). Effects of journey and lairage time on steers transported to slaughter in Chile, 361–364.

García-Macia, M., Sierra, V., Palanca, A., Vega-Naredo, I., De Gonzalo-Calvo, D., Rodríguez-González, S., Coto-Montes, A. (2014). Autophagy during beef aging. *Autophagy*, 10(1), 137–143.

Geesink, G. H., Kuchay, S., Chishti, A. H., & Koochmaraie, M. (2006). M-Calpain Is Essential for Postmortem Proteolysis of Muscle Proteins. *Journal of Animal Science*, 84(10), 2834–2840.

Gentry JG, McGlone JJ, Blanton JR Jr, Miller MF. (2002). Impact of spontaneous exercise on performance, meat quality, and muscle fiber characteristics of growing/finishing pigs. *J Anim Sci*, 80(11):2833-9.

Gentry, J.G., McGlone, J.J., Miller, M.F., Blanton, J.R. Jr. (2004). Environmental effects on pig performance, meat quality, and muscle characteristics. *J Anim Sci*, 82(1):209-17.

Gil, M., Serra, X., Gispert, M., Àngels Oliver, M., Sañudo, C., Panea, B., Piedrafita, J. (2001). The effect of breed-production systems on the myosin heavy chain 1, the biochemical characteristics and the colour variables of Longissimus thoracis from seven Spanish beef cattle breeds. *Meat Science*, 58(2), 181–188.

Gispert, M., Àngels Oliver, M., Velarde, A., Suarez, P., Pérez, J., & Font i Furnols, M. (2010). Carcass and meat quality characteristics of immunocastrated male, surgically castrated male, entire male and female pigs. *Meat Science*, 85, 664–670.

Gobert, M., Sayd, T., Gatellier, P., & Santé-Lhoutellier, V. (2014). Application to proteomics to understand and modify meat quality. *Meat Science*, 98(3), 539–543.

Gobierno del Principado de Asturias, 2018.

[https://www.asturias.es/portal/site/webasturias/template.PAGE/BuscadorOpenDataTransparencia/?accion=resultados_view&busqueda=&busq-tipo=4bde6be5d43b1610VgnVCM10000098030a0aRCRD&FechaCheckHidden1=F-FIN&FechaCheckCompHidden1=1&canales=&fechaInicio=&fechaFin=&vgnextoid=320afaf18a869510VgnVCM100000ce212b0aRCRD&i18n.http.lang=es \[“Fecha consulta”: enero 2019\]](https://www.asturias.es/portal/site/webasturias/template.PAGE/BuscadorOpenDataTransparencia/?accion=resultados_view&busqueda=&busq-tipo=4bde6be5d43b1610VgnVCM10000098030a0aRCRD&FechaCheckHidden1=F-FIN&FechaCheckCompHidden1=1&canales=&fechaInicio=&fechaFin=&vgnextoid=320afaf18a869510VgnVCM100000ce212b0aRCRD&i18n.http.lang=es [“Fecha consulta”: enero 2019])

Golstein, P., & Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(1), 37–43.

Grandin, T. (2000). *Livestock handling and transport* (2nd ed.). Wallingford, Oxon, UK: CABI Publishing.

Grandin, T. (2014). Chapter 00251 - Preslaughter Handling | Behavior of Cattle, Pigs, Sheep, Bison, and Deer during Handling and Transport. *Encyclopedia of Meat Sciences* (Vol. 3). Elsevier Ltd.

Greaser, M. L., Okochi, H. and Sosnicki, A. A. (2001). Role of fiber types in meat quality. In *Proceedings of the 47th International Congress of Meat Science and Technology*, Session 4, Lecture 1, August 26-31, Krakow, Poland, pp. 34-37.

Green, D. R. (2005). Apoptotic pathways: Ten minutes to dead. *Cell*, 121(5), 671–674.

Grobet, L., Royo-Martin, L. J., Poncelet, D., Pirottin, D., Brouwers, B., Riquet, J., et al. (1997). A deletion in the myostatin gene causes double-muscling in cattle. *Nature Genetics*, 17, 71–74.

Grune, T., Jung, T., Merker, K., & Davies, K. J. A. (2004). Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and “aggresomes” during oxidative stress, aging, and disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36(12), 2519–2530.

Guillemin, N., Bonnet, M., Jurie, C., & Picard, B. (2011). Functional analysis of beef tenderness. *Journal of Proteomics*, 75, 352–365.

Guillemin, N., Juire, C., Cassar-Malek, I., Hocquette, J.F., Renand, G., Picard, B. (2011). Variations in the abundance of 24 protein biomarkers of beef tenderness according to muscle and animal type. *Animal*, 5:885-94.

Gullett, E. A., Battenham, S., & Hore, T. (1996). Effect of age and cut on consistency of tenderness and leanness of beef. *Food Quality and Preference*, 7(1), 37–45.

- Hambrecht, E., Eissen, J. J., Newman, D. J., Smits, C. H. M., den Hartog, L. A., & Verstegen, M. W. A. (2005a). Negative effects of stress immediately before slaughter on pork quality are aggravated by suboptimal transport and lairage conditions. *Journal of Animal Science*, 83, 440–448.
- Hambrecht, E., Eissen, J. J., Newman, D. J., Smits, C. H. M., Verstegen, M. W. A., & den Hartog, L. A. (2005b). Preslaughter handling effects on pork quality and glycolytic potential in two muscles differing in fiber type composition. *Journal of Animal Science*, 83, 900–907.
- Hambrecht, E., Eissen, J.J., Newman, D.J., Smits, C.H.M., Verstegen, M.W.A., den Hartog, L.A. (2005). Preslaughter handling effects on pork quality and glycolytic potential in two muscles differing in fiber type composition. *J Anim Sci*, 83:900-7.
- Hambrecht, E., Eissen, J.J., Newman, D.J., Smits, C.H.M., Verstegen, M.W.A., den Hartog, L.A. (2005). Preslaughter handling effects on pork quality and glycolytic potential in two muscles differing in fiber type composition. *J Anim Sci*, 83:900-7.
- Hannula, T., & Puolanne, E. (2004). The effect of cooling rate on beef tenderness: The significance of pH at 7 °C. *Meat Science*, 67(3).
- Havlis, J., Thomas, H., Sebela, M., & Shevchenko, A. (2003). Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins. *Analytical Chemistry*, 75, 1300–1306.
- Havlis, J., Thomas, H., Sebela, M., Shevchenko, A. (2003). Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins. *Anal Chem*, 75:1300-6.
- Hellen, M., Peñuela, R., Uribe-velásquez, L. F., Alberto, J., & Valencia, S. (2011). Stress biomarkers as indicators of animal welfare in cattle beef farming, (26), 71–87.
- Herrera-Mendez, C.H., Becila, S., Boudjellal, A., Ouali, A. (2006). Meat ageing: reconsideration of the current concept. *Trends FoodSci Tech*, 17:394–405.
- Hill, E. E., Zack, E., Battaglini, C., Viru, M., Viru, A., Hackney, A. C. (2008). Exercise and circulating cortisol levels: the intensity threshold effect. *J. Endocrinol. Invest.* 31, 587–591.
- Holderman, M. T., Miller, K. P., Dangott, L. J., & Ramos, K. S. (2002). Identification of Albumin Precursor Protein, Phi AP3 and Smooth Muscle Actin as Novel Components of Redox Sensing Machinery in Vascular Smooth Muscle Cells, 61(5), 1174–1183.
- Hollung, K., Veiseth, E., Jia, X., Færgestad, E. M., & Hildrum, K. I. (2007). Application of proteomics to understand the molecular mechanisms behind meat quality. *Meat Science*, 77(1 SPEC. ISS.), 97–104.

Hollung, K., Veiseth, E., Jia, X., Færgestad, E. M., & Hildrum, K. I. (2007). Application of proteomics to understand the molecular mechanisms behind meat quality. *Meat Science*, 77, 97–104.

Honikel, K. O. (1998). Reference methods for the assessment of physical characteristics
Honikel, K. O. (2014). Rigor Mortis, Cold, and Rigor Shortening. *Encyclopedia of Meat Sciences* (Vol. 1). Elsevier Ltd.

Hopkins, D. L. (2017). *The Eating Quality of Meat*. Lawrie's Meat Science. Elsevier Ltd.

Houbak, M.B., Ertbjerg, P. and Therkildsen, M. (2008). In vitro study to evaluate the degradation of bovine muscle proteins post-mortem by proteasome and mu-calpain. *Meat Science* 79, 77–85.

Huff Lonergan, E., Zhang, W., & Lonergan, S. M. (2010). Biochemistry of postmortem muscle - lessons on mechanisms of meat tenderization. *Meat Science*, 86(1), 184–195.

Huff-lonergan, E. J., & Robson, R. M. (1995). Effects of postmortem aging time, animal age, and sex on degradation of titin and nebulin in bovine longissimus muscle.

Interempresas, 2017. <http://www.interempresas.net/Industria-Carnica/Articulos/167353-Situacion-actual-y-perspectivas-dhttp://www.fao.org/3/a-i4738s.pdfel-mercado-mundial-de-las-carnes.html> [“Fecha consulta”: enero 2019]

Jain, R., & Jain, S. K. (2011). Total Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Some Selected Anti- cancer Medicinal Plants from Chhattisgarh State, India, 762, 755–762.

Jami, M. S., Barreiro, C., García-Estrada, C., & Martín, J. F. (2010). Proteome analysis of the penicillin producer *Penicillium chrysogenum*: characterization of protein changes during the industrial strain improvement. *Molecular & Cellular Proteomics*, 9, 1182–1198.

Jeeva, J.S., Sunitha, J., Ananthalakshmi, R., Rajkumari, S., Ramesh, M., Krishnan, R. (2015) Enzymatic antioxidants and its role in oral diseases. *J Pharm Bioallied Sci*, 7(Suppl 2):S331-3.

Jia, X., Veiseth-Kent, E., Grove, H., Kuziora, P., Aass, L., Hildrum, K. I., & Hollung, K. (2009). Peroxiredoxin-6_A potential protein marker for meat tenderness in bovine longissimus thoracis muscle. *Journal of Animal Science*, 87, 2391–2399.

Jian, W., Edom, R.W. and Weng, N. (2006). Important considerations for quantitation of small-molecule biomarkers using LC-measurement and interpretation of vitamin D status. *J Clin Endocrinol Metab*, 91: 3055-3061.

Joo, S.T., Kauffman, R.G., Kim, B.C., Park, G.B. (1999). The relationship of sarcoplasmic and myofibrillar protein solubility to colour and water-holding capacity in porcine longissimus muscle. *Meat Sci*, 52: 291-7.

Jorgensen, A. (2013). Oxidatively generated DNA/RNA damage in psychological stress states. *Danish Medical Journal* 60, B4685.

Jurie, C., Martin, J., Listrat, A., Jailler, R., Culioli, J., Picard, B., Picard, B. (2014). Science : Carcass and muscle characteristics of beef cull cows between 4 and 9 years of age, (March 2007), 415–421.

Kaya, A. (2004). The effects of electrical stunning and percussive captive bolt stunning on meat quality of cattle processed by Turkish slaughter procedures, 66, 809–815.

Kazemi, S., Ngadi, M. O., & Gariépy, C. (2011). Protein denaturation in pork longissimus muscle of different quality groups. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 102–106.

Kerry, J. P., Grady, M. N. O., & Hogan, S. A. (2006). Meat: Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products : A review, 74, 113–130.

Kim, H., Kim, J., Seo, J., Setyabrata, D., & Brad, Y. H. (2018). Effects of aging / freezing sequence and freezing rate on meat quality and oxidative stability of pork loins. *Meat Science*, 139, 162–170.

Kim, N.K., Park, H.R., Lee, H.C., Yoon, D., Son, E.S., Kim, Y.S., et al. (2010). Comparative studies of skeletal muscle proteome and transcriptome profilings between pig breeds. *Mamm Genome*, 21: 307–19.

Knowles, T.G., Warriss, P.D. (2000). Stress physiology of animals during transport. In: *Livestock Handling and Transport*, 2nd ed. Grandin T, editor. Wallingford: CAB International.

Kregel, K.C., Zhang, H.J. (2007). An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 292(1): 18-36.

Krischek, C., Natter, R., Wigger, R., & Wicke, M. (2011). Adenine nucleotide concentrations and glycolytic enzyme activities in longissimus muscle samples of different pig genotypes collected before and after slaughter. *Meat Science*, 89, 217–220.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H. Melino, G. (2009). Classification of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*, 16(1), 3–11.

- Laack, R. L. J. M. Van, Stevens, S. G., & Stalder, K. J. (1999). The influence of ultimate pH and intramuscular fat content on pork tenderness and tenderization 1, 392–397.
- Lametsch, R., Karlsson, A., Rosenvold, K., Andersen, H. J., Roepstorff, P., & Bendixen, E. (2003). Postmortem proteome changes of porcine muscle related to tenderness. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6992–6997.
- Lametsch, R., Roepstorff, P., Bendixen, E. (2002). Identification of protein degradation during post-mortem storage of pig meat. *J Agric Food Chem*, 50:5508-12.
- Lampe, J. F., Baas, T. J., & Mabry, J. W. (2002). Comparison of grain sources for swine diets and their effect on meat and fat quality traits 1, 1022–1029.
- Lana, A. and Zolla, L. (2015). Apoptosis or autophagy, that is the question: two ways for muscle sacrifice towards meat. *Trends in Food Science & Technology* 46, 231–241.
- Landsheer, J. and van den Wittenboer, G. (2015). Unbalanced 2 x 2 factorial designs and the interaction effect: a troublesome combination. *PLoS ONE* 10, e0121412
- Lardone, P. J., Alvarez-García, Ó., Carrillo-Vico, A., Vega-Naredo, I., Caballero, B., Guerrero, J. M., & Coto-Montes, A. (2006). Inverse correlation between endogenous melatonin levels and oxidative damage in some tissues of SAM P8 mice. *Journal of Pineal Research*, 40 (2), 153–157.
- Latorre, M.A., Lázaro, R., Gracia, M.I., Nieto, M., Mateos, G.G. (2003). Effect of sex and terminal sire genotype on performance, carcass characteristics, and meat quality of pigs slaughtered at 117 kg body weight. *Meat Sci*, 65(4): 1369-77.
- Laufen, T., Mayer, M.P., Beisel, C., Klostermeier, D., Mogk, A., Reinstein, J., et al. (1999). Mechanism of regulation of Hsp70 chaperones by Dna J cochaperones. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:5452-7.
- Laville, E., Sayd, T., Terlouw, C., Blinet, S., Pinguet, J., Fillaut, M., Chérel, P. (2009). Differences in pig muscle proteome according to HAL genotype: Implications for meat quality defects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4913–4923.
- Laville, E., Sayd, T., Terlouw, C., Chambon, C., Damon, M., Larzul, C., Chérel, P. (2007). Comparison of sarcoplasmic proteomes between two groups of pig muscles selected for shear force of cooked meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5834–5841.
- Lay, D., Wilson, M. (2001): Physiological indicators of stress in domestic livestock. *Symposium on Concentrated Animal Feeding Operations Regarding Animal Behavior, Care, and Well-Being*, Indiana; pp.1-25.

Leheska, J. M., Wulf, D. M., & Maddock, R. J. (2002). Effects of fasting and transportation on pork quality development and extent of postmortem metabolism. *Journal of Animal Science*, 80(12), 3194–3202.

Leite, T. C., Da Silva, D., Coelho, R. G., Zancan, P., & Sola-Penna, M. (2007). Lactate favours the dissociation of skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase tetramers down-regulating the enzyme and muscle glycolysis. *Biochemical Journal*, 408, 123–130.

Levitt, D. G., & Levitt, M. D. (2016). Human serum albumin homeostasis : a new look at the roles of synthesis, catabolism, renal and gastrointestinal excretion, and the clinical value of serum albumin measurements.

Li, Q., Zhang, M., Chen, Y.J., Wang, Y.J., Huang, F. and Liu, J. (2011). Oxidative damage and HSP70 expression in masseter muscle induced by psychological stress in rats. *Physiology & Behavior* 104, 365–372.

Li, S., Ma, R., Pan, J., Lin, X., Dong, X., & Yu, C. (2018). *SC. Meat Science*.

Li, Y., Zheng, Y., Qian, J., Chen, X., Shen, Z., Tao, L., Shen, H. (2012). Preventive effects of zinc against psychological stress-induced iron dyshomeostasis, erythropoiesis inhibition, and oxidative stress status in rats. *Biological Trace Element Research*, 147(1–3), 285–291.

Logue, S.F. and Gould, T.J. (2013). The neural and genetic basis of executive function: attention, cognitive flexibility, and response inhibition. *Pharmacology Bio-chemistry and Behavior* 123, 45–54.

Longo, V., Lana, A., Bottero, M. T., & Zolla, L. (2015). Apoptosis in muscle-to-meat aging process: The omic witness. *Journal of Proteomics*, 125, 29–40.

López, R. y Casp, A. Madrid, E. M. (2004). Prologo Parte I : La carne y los animales de abasto. Capítulo I : Carne y músculo, Capítulo II: Animales de abasto.

López-Bote, C.J., Rey, A.I., Isabel, B. (2001). Alimentación del cerdo Ibérico en la Dehesa. *Porcino Ibérico: Aspectos Claves* (Buxadé C., Daza A., Eds), 215–246.

Mancini, R. A., & Hunt, M. C. (2005). Current research in meat color. *Meat Science*, 71(1), 100–121.

MAPAMA, 2016. <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/sectores-ganaderos/> [“Fecha consulta”: enero 2019]

MAPAMA, 2017a. https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/informeannualdeconsumoalimentario2017_tcm30-456186.pdf [“Fecha consulta”: enero 2019]

MAPAMA, 2017b.

https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/estadisticas/indicadoreseconomicoscarnedecerdo2017comentarios_tcm30-379728.pdf [“Fecha consulta”: enero 2019]

MAPAMA, 2018. <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo/autoctona-fomento/bovino/asturiana-de-los-valles/default.aspx> [“Fecha consulta”: enero 2019]

Marco-Ramell, A., Arroyo, L., Peña, R., Pato, R., Saco, Y., Fraile, L., Bassols, A. (2016a). Biochemical and proteomic analyses of the physiological response induced by individual housing in gilts provide new potential stress markers. *BMC Veterinary Research*, 12, 265.

Marco-ramell, A., Arroyo, L., Saco, Y., García-heredia, A., Camps, J., Fina, M., Bassols, A. (2012). Proteomic analysis reveals oxidative stress response as the main adaptive physiological mechanism in cows under different production systems. *Journal of Proteomics*, 75(14), 4399–4411.

Marco-Ramell, A., de Almeida, A. M., Cristobal, S., Rodrigues, P., Roncada, P., & Bassols, A. (2016b). Proteomics and the search for welfare and stress biomarkers in animal production in the one-health context. *Molecular BioSystems*, 12, 2024–2035.

Marco-Ramell, A., Pato, R., Peña, R., Saco, Y., Manteca, X., Ruiz de la Torre, J. L., & Bassols, A. (2011). Identification of serum stress biomarkers in pigs housed at different stocking densities. *Veterinary Journal*, 190(2), 66-71.

María, G. A., Villarroel, M., Sañudo, C., Olleta, J. L., & Gebresenbet, G. (2003). Effect of transport time and ageing on aspects of beef quality. *Meat Science*, 65(4), 1335–134.

Maribo, H., EWrtbjerg, P., Andersson, M., Barton-Gade, P. and Müller, A.J. (1999). Electrical stimulation of pigs- effect on pH fall, meat quality and Cathepsin B+L activity. *Meat Science* 52, 179–187.

McCord, J.M., Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*, 244(22):6049-55.

McMillin KW. (2008). Where is MAP Going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat. *Meat Sci*, 80(1):43-65.

McMillin, K. W. (2017). Advancements in meat packaging. *Meat Science*.

Melton, S. L. (1990). Effects of feeds on flavour of red meat: A review. *Journal of Animal Science*, 68, 4421–4435.

Mendl, M., Burman, O.H.P., Parker, R.M.A. and Paul, E.S. (2009). Cognitive bias as an indicator of animal emotion and welfare: emerging evidence and underlying mechanisms. *Applied Animal Behaviour Science* 118, 161–181.

Ménissier, F. (1982). Advantages of Using Double Muscled Sires in Crossbreeding and the Selection of a Specialised Double Muscled Sire Line in France. In J. W. B. King & F. Ménissier (Eds.), *Muscle Hypertrophy of Genetic Origin and its use to Improve Beef Production: A Seminar in the CEC Programme of Coordination of Research on Beef Production held in Toulouse, France*, (pp. 480–536).

Miller, M. F., Kerth, C. R., Wise, J. W., Lansdell, J. L., Stowell, J. E., & Ramsey, C. B. (1997). Slaughter Plant Location, USDA Quality Grade, External Fat Thickness, and Aging Time Effects on Sensory Characteristics of Beef Loin Strip Steak. *Journal of Animal Science*, 75(3), 662–667.

Miranda-de la Lama, G.C. (2018). Transporte y bienestar animal. Un enfoque integrador. Ed. Servet.

Miranda-de la Lama, G.C., Rivero, L., Chacón, G., Garcia-Belenguer, S., Villarroel, M., Maria, G.A. (2010). Effect of the pre-slaughter logistic chain on some indicators of welfare in lambs. *Livest Sci*, 128:52-9.

Mora, F., Segovia, G., Del Arco, A., de Blas, M. and Garrido, P. (2012). Stress, neurotransmitters, corticosterone and body-brain integration. *Brain Research* 1476, 71–85.

Morzel, M., Chambon, C., Hamelin, M., Santé-Lhoutellier, V., Sayd, T., Monin, G. (2004). Proteome changes during pork meat ageing following use of two different pre-slaughter handling procedures. *Meat Sci*, 67:689-96.

Mota-Rojas, D., Becerril-Herrera, M., Roldan-Santiago, P., Alonso-Spilsbury, M., Flores-Peinado, S., Ramírez-Necoechea, R., Trujillo-Ortega, M. E. (2012). Effects of long distance transportation and CO2 stunning on critical blood values in pigs. *Meat Science*, 90, 893–898.

Mota-Rojas, D., Herrera, M. B., Trujillo-Ortega, M. E., Alonso-Spilsbury, M., Flores-Peinado, S. C., & Guerrero-Legarreta, I. (2009). Effects of pre-slaughter transport, lairage and sex on pig chemical serologic profiles. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8, 246–250.

Mounier, L., Colson, S., Roux, M., Dubroeuq, H., Boissy, A., & Veissier, I. (2008). Positive attitudes of farmers and pen-group conservation reduce adverse reactions of bulls during transfer for slaughter.

- Muchenje, V., Dzama, K., Chimonyo, M., Strydom, P. E., & Raats, J. G. (2009). Relationship between pre-slaughter stress responsiveness and beef quality in three cattle breeds. *Meat Science*, 81(4), 653–657.
- Murata, H. (2007). Stress and acute phase protein response: An inconspicuous but essential linkage. *Veterinary Journal*, 173, 473–474.
- Nakhaee, A., Shahabizadeh, F. and Erfani, M. (2013). Protein and lipid oxidative damage in healthy students during and after exam stress. *Physiology & Behavior* 118, 118–121.
- Nanni Costa, L., Lo Fiego, D.P., Dall’Olio, S., Davoli, R., Russo, V. (2002). Combined effects of pre-slaughter treatments and lairage time on carcass and meat quality in pigs of different halothane genotype. *Meat Sci*, 61:41-7.
- Naylor, S. (2003). Biomarkers: Current perspectives and future prospects. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 3, 525–529.
- Neill, D. J. O., Lynch, P. B., Troy, D. J., Buckley, D. J., & Kerry, J. P. (2003). Influence of the time of year on the incidence of PSE and DFD in Irish pigmeat, 64, 105–111.
- Nuernberg, K., Dannenberger, D., Nuernberg, G., Ender, K., & Voigt, J. (2005). Effect of a grass-based and a concentrate feeding system on meat quality characteristics and fatty acid composition of longissimus muscle in different cattle breeds, 94, 137–147.
- Oakley, C., Hambly, B. D., Curmi, P. M. G., & Brown, L. J. (2004). Myosin binding protein C: Structural abnormalities in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Cell Research*, 14, 95–110.
- Oliván, M., de la Roza, B., Mocha, M., & Martínez, M. J. (2002). Prediction of physico-chemical and texture characteristics of beef by near infrared transmittance spectroscopy. In: *Proceedings of the 10th International Conference of Near Infrared Spectroscopy* (pp. 197-202), Kyongju, Korea.
- Oliván, M., Fernández-Suárez, V., Díaz-Martínez, F., Sierra, V., Coto-Montes, A., de Luxán-Delgado, B., Velarde, A. (2016). Identification of biomarkers of stress in meat of pigs managed under different mixing treatments. *British Biotechnology Journal*, 11, 1–13.
- Oliván, M., García, P., Martínez, M.J., Mocha, M. Martínez, A., Castro, P., Osoro, K. (2005). The effect of post-weaning management on the physico-chemical and textural quality of beef from bulls and steers. XX International Grassland Congress. Dublin. Congress Proc. (pp.190). Eds. O’Mara, F.P., Wilkins, R.J., Mannelje, L. Lovett, D.K., Rogers, P.A.M., Boland, T.M.

Oliván, M., González, J., Bassols, A., Díaz, F., Carreras, R., Mainau, E., Velarde, A. (2018). Effect of sex and RYR1 gene mutation on the muscle proteomic profile and main physiological biomarkers in pigs at slaughter. *Meat Science*, 141, 81–90.

Oliván, M., González, J., Bassols, A., Panella, N., Carreras, R., Vega-Naredo, I., Mainau, E., Arroyo, L, Peña, R., Potes, Y., Coto-Montes, A., Hollung, K., Manteca, X., Velarde, X. (2014): Effect of sex and genotype on stress biomarkers in pigs. *Proceedings of the 60th International Congress of Meat Science and Technology*, Punta del Este, Uruguay.

Oliván, M., Martínez, A., Osoro, K., Sañudo, C., Panea, B., Olleta, J. L., Piedrafita, J. (2004). Effect of muscular hypertrophy on physico-chemical, biochemical and texture traits of meat from yearling bulls. *Meat Science*, 68(4), 567–575.

Oliván, M., Sierra, V., García, P. (2013). Efecto del tiempo de maduración sobre la calidad organoléptica de la carne de vacuno. *Tecnología Agroalimentaria 12*: 45-52 (SERIDA).

Oliveira, O., Antonio, F., Costa, D., John, T., Antonio, O., Costa, D., George, N. (2018). Evaluation of brain damage resulting from penetrating and non – penetrating stunning in Nelore Cattle using pneumatically powered captive bolt guns, 145, 347–351.

Ouali, A. (1992). Proteolytic and physicochemical mechanisms involved in meat texture development. *Biochimie*, 74(3), 251–65.

Ouali, A., Gagaoua, M., Boudida, Y., Becila, S., Boudjellal, A., Herrera-Mendez, C. H., & Sentandreu, M. A. (2013). Biomarkers of meat tenderness: Present knowledge and perspectives in regards to our current understanding of the mechanisms involved. *Meat Science*, 95(4), 854–870.

Ouali, A., Herrera-mendez, C. H., Coulis, G., Becila, S., Boudjellal, A., Aubry, L., & Angel, M. (2006). Meat: Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms, 74, 44–58.

Pancholi, V. (2001). Multifunctional alpha-enolase: Its role in diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58, 902–920.

Panea, B., Olleta, J.L., Sañudo, C., Del Mar Campo, M., Oliver, M.A., Gispert, M., Serra, X., Renand, G., Oliván, M., Jabet, S., García, S., López, M., Izquierdo, M., García-Cachán, M.D., Quintanilla, R., Piedrafita, J. (2018). Effects of breed-production system on collagen, textural, and sensory traits of 10 European beef cattle breeds. *J Texture Stud*, 49(5):528-535.

Park SY, Kwak YS. (2016). Impact of aerobic and anaerobic exercise training on oxidative stress and antioxidant defense in athletes. *J Exerc Rehabil*, 12(2):113-7.

- Park, H., Min, B., & Oh, S. (2017). Research trends in outdoor pig production — A review, 30(9), 1207–1214.
- Partida, J. A. (2007). Effect of social dominance on the meat quality of young Friesian bulls, 76, 266–273.
- Pedersen, B. K., & Febbraio, M. A. (2012). Muscles, exercise and obesity : skeletal muscle. *Nature Reviews Endocrinology*, 8(8), 457–465.
- Pedersen, B.K., Febbraio, M.A. (2008). Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev* 8. 8(4):1379-406.
- Peña, F., Avilés, C., Domenech, V., González, A., Martínez, A., & Molina, A. (2014). Effects of stress by unfamiliar sounds on carcass and meat traits in bulls from three continental beef cattle breeds at different ageing times. *MESC*, 98(4), 718–725.
- Pérez, M. P., Palacio, J., Santolaria, M. P., Aceña, M. C., Chacón, G., Gascón, M., García-Belenguer, S. (2002). Effect of transport time on welfare and meat quality in pigs. *Meat Science*, 61(4), 425–433.
- Petriz, B. A., Gomes, C. P. C., Almeida, Jeaser, A.A., De Oliveira Jr, G. P., Ribeiro, F.M., Pereiro, R.W., Franco, O.L. (2016). The Effects of Acute and Chronic Exercise on Skeletal Muscle Proteome. *J.Cell Physiol*, 232:257-259.
- Phillips, A.G., Vacca, G. and Ahn, S. (2008). A top-down perspective on dopamine, motivation and memory. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 90, 236–249
- Picard, B., & Gagaoua, M. (2017). Chapter 11: Proteomic investigations of beef tenderness. In M. Colgrave (Ed.). *Proteomics in Food Science: From Farm to Fork* (pp. 177–197). Academic Press.
- Picard, B., Berri, C., Lefaucheur, L., Molette, C., Sayd, T. and Terlouw, C. (2010). Skeletal muscle proteomics in livestock production. *Briefings in Functional Genomics* 9, 259–278.
- Picard, B., Gagaoua, M., & Hollung, K. (2017). Chapter 12: Gene and Protein expression as a tool to explain/predict meat (and fish) quality. In P. Purslow (Ed.). *New Aspects of Meat Quality: From Genes to Ethics* (pp. 321–354). Netherlands: Elsevier Science.
- Picard, B., Gagaoua, M., Micol, D., Cassar-Malek, I., Hocquette, J.F., Terlouw, C.E.M. (2014). Inverse relationships between biomarkers and beef tenderness according to contractile and metabolic properties of the muscle. *J Agric Food Chem*, 62: 9808–18.
- Picard, B., Kammoun, M., Gagaoua, M., Barboiron, C., Meunier, B., Cambon, C., & Cassar-Malek, I. (2016). Calcium homeostasis and muscle energy metabolism are modified in HspB1-null mice. *Proteomes*, 4, 17.

- Picard, B., Lebret, B., Cassar-Malek, I., Liaubet, L., Berri, C., Le Bihan-Duval, E., Renand, G. (2015). Recent advances in omic technologies for meat quality management. *Meat Science*, 109, 18–26.
- Piekarzewska, A., Sadowski, B. and Rosochacki, S.J. (1999). Alterations of brain monoamine levels in pigs exposed to acute immobilization stress. *Zentralbl Veterinarmed A* 46, 197–207.
- Pierrefiche, G., Laborit, H. (1995). Oxygen free radicals, melatonin, and aging. *Exp Gerontol*, 30 (3-4): 213-27.
- Pinang, P. (2011). MiniReview: Effect of pre-slaughter animal handling on carcass and meat quality, 491, 485–491.
- Piñeiro, C., Piñeiro, M., Morales, J., Carpintero, C., Campbell, F. M., Eckersall, P. D., Lampreave, F. (2007). Pig acute-phase protein levels after stress induced by changes in the pattern of food administration. *Animal*, 1, 133–139.
- Piñeiro, M., Piñeiro, C., Carpintero, R., Morales, J., Campbell, F. M., Eckersall, P. D., Lampreave, F. (2007). Characterisation of the pig acute phase protein response to road transport. *The Veterinary Journal*, 173, 669–674.
- Polati, R., Menini, M., Robotti, E., Million, R., Marengo, E., Novelli, E., Cecconi, D. (2012). Proteomic changes involved in tenderization of bovine *Longissimus dorsi* muscle during prolonged ageing. *Food Chemistry*, 135, 2052–2069.
- Poletto, R., Cheng, H.W., Meisel, R.L., Garner, J.P., Richert, B.T. and Marchant-Forde, J.N. (2010). Aggressiveness and brain amine concentration in dominant and subordinate finishing pigs fed the beta-adrenoreceptor agonist ractopamine. *Journal of Animal Science* 88, 3107–3120.
- Poletto, R., Cheng, H.W., Meisel, R.L., Richert, B.T. and Marchant-Forde, J.N. (2011). Gene expression of serotonin and dopamine receptors and monoamine oxidase-A in the brain of dominant and subordinate pubertal domestic pigs (*Sus scrofa*) fed a beta-adrenoreceptor agonist. *Brain Research* 1381, 11–20.
- Potes, Y., Oliván, M., Rubio-González, A., de Luxán-Delgado, B., Díaz, F., Sierra, V., Coto-Montes, A. (2017). Pig cognitive bias affects the conversion of muscle into meat by antioxidant and autophagy mechanisms. *Animal*, 1–9
- Prache, S., Cornu, A., Berdagué, J. L., & Priolo, A. (2005). Traceability of animal feeding diet in the meat and milk of small ruminants. *Small Ruminant Research*, 59(2–3 SPEC. ISS.), 157–168.

Pregel, P., & Bollo, E. (2005). Antioxidant capacity as a reliable marker of stress in dairy calves transported by road Short Communications Antioxidant capacity as a reliable marker of. *Veterinary Record*, 156, 53–54.

Priolo, A., Micol, D., & Agabriel, J. (2001). Effects of grass feeding systems on ruminant meat colour and flavour. A review. *Animal Research*, 50(3), 185–200.

Rasmussen, A.J., Andersson, M. (1996). New method for determination of drip loss in pork muscles. In *Proceedings of the 42nd International Congress of Meat Science and Technology*; Lillehammer, Norway, pp. 286–287.

Rees, M. P., Trout, G. R., & Warner, R. D. (2002). Tenderness of pork m. *longissimus thoracis et lumborum* after accelerated boning .Part II: Effect of post-slaughter ageing, 61, 215–224.

Riley, R. R., Smith, G. C., Cross, H. R., Savell, J. W., Long, C. R., & Cartwright, T. C. (1985). Chronological Age and Breed-Type Effects on Carcass Characteristics and Palatability of Bull Beef, 17, 187–198.

Roberts, C.K., Sindhu, K.K. (2009). Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci*, 84 (21-22): 705-12.

Roberts, S. A., Schaefer, A. L., Murray, A. C., & Thibault, L. (1998). Fall and winter hormone concentrations related to stress in pigs identified as normal and carrier for stress susceptibility. *Chronobiology International Journal*, 15, 275–281.

Romero, M.H., Uribe-Velásquez, L.F., Sánchez J.A. (2011): Biomarcadores de estrés como indicadores de bienestar animal en ganado de carne. *Biosalud* 10: 71-87.

Rosenvold, K., Andersen, H.J. (2003). The significance of pre-slaughter stress and diet on colour and colour stability of pork. *Meat Sci*, 63:199-209.

Rubio-Gonzalez, A., Potes, Y., Illan-Rodriguez, D., Vega-Naredo, I., Sierra, V., Caballero, B., Fabrega, E., Velarde, A., Dalmau, A., Oliván, M. and Coto-Montes, A. (2015). Effect of animal mixing as a stressor on biomarkers of autophagy and oxidative stress during pig muscle maturation. *Animal* 9, 1188–1194.

Ryu, Y.C., Choi, Y.M., Kim, B.C. (2005). Variations in metabolite contents and protein denaturation of the longissimus dorsi muscle in various porcine quality classifications and metabolic rates. *Meat Sci*, 71:522-9.

Sabria, J., Torres, D., Pasto, M., Peralba, J.M., Allali-Hassani, A. and Pares, X. (2003). Release of neurotransmitters from rat brain nerve terminals after chronic ethanol ingestion: differential effects in cortex and hippocampus. *Addiction Biology* 8, 287–294.

Saco, Y., Docampo, M. J., Fàbrega, E., Manteca, X., Diestre, A., Lampreave, F., & Bassols, A. (2003). Effect of transport stress on serum haptoglobin and Pig-MAP in pigs. *Animal Welfare*, 12, 403–409.

SADEI, 2017. <http://www.sadei.es/es/cargarAplicacionNovedad.do?identificador=136> [“Fecha consulta”: enero 2019]

Salamano, G., Mellia, E., Candiani, E., Ingravalle, F., Bruno, R., Ru, G., & Doglione, L. (2008). Changes in haptoglobin, C-reactive protein and pig-MAP during a housing period following long distance transport in swine. *The Veterinary Journal*, 177, 110–115.

Salim, S. (2014). Oxidative stress and psychological disorders. *Current Neuropharmacology* 12, 140–147.

Sañudo, C., Macie, E. S., Olleta, J. L., Villarroel, M., Panea, B., & Albertí, P. (2004). The effects of slaughter weight, breed type and ageing time on beef meat quality using two different texture devices. *Meat Science*, 66(4), 925–932.

Schilling, M. W., Suman, S. P., Zhang, X., Nair, M. N., Desai, M. A., Cai, K., Allen, P. J. (2017). Proteomic approach to characterize biochemistry of meat quality defects. *Meat Science*, 132(April), 131–138.

Schreurs, N. M., Lane, G. A., Tavendale, M. H., Barry, T. N., & McNabb, W. C. (2008). Pastoral flavour in meat products from ruminants fed fresh forages and its amelioration by forage condensed tannins. *Animal Feed Science and Technology*, 146(3–4), 193–221.

Sedoris, K. C., Thomas, S. D., & Miller, D. M. (2010). Hypoxia induces differential translation of enolase/MBP-1. *BMC Cancer*, 10, 157.

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

Sevimli, F. K., & Kuş, F. S. (2015). Acute-phase Proteins and Interleukin-6 (L-6) in Cattle Infected with Subclinical Parasitic Infections, 90, 2–7.

Shen, Q. W., Underwood, K. R., Means, W. J., McCormick, R. J., & Du, M. (2007). The halothane gene, energy metabolism, adenosine monophosphate-activated protein kinase, and glycolysis in postmortem pig longissimus dorsi muscle. *Journal of Animal Science*, 85, 1054–1061.

Shorthose, W. R., & Harris, P. V. (1990). Effect of Animal Age on the Tenderness of Selected Beef Muscles. *Journal of Food Science*, 55(1), 1–8.

Sierra, V., Fernández-Suárez, V., Castro, P., Osoro, K., Vega-Naredo, I., García-Macía, M., Oliván, M. (2012). Identification of biomarkers of meat tenderisation and its use for early classification of Asturian beef into fast and late tenderising meat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(13), 2727–2740.

Sierra, V., Oliván, M. (2013): Role of Mitochondria on Muscle Cell Death and Meat Tenderization. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery* 7: 120-129.

Sir, D., Chen, W.L., Choi, J., Wakita, T., Yen, T.S., and Ou, J.H., (2008). Induction of incomplete autophagic response by hepatitis C virus via the unfolded protein response. *Hepatology*, 48, 1054-61.

Sola-Penna, M., Da Silva, D., Coelho, W. S., Marinho-Carvalho, M. M., & Zancan, P. (2010). Regulation of mammalian muscle type 6-Phosphofructo-1-kinase and its implication for the control of the metabolism. *IUBMB Life*, 62, 791–796.

Spanier, A. M., Flares, M., Mcmilli, K. W., & Bidne, T. D. (1997). The effect of post-mortem aging on meat flavor quality in Brangus beef. Correlation of treatments, sensory, instrumental and chemical descriptors, 59(4), 3–4.

Støier, S., Aaslyng, M.D., Olsen, E.V., Henckel, P. (2001). The effect of stress during lairage and stunning on muscle metabolism and drip loss in Danish pork. *Meat Sci*, 59: 127-31.

Sullivan, A. O., Sullivan, K. O., Galvin, K., Moloney, A. P., Troy, D. J., Kerry, J. P., Kerry, J. P. (2004). Influence of concentrate composition and forage type on retail packaged beef quality. Influence of concentrate composition and forage type on retail packaged beef quality, 2384–2391.

Tarrant, P. V. (1989). Animal behaviour and environment in the dark-cutting condition in beef - A review. *Irish Journal of Food Science and Technology*, 13(1), 1–21.

Tarrant, P. V. (1990). Transportation of cattle by road. *Applied Animal Behaviour Science*, 28, 153–170.

Tarze, A., Deniaud, A., Le Bras, M., Maillier, E., Molle, D., Larochette, N., Brenner, C. (2007). GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. *Oncogene*, 26, 2606–2620.

Taylor, P. (2009). Influence of Pre-Slaughter Process on Pork Quality : An Overview Influence of Pre-Slaughter Process on Pork Quality.

Te Pas, M. F. W., Hoekman, A. J. W., & Smits, M. A. (2011). Biomarkers as management tools for industries in the pork production chain. *Journal on Chain and Network Science*, 11, 155–166.

Te Pas, M. F. W., Kruijt, L., Pierzchala, M., Crump, R. E., Boeren, S., Keuning, E., Mulder, H. A. (2013). Identification of proteomic biomarkers in M. Longissimus dorsi as potential predictors of pork quality. *Meat Science*, 95(3), 679–687.

TePas, M. F. W., Lebret, B., & Oksbjerg, N. (2017). Measurable biomarkers linked to meat quality from different pig production systems. *Archives Animal Breeding*, 60, 271–283.

Terlouw, E. M. C., Arnould, C., Auperin, B., Berri, C., Le Bihan-Duval, E., Deiss, V., Mounier, L. (2008). Pre-slaughter conditions, animal stress and welfare: Current status and possible future research. *Animal*, 2(10), 1501–1517.

Terlouw, E. M. C., Arnould, C., Auperin, B., Berri, C., Le Bihan-Duval, E., Deiss, V., Mounier, L. (2008). Pre-slaughter conditions, animal stress and welfare: Current status and possible future research. *Animal*, 2(10), 1501–1517.

Terlouw, E.M.C. (2005). Stress reactions at slaughter and meat quality in pigs: Genetic background and prior experience: A brief review of recent findings. *Livestock Production Science*, 94, 125–135.

Terlouw, E.M.C., & Rybarczyk, P. (2008). Explaining and predicting differences in meat quality through stress reactions at slaughter: The case of Large White and Duroc pigs. *Meat Science*, 79, 795–805.

Terlouw, E.M.C., Porcher, J., Fernandez, X. (2005). Repeated handling of pigs during rearing. II. Effect of reactivity to humans on aggression during mixing and on meat quality. *J Anim Sci*, 83:1664–72.

Tørngren, M. A., Darré, M., Gunvig, A., & Bardenshtein, A. (2018). PT. *Meat Science*. Elsevier Ltd.

Tothova, C., Nagy, O., & Kovac, G. (2014). Acute phase proteins and their use in the diagnosis of diseases in ruminants : a review (1), 163–180.

Treves, S., Anderson, A. A., Ducreux, S., Divet, A., Bleunven, C., Grasso, C., Zorzato, F. (2005). Ryanodine receptor 1 mutations, dysregulation of calcium homeostasis and neuromuscular disorders. *Neuromuscular Disorders*, 15, 577–587.

Trevisi, E., & Bertoni, G. (2009). Some physiological and biochemical methods for acute and chronic stress evaluation in dairy cows. *Italian Journal of Animal Science*, 8 (sup1), 265–286.

Tskhovrebova, L., & Trinick, J. (2012). Making Muscle Elastic : The Structural Basis of Myomesin Stretching, 10(2).

- Turrens JF. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, 552(Pt 2): 335-44.
- Van den Maagdenberg, K., Stinckens, A., Lefaucheur, L., Buys, N., & De Smet, S. (2008). The effect of mutations in the insulin-like growth factor-II and ryanodine receptor-1 genes on biochemical and histochemical muscle fibre characteristics in pigs. *Meat Science*, 79, 757–766.
- Vega-Naredo, I., Caballero, B., Sierra, V., García-Macia, M., De Gonzalo-Calvo, D., Oliveira, P. J., Coto-Montes, A. (2012). Melatonin modulates autophagy through a redox-mediated action in female Syrian hamster Harderian gland controlling cell types and gland activity. *Journal of Pineal Research*, 52 (1), 80–92.
- Velarde, A., & Dalmau, A. (2012). Animal welfare assessment at slaughter in Europe: Moving from inputs to outputs. *Meat Science*, 92(3), 244–251.
- Velarde, A., & Dalmau, A. (2017). Slaughter of pigs. *Advances in Pig Welfare*. Elsevier Ltd.
- Velarde, A., Gispert, M., Faucitano, L., Manteca, X., & Diestre, A. (2000). The effect of stunning method on the incidence of PSE meat and haemorrhages in pork carcasses. *Meat Science*, 55(3), 309–314.
- Vestergaard, K.S., Skadhauge, E., Lawson, L.G. (1997). The stress of not being able to perform dustbathing in laying hens. *Physiol Behav*, 62(2): 413-9.
- Vestergaard, M., Therkildsen, M., Henckel, P., Jensen, L.R., Andersen, H.R., Sejrsen, K. (2000). Influence of feeding intensity, grazing and finishing feeding on meat and eating quality of young bulls and the relationship between muscle fibre characteristics, fibre fragmentation and meat tenderness. *Meat Science*, 54(2):187-95.
- Wang, L., Yu, Q., Han, L., Ma, X., Song, R., & Zhao, S. (2018). Study on the effect of reactive oxygen species-mediated oxidative stress on the activation of mitochondrial apoptosis and the tenderness of yak meat. *Food Chemistry*, 244, 394–402.
- Warren, H. E., Scollan, N. D., Enser, M., Hughes, S. I., Richardson, R. I., & Wood, J. D. (2008). Effects of breed and a concentrate or grass silage diet on beef quality in cattle of 3 ages. I: Animal performance, carcass quality and muscle fatty acid composition. *Meat Science*, 78(3), 256–269.
- Warriss, P. D. (1990). The handling of cattle pre-slaughter and its effects on carcass and meat quality. *Applied Animal Behaviour Science*, 28 (1–2), 171–186.
- Warriss, P. D. (2000). *Meat science: an introductory text*. Wallingford, Oxon, UK: CABI Publishing.

- Warriss, P.D., Brown, S.N. (1985). The physiological responses to fighting in pigs and the consequences for meat quality. *J Sci Food Agric*, 36:87–92.
- Weaver, A. D., Bowker, B. C., & Gerrard, D. E. (2008). Sarcomere length influences postmortem proteolysis of excised bovine semitendinosus muscle. *Journal of Animal Science*, 86(8), 1925–1932.
- White, H.M., Richert, B.T., Latour, M.A. (2013). Impacts of nutrition and environmental stressors on lipid metabolism. In: *Lipid Metabolism*. Valenzuela R, editor. InTech.
- Whitham, M., & Febbraio, M. A. (2016). Therapeutic implications. *Nature Publishing Group. Nature Reviews Drug Discovery* 15, 719–729
- Whitham, M., Parker, B. L., Friedrichsen, M., James, D. E., Febbraio, M. A., Whitham, M., Hughes, W. E. (2018). Extracellular Vesicles Provide a Means for Tissue Crosstalk during Exercise. *Cell Metabolism*, 27(1), 237–251.
- Wiener, P., Woolliams, J. A., Frank-Lawale, A., Ryan, M., Richardson, R. I., Nute, G. R., ... Williams, J. L. (2009). The effects of a mutation in the myostatin gene on meat and carcass quality. *Meat Science*, 83(1), 127–134.
- Wulff, T., Jokumsen, A., Højrup, P., & Jessen, F. (2012). Time-dependent changes in protein expression in rainbow trout muscle following hypoxia. *Journal of Proteomics*, 75, 2342–2351.
- Xiong, Y. L., Mullins, O. E., Stika, J. F., Chen, J., Blanchard, S. P., & Moody, W. G. (2007). Tenderness and oxidative stability of post-mortem muscles from mature cows of various ages. *Meat Science*, 77(1 SPEC. ISS.), 105–113.
- Yeates, J.W. and Main, D.C. (2008). Assessment of positive welfare: a review. *Veterinary Journal* 175, 293–300
- Zhang, Y.-Y., Zan, L.-S., Wang, H.-B., Xin, Y.-P., Adoligbe, C. M., & Ujan, J. A. (2010). Effect of sex on meat quality characteristics of Qinchuan cattle. *African Journal of Biotechnology*, 9(28), 4504–4509.

CAPÍTULO 10: ANEXOS

Se adjuntan los 3 artículos publicados que forman parte de esta Tesis Doctoral:

Oliván, M., González, J., Bassols, A., Díaz, F., Carreras, R., Mainau, E., Velarde, A. (2018). Effect of sex and RYR1 gene mutation on the muscle proteomic profile and main physiological biomarkers in pigs at slaughter. *Meat Science*, 141, 81-90.

Potes, Y., Oliván, M., Rubio-González, A., de Luxán-Delgado, B., Díaz, F., Sierra, V., Coto-Montes, A. (2017). Pig cognitive bias affects the conversion of muscle into meat by antioxidant and autophagy mechanisms. *Animal*, 1-9.

Oliván, M., Fernández-Suárez, V., Díaz, F., Sierra, V., Coto-Montes, A., Luxán-Delgado, B., Velarde, A. (2016). Identification of Biomarkers of Stress in Meat of Pigs Managed under Different Mixing Treatments. *British Biotechnology Journal*, 11(1), 1-13.



Effect of sex and RYR1 gene mutation on the muscle proteomic profile and main physiological biomarkers in pigs at slaughter[☆]

Mamen Oliván^{a,*}, Joel González^b, Anna Bassols^c, Fernando Díaz^a, Ricard Carreras^b, Eva Mainau^b, Laura Arroyo^c, Raquel Peña^c, Yaiza Potes^d, Ana Coto-Montes^d, Kristin Hollung^e, Antonio Velarde^b

^a SERIDA, Apdo 13, 33300 Villaviciosa, Asturias, Spain

^b IRTA, Finca Camps i Armet s/n, 17121 Monells, Spain

^c Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès, Spain

^d Universidad de Oviedo, C/Julían Clavería s/n, 33006 Oviedo, Asturias, Spain

^e Nofima, AS, PO BOX 210, N-1431 Aas, Norway

ARTICLE INFO

Keywords:

Sex
RYR1
Pig
Biomarker
Proteomics
Stress

ABSTRACT

Gender and RYR1 gene mutation might have an effect on the muscle metabolic characteristics and on the animal's stress at slaughter, which could influence the process of muscle-to-meat conversion. Forty-eight pigs were distributed in a design including two factors: sex (male/female) and RYR1 genotype (NN/Nn). At slaughter, physiological blood biomarkers and muscle proteome were analyzed and carcass and meat quality traits were registered. Females had higher serum levels of glucose, urea, C-reactive protein “CRP”, Pig-MAP and glutation-peroxidase “GPx” and lower levels of lactate, showed faster muscle pH decline and higher meat exudation. RYR1 mutation increased serum creatinine, creatine kinase and CRP and decreased GPx. The proteomic study highlighted significant effects of gender and RYR1 genotype on proteins related to fibre composition, antioxidant defense and *post mortem* glycolytic pathway, which correlate to differences of meat quality. This study provides interesting information on muscle biomarkers of the ultimate meat quality that are modulated by the animal's individual susceptibility to stress at slaughter.

1. Introduction

Meat quality should be considered as a multifactorial trait, including technological, nutritional, sensory, safety and ethical aspects, and is affected by several factors, such as the genetic animal type, the particularities of the production system, the physiological response of the animals to the *ante mortem* treatment and the *post mortem* conditioning of the carcasses, among others.

The effect of gender on the pig carcass development has been described in the literature. In general, males present less accumulation of fat tissues (Gispert et al., 2010), but there is still controversy about the effect of gender on the incidence of pale, soft and exudative (PSE) meat, with some studies showing significant effects (Cisneros, Ellis, McKeith, McCaw, & Fernando, 1996; Channon, Kerr, & Walker, 2004) whereas others did not (Blanchard, Warkup, Ellis, Willis, & Avery, 1999; Channon, Payne, & Warner, 2000). These differences between experiments could be due in part to different *ante mortem* handling conditions, which may influence the animal stress reactions at slaughter and could have consequences on the ultimate meat quality (Boler et al., 2010;

Hambrecht et al., 2005a,b; Terlouw & Rybarczyk, 2008; D'Eath et al., 2010).

The most usual crossbreeds used in Spain includes the Pietrain sire line, presenting in most cases heterozygosity (Nn) to the mutated RYR1 gene. Mutations in the RYR1 gene have been related to higher susceptibility to stressful conditions and to the induction of malignant hyperthermia in pigs (Fujii et al., 1991), with detrimental effects on meat quality (Fàbrega et al., 2004).

Then, pigs of different sex and genetic types may respond differently to pre-slaughter handling, which may affect the *post mortem* process of muscle-to-meat conversion. This process implies complex biochemical mechanisms that are to a large extent dependent on the genetic background, the tissue physiological milieu and the animal's perception of danger or fear during the slaughter procedure.

To date, there is still no precise definition of animal stress, probably due to the complexity of different physical and psychological stressful situations, although it can be described as “the physiological, behavioural and psychological state of the animal when confronted with, from the animal's point of view, a potentially threatening situation”

[☆] Preliminary data from this work were partially presented at the International Congress of Meat Science and Technology (ICOMST) held at Punta del Este, Uruguay, on August 2014.

* Corresponding author.

E-mail address: mcolivan@serida.org (M. Oliván).

(Terlouw, 2005).

Furthermore, it is important to note that the stress level of the animal depends indirectly on the situation and directly on the animal's evaluation of the situation (Terlouw, 2005). For this reason, meat scientists show increasing interest in the identification of animal-based biomarkers that could be indicators of stress at slaughter and even that could be used as indirect predictors of the ultimate meat quality. In this field, proteomics is a promising tool, although its application is still in its infancy and very few studies have focused on stress-dependent muscle proteome changes (Franco et al., 2015; Oliván et al., 2016). The objective of this work was to investigate the effect of gender (Male/Female) and RYR1 genotype (NN/Nn) on physiological, biochemical and proteomic variables detected in the carcass that might influence the process of meat quality acquisition and reflect animal's susceptibility to stress at slaughter.

2. Materials and methods

This study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of IRTA (Monells, Spain). The care and use of animals were performed in accordance with the European Union Directive 2010/63 on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes (EU, 2010).

2.1. Animals and management procedures

Forty-eight crossbred pigs ([Large White × Landrace] sows sired with Pietrain boars) were randomly selected at a commercial farm and assigned to four groups of 12 pigs each one. Each group either consisted of NN females, NN entire males, Nn females and Nn entire males. The RYR1 genotype of the pigs was determined from a hair sample using PCR (polymerase chain reaction) amplification and digestion with restriction enzymes as described by Fujii et al. (1991) when pigs aged 5 weeks.

At 9 weeks of age, pigs were transported from the commercial farm to the experimental facilities of IRTA and housed separately by treatment (sex × genotype) in 8 pens (6 pigs per pen), that is, two replicas per treatment. Pigs were kept in pens (5 × 2.7 m) on fully slatted floor under natural light conditions and at a constant environmental temperature of 22 ± 3 °C. Each pen was provided with one steel drinker bowl (15 × 16 cm) connected to a nipple and with a concrete feeder (58 × 34 cm) with four feeding places. Pigs had water and feed *ad libitum*. Pigs were inspected daily and no health problems were observed during the experimental period. At an average weight of 111.4 ± 10.5 kg the pigs were fasted for 8 h before being transported to the experimental slaughterhouse of IRTA (1.2 km trip), without mixing groups. Animals were gently handled during transport and at the slaughterhouse to avoid additional stress. There were two slaughter batches, in two consecutive weeks, including 24 animals per day. Slaughtering started 30 min after the animals arrived at the lairage pens and lasted for 3 h. Pigs were stunned by exposure to 90% of carbon dioxide (CO₂) by volume in atmospheric air during 3 min and exsanguinated afterwards.

2.2. Blood collection

At the slaughterhouse, blood samples were collected at exsanguination from each pig in 10-mL tubes without anticoagulant. Serum were obtained by centrifugation at 2000 × g for 10 min and immediately frozen at –80 °C until analysis.

2.3. Biochemical and physiological parameters

Metabolites analyzed were:

- Markers for glucose utilization: glucose (Hexokinase method, Olympus System Reagent OSR), lactate (Enzymatic method LOD

- Lactate Oxidase-, Olympus System Reagent OSR).
- Markers of nitrogen metabolism: creatinine (Jaffé method, Olympus System Reagent OSR), urea (GLDH method, Olympus System Reagent OSR), total proteins (Biuret method, Olympus System Reagent OSR).
- Lipid metabolism markers: triglycerides (GPO-PAP method, Olympus System Reagent OSR), total cholesterol (CHOP-PAP method, Olympus System Reagent OSR), HDL-cholesterol (HDL-chol, Immunoinhibition method, Olympus System Reagent OSR), LDL-cholesterol (LDL-chol, Selective protection method, Olympus System Reagent OSR), non-esterified fatty acids (NEFAs, NEFA-C reagent, Wako Chemicals) and 3-hydroxybutyrate (BHB, Ranbut reagent, Randox Laboratories, Ltd).
- Acute phase proteins “APPs” as inflammatory markers: haptoglobin (Phase Haptoglobin, Tridelta Ltd), C-reactive protein (CRP, immunoturbidimetric method, Olympus Systems Reagent) and Pig-MAP (ELISA, PigChamp ProEuropa).
- Skeletal muscle marker: creatine kinase (CK, IFCC method, Olympus System Reagent OSR).
- Oxidative stress marker: glutathione peroxidase GPx (Cumene Hydroperoxyde method, Ransel, Randox Laboratories Ltd).
- Stress hormone: cortisol (ELISA, DRG Diagnostics, Germany).

All parameters were determined by spectrophotometric techniques in the analyzer Olympus AU400, with the exception of Pig-MAP and cortisol, which were determined by ELISA.

2.4. Carcass measurements and meat sampling

The skin lesions in each pig were assessed using the Welfare Quality® protocol (Dalmáu, Temple, Rodríguez, Llonch, & Velarde, 2009) considering 5 regions (ears, front, middle, hind-quarters and legs) in one side of the carcass after scalding. Values of 0 (< 2 lesions in all regions), 1 (2–10 lesions in at least one region) and 2 (> 10 lesions in at least one region) were used by a trained observer at the slaughter line.

The left side of each carcass was used to assess meat quality. Muscle pH was measured at 45 min (pH 45) and at 24 h (pH 24) *post mortem* on the *longissimus thoracis* (LT) muscle, using a Crison (Hach Lange S.L.U., Spain) portable meter equipped with a xerolyt electrode. Electrical conductivity (EC) was also measured at 24 h *post mortem* on the same location using a Pork Quality Meter (PQM-I, INTEK Aichach, Germany).

Meat samples (20 g) were taken after slaughter (15–20 min *post mortem*) from the LT muscle of each pig at the last rib level for analysis of electrophoretic protein profile of sarcoplasmic extracts by SDS-PAGE. These muscle samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C until analyzed.

Meat color was determined using a colorimeter Minolta CR-400 (Konica Minolta Holdings, Inc., Japan) measuring in the CIELAB space (L*, a*, b*), at 24 h *post mortem* on the exposed cut surface of the LT muscle (last rib) after 15 min blooming.

Meat drip loss (% exudates) was determined by duplicate on 25 mm diameter fresh samples taken from the LT muscle at 24 h *post mortem*, and placed on a special container (Meat juice collector, Sarstedt, Nümbrecht, Germany) during 24 h at 4 °C, obtaining the drip loss percentage by gravimetry, according to the method described by Rasmussen and Andersson (1996).

Instrumental texture was determined in LT samples by using the Warner Bratzler test, following the procedures described in Ampuero-Kragten and Gil (2015). Samples were vacuum packaged at 24 h *post mortem* and stored at 4 °C, and they were frozen (–20 °C) after 1, 3 and 5 d aging to allow muscle tenderization. Each sample was thawed overnight at 4 °C, cooked in an oven until a core temperature of 71 °C, and then 5 subsamples were obtained by using a perforating punch. These subsamples were individually analyzed for instrumental toughness (maximum shear force, in kg) with the TA.XT plus Texture

Analyzer (Stable Microsystems, Haslemere, UK) and the mean value for each animal was calculated.

2.5. Sarcoplasmic protein extraction and electrophoresis

The sarcoplasmic protein fraction, which contains most of the enzymes of the glycolytic pathway and other metabolic proteins (Hollung, Veiseth, Jia, Færgestad, & Hildrum, 2007), were extracted from each individual muscle sample (one per animal), taken immediately after slaughter, and quantified following the method described by Jia et al. (2009). A total of 600 mg of muscle tissue was dissected and homogenized in 2 mL of Tris-EDTA-Sucrose “TES” buffer (10 mM Tris [pH 7.6], 1 mM EDTA, and 0.25 M sucrose), using a Polytron PT1200 E (Kinematica Inc., Luzern, Switzerland) three times for 15 s at maximum speed. The homogenate was centrifuged (30 min at 8800 × g) at 4 °C to remove TES-insoluble proteins. Protein concentrations were measured with a commercial kit at 760 nm (RC DC Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) in a spectrophotometer Lambda 35 UV/VIS (Perkin Elmer, Massachusetts, USA) using bovine serum albumin as standard.

Then, 120 µg of proteins were denatured by mixing with sample buffer (62.5 mM Tris/HCl pH 6.8, 2% SDS, 20% glycerol, 5% mercaptoethanol, 0.025% of bromophenol blue) and heated at 95 °C for 5 min, and loaded to 1 mm dual vertical slab gels (Xi Protean II, Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA) for one-dimensional sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), according to the procedure described by Sierra et al. (2012). The resolving gel contained 11% and the stacking gel 4% of 30% (wt/vol) acrylamide: bisacrylamide and a mixture of Tris/HCl (375 mM) pH 8.8, milli-Q water, SDS 10% (wt/vol), ammonium persulphate 10% (wt/vol), and 0.1% TEMED. Pre-stained molecular weight standards (Precision Plus Protein All Blue Standards, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA) were also run on each gel to determine protein band molecular weights. Gels (20 cm × 20 cm size) were run at 80 V for 2 h, 160 V for 2 h, 250 V for 10 h and 500 V for 20 min (Universal PowerPack 500, Bio-Rad), stained in a mixture of 30% (vol/vol) methanol, 10% (vol/vol) acetic acid and 0.01% (wt/vol) Coomassie Brilliant Blue R-250 and destained using a mixture of 40% (vol/vol) methanol and 10% (vol/vol) acetic acid.

Three gels were produced per muscle sample and the mean value was calculated for each animal with image analysis techniques.

2.6. Image analysis and protein identification by peptide mass fingerprint

Stained gel images were captured using the UMAX ImageScanner (Amersham Biosciences). SDS-PAGE densitometry analysis and band quantitation were carried out using the ImageQuant TL software by means of its 1D gel analysis tool (version 7.0, GEHealthcare, Buckinghamshire, UK). To account for slight variations in protein loading, the density protein bands was expressed as relative abundance (normalized volume) and expressed in arbitrary units.

Protein bands were manually excised from gels and sent for identification to the proteomics laboratory of Inbiotec S.L. (León, Spain). The proteins were digested following the method of Havlis, Thomas, Sebela, and Shevchenko (2003) and processed for further analysis as indicated by Jami, Barreiro, García-Estrada, and Martín (2010). The samples were analyzed with a 4800 Proteomics Analyzer matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF/TOF) mass spectrometer (ABSciex, MA, USA). A 4700 proteomics analyzer calibration mixture (Cal Mix 5, ABSciex) was used as external calibration. All MS spectra were internally calibrated using peptides from the trypsin digestion. The analysis by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry produced peptide mass fingerprints, and the peptides observed (up to 65 peptides per spot) were collected and represented as a list of monoisotopic molecular weights with a signal to noise (S/N) ratio > 20 using the 4000 Series Explorer v3.5.3 software (ABSciex). All known contaminant ions (trypsin- and keratin- derived peptides) were

excluded for later MS/MS analysis. Hence, from each MS spectra, the 10 most intensive precursors with a S/N > 20 were selected for MS/MS analyses with CID (atmospheric gas was used) in 2-kV ion reflector mode and precursor mass windows of ± 7 Da. The default calibration was optimized for the MS/MS spectra. For protein identification, Mascot Generic Files combining MS and MS/MS spectra were automatically created and used to interrogate a non-redundant protein database using a local license of Mascot v 2.2 from Matrix Science through the Global Protein Server v 3.6 (ABSciex). The search parameters for peptide mass fingerprints and tandem MS spectra obtained were set as follows: i) NCBI nr (2012.09.13) sequence databases were used; ii) taxonomy: All entries (20363435 sequences, 698606206 residues); iii) fixed and variable modifications were considered (Cys as S carbamidomethyl derivative and Met as oxidized methionine); iv) one missed cleavage site was allowed; v) precursor tolerance was 100 ppm and MS/MS fragment tolerance was 0.3 Da; vi) peptide charge: 1+; and vii) the algorithm was set to use trypsin as the enzyme. Protein candidates produced by this combined peptide mass fingerprinting/tandem MS search were considered valid when the global Mascot score was > 85 with a significance level of $P < 0.05$.

2.7. Statistical analysis

The effect of sex (M/F) and genotype (NN/Nn) on carcass and meat quality traits, blood biochemical and muscle proteomic variables was analyzed by Analysis of Variance (ANOVA) using the General Linear Model (GLM) procedure of SPSS (v 15.0 2006, SPSS Inc., Chicago, USA). The model included sex, genotype and its interaction as fixed factors and slaughter day (batch) as random factor. When the interaction was significant, the differences between the four treatments (M-NN, M-Nn, F-NN, F-Nn) were analyzed by the Tukey post-hoc test. The *post mortem* evolution of meat toughness (Warner Bratzler maximum shear force) was analyzed by GLM including sex, genotype, aging time and their interactions as fixed factors and animal as random factor. Bivariate correlations were calculated using Pearson's correlation coefficient.

Furthermore, multivariate analysis (PCA) was performed in order to study the relationships between meat quality and physiological, biochemical and proteomic variables obtained for every animal studied, by using XLStat software (XLStat 2013, Addinsoft Inc., Paris, France). The Kaiser-Meyer-Olkin test was performed in order to measure sampling adequacy for each variable in the model, and only variables with KMO over 0.6 were selected. The overall KMO measure of the performed PCA was 0.725.

3. Results and discussion

3.1. Carcass and meat quality

Female pigs showed lower muscle pH than entire males (Table 1), with significant differences at 45 min *post mortem* ($P = 0.002$). This agrees with D'Souza and Mullan (2002) and D'Eath et al. (2010), who found lower pH ($P = 0.006$) in the loin muscle of females compared with castrated pigs. These differences may be in part due to physiological and metabolic differences in the cell response, indicating in some extent higher susceptibility of females to stress at slaughter. This is a controversial issue, as it has been postulated that entire male pigs are more susceptible to stress, because they show more aggressive behavior than females and castrates (Fàbrega et al., 2010), while in cattle Tarrant (1990) showed that females and young animals are more susceptible to stress compared to males and older animals.

When looking to the effect of genotype, we found that the *post mortem* muscle pH decline was faster in animals heterozygous for the RYR1 mutation (Nn), that showed significantly ($P < 0.001$) lower pH at 45 min *post mortem*, while the ultimate pH did not differ between genotypes (Table 1), so the pH amplitude (45 min–24 h) was lower in

Table 1

Least squares means and the effect of sex (S) and RYR1 genotype (G) and its interaction (S*G) on carcass and meat quality traits.

Sex	Male		Female		SEM ¹	P-value		
	NN	Nn	NN	Nn		S	G	S*G
Temperature (°C)	37.37	37.38	37.10	39.47	1.386	0.7173	0.1332	0.2221
Skin lesions	0.33	0.67	0.5	0.33	0.552	0.6034	0.6034	1.000
pH 45	6.57	6.32	6.42	6.13	0.171	0.0021	< 0.0001	0.3318
pH 24	5.50	5.50	5.44	5.43	0.070	0.2909	0.2558	0.6532
pH amplitude (pH 45-pH 24)	1.075	0.820	0.987	0.703	0.094	0.2881	0.0102	0.8824
EC ² (mS)	4.11	6.12	5.94	7.20	2.099	0.1088	0.0144	0.3219
Drip loss (%)	4.48	5.48	4.92	7.21	1.679	0.1887	< 0.0001	0.9829
L*	50.54	49.16	49.47	50.92	2.044	0.5354	0.553	0.0758
a*	6.97 ^c	6.33 ^a	6.77 ^b	6.56 ^b	0.692	0.8748	0.0064	0.0403
b*	2.18 ^b	1.54 ^a	2.05 ^b	2.24 ^b	0.734	0.7904	0.109	0.015
WBSF ³ -1d	4.91	5.10	4.17	5.19	0.920	0.3216	0.0326	0.9375
WBSF ³ -3d	4.22	4.22	3.72	4.54	0.706	0.655	0.0029	0.8014
WBSF ³ -5d	3.80	4.01	3.60	4.70	0.598	0.5445	0.0005	0.5598

Means in the same row followed by different superscripts are significantly different at $P < 0.05$.¹ SEM: standard error of means.² EC: electrical conductivity.³ WBSF: Warner-Braztler shear force at 1, 3 or 5 days *post mortem*.the Nn group (0.76 vs 1.03 for Nn and NN, respectively, $P < .05$).

Furthermore, Nn animals produced meat with higher values of electrical conductivity (EC) ($P < 0.05$) and also higher drip loss ($P < 0.001$). Thus, the pH amplitude correlated negatively with EC ($r = -0.702$, $P < 0.001$) and drip loss ($r = -0.726$, $P < 0.001$) and EC and drip loss showed a positive and significant correlation ($r = 0.858$, $P < 0.001$). These differences seem to indicate *post mortem* muscle metabolic differences due to the RYR1 mutation but also might be modulated by a higher susceptibility to stress at slaughter in Nn pigs, which have more intense reaction to stress than NN animals (Roberts, Schaefer, Murray, & Thibault, 1998). This effect could produce higher leakage of calcium to the cytoplasm and the accompanied calcium related effects (e.g. muscle contraction, stimulation of the muscle metabolism) resulting in a rapid reduction of the pH - due to the lactic acidosis - and an increase of the electrical conductivity, as shown in previous reports (Depreux, Grant, & Gerrard, 2002; Fernandez, Neyraud, Astruc, & Sante, 2002; Krschek, Natter, Wigger, & Wicke, 2011; Shen, Underwood, Means, McCormick, & Du, 2007).

Consequences of this calcium-related metabolic changes are often increasing drip loss and higher meat lightness (L^*), although the results found in the literature depend on the particularities of every experiment (stress level and duration, animal's evaluation of the situation), the intrinsic characteristics of the muscle (glycogen reserves, antioxidant status) and the resulting *post mortem* rate of pH decline and protein denaturation. In our work, the component L^* did not show any significance for the analyzed factors, which is in accordance with some reports (Channon et al., 2000; D'Souza, Dunshea, Warner, & Leury, 1998; Hambrecht et al., 2005a) but contrary to others (Terlouw & Rybarczyk, 2008; Boler et al., 2010; Edwards, Engle, et al., 2010; Edwards, Grandin, et al., 2010; Dokmanovic et al., 2015) which clearly reflects the complexity of the processes involved. Nevertheless, other meat color traits, such as a^* , was significantly reduced in the Nn genotype ($P < 0.01$), which could be result of higher *post mortem* protein denaturation and/or proteolysis (Kazemi, Ngadi and Gariépy et al., 2011). This effect was significantly higher in males than in females, and the same effect was observed for b^* coordinate, for this reason there was a significant interaction of sex and genotype on meat color variables a^* and b^* (Table 1).

Another key quality trait, such as meat toughness, was significantly affected by RYR1 genotype ($P < 0.05$), with Nn animals exhibiting tougher meat (higher shear force) along the process of meat aging (1 to 5 d *post mortem*, see Fig. 1), which agrees with previous reports that described higher shear force and less tender meat in Nn than in halothane free (NN) pigs (Channon et al., 2000; Fernández et al., 2002;

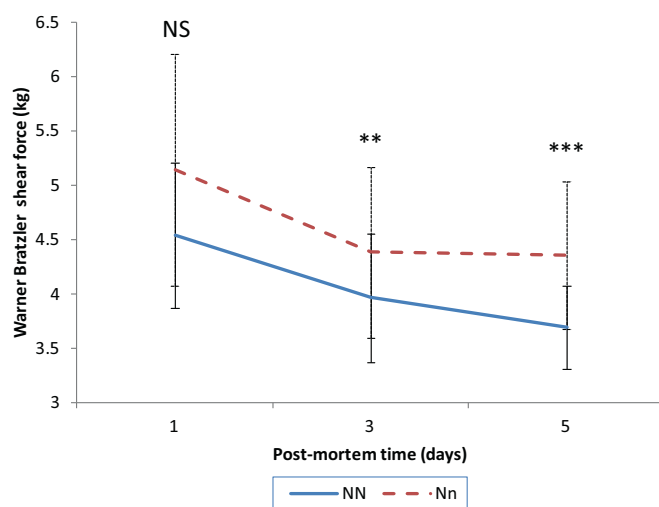


Fig. 1. Effect of RYR1 mutation (NN: halothane free, Nn: gene mutation carrier) on the *post mortem* evolution of meat toughness, measured as maximum Warner Bratzler shear force (means \pm S.E.). Significances: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, NS: $P > 0.05$.

Van den Maagdenberg, Stinckens, Lefaucheur, Buys, & De Smet, 2008).

Furthermore, our results indicate increasing differences of shear force between genotypes as the process of meat tenderization progressed (Fig. 1), although the interaction between RYR1 genotype and aging time was not significant ($P = 0.737$). Obviously, meat tenderness tended to increase as aging time increased in all meat types, but the effect of the RYR1 mutation on meat toughness is probably related to differences in the *post mortem* metabolism. All data recorded in this work (faster pH decline, higher drip loss) indicate a fast *post mortem* metabolism in the muscle of Nn pigs, confirmed in previous works, such as the one by Cheah, Cheah, and Krausgrill (1995), who observed higher sarcoplasmic levels of calcium *in vivo* in the muscle from Nn animals in contrast with NN, possibly causing a faster than normal rate of *post mortem* muscle glycolysis in these pigs. In the same way, Depreux et al. (2002) described a higher proportion of glycolytic fibres in the muscle of Nn genotype than NN, expecting a more rapid *post mortem* pH decrease. This could imply a higher rate of exhaustion of enzymes implicated in meat tenderization and therefore shorter tenderization process. This agrees with previous histological and histochemical investigations that have revealed increased fibre diameter and increased

Table 2

Least squares means and the effect of sex (S) and RYR1 genotype (G) and its interaction (S*G) on serum biochemical variables at slaughter.

Sex	Male		Female		SEM ¹	P-value		
	NN	Nn	NN	Nn		S	G	S*G
Glucose, mg/dL	286.25	330.51	366.91	349.62	14.676	0.019	0.523	0.138
Lactate, mmol/L	10.61	10.37	8.53	9.35	0.432	0.013	0.622	0.377
Creatinine, mg/dL	1.88	2.03	2.00	2.06	0.034	0.123	0.035	0.329
Urea, mg/dL	27.08	25.31	37.90	32.69	1.473	< 0.001	0.097	0.409
Total proteins, g/dL	6.84	6.66	6.85	6.82	0.066	0.396	0.258	0.434
Triglycerids, mg/dL	47.92	51.75	49.64	55.25	2.283	0.401	0.155	0.806
Cholesterol, mg/dL	90.33	87.43	92.15	95.64	1.811	0.053	0.919	0.219
HDL-cho ² , mmol/L	1.14	1.14	1.16	1.21	0.017	0.072	0.238	0.238
LDL-cho ³ , mmol/L	1.35	1.26	1.32	1.33	0.031	0.602	0.304	0.288
NEFAs ⁴ , mmol/L	0.080	0.082	0.085	0.067	0.008	0.657	0.426	0.342
BHB ⁵ , mmol/L	0.072	0.085	0.081	0.077	0.005	0.933	0.511	0.279
Haptoglobin, mg/mL	0.174	0.408	0.523	0.474	0.085	0.091	0.437	0.245
CRP ⁶ , µg/mL	4.35	10.05	10.56	12.35	1.246	0.018	0.039	0.261
Pig-MAP, mg/mL	0.62	0.58	0.96	0.72	0.049	0.001	0.050	0.163
CK ⁷ , U/L	1844.58	3024.42	1920.36	4368.08	277.388	0.065	< 0.001	0.125
GPx ⁸ , U/L	8321.42 ^a	8855.58 ^a	14,481.55 ^b	8670.33 ^a	683.073	0.003	0.009	0.002
Cortisol, ng/mL	39.03	38.95	30.92	43.37	2.869	0.670	0.139	0.134

Means in the same row followed by different superscripts are significantly different at $P < 0.05$.¹ SEM: standard error of means.² HDL-cho: High density lipoproteins-cholesterol.³ LDL-cho: High density lipoproteins-cholesterol.⁴ NEFAs: non-esterified fatty acids.⁵ BHB: β -hydroxybutyrate.⁶ CRP: C-reactive protein.⁷ CK: creatine kinase.⁸ GPx: glutathione peroxidase.

glycolytic metabolic potential in the LT muscle of pigs with the RYR1 mutation, due to higher proportion of the fast twitch glycolytic fibre type and lower of the slow twitch oxidative type (Fiedler et al., 1999).

3.2. Blood biochemical variables

Sex affected several blood metabolites at slaughter (Table 2). Then, females showed higher levels than males of glucose ($P < 0.05$), urea ($P < 0.001$), CRP ($P < 0.05$), Pig-MAP ($P < 0.01$) and GPx ($P < 0.01$) and lower of lactate ($P < 0.05$).

Higher glucose level may indicate a higher stress response of females at slaughter, as it is known that during psychological stress the organism feels threatened and gets ready to respond to protect itself, then the glucose level in plasma increases due to the secretion of hormones that leads to an increase on the hepatic glycogen breakdown and gluconeogenesis (Becerril-Herrera et al., 2007; Mota-Rojas et al., 2009). There are a number of studies that describe the increase of serum or plasma levels in glucose as a consequence of stress in different animal species (see Becerril-Herrera et al., 2007) but the effect of sex on the energetic profile is not clear as it may be affected by hormonal differences. Our results are in accordance with the report by Mota-Roja et al. (2012) who found increased concentration of glucose at exsanguinations in female pigs subjected to acute stress, when compared to barrows and entire males.

Our data are also consistent with previous studies describing increased levels of APPs such as CRP and Pig-MAP in plasma as consequence of stress in pigs (Murata, 2007; Piñeiro et al., 2007, 2007; Saco et al., 2003; Salamano et al., 2008).

When looking to differences of urea serum content within groups (Fig. 2a), it is worthwhile to mention that increased urea concentration in females was consistent in both NN and Nn groups, suggesting a faster catabolism of proteins, probably associated to the above mentioned higher susceptibility of females to pre-slaughter stress.

The effect of the RYR1 genotype on variables such as creatinine ($P < 0.05$), CRP ($P < 0.05$), Pig-MAP ($P = 0.05$), CK ($P < 0.001$) and GPx ($P < 0.01$) was significant (Table 2). Heterozygous (Nn) pigs

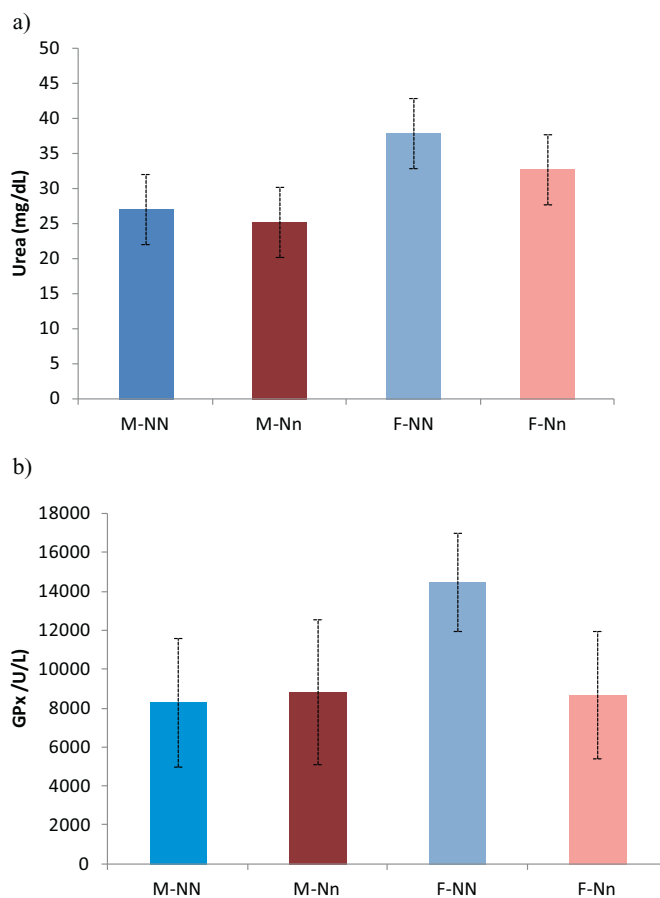


Fig. 2. Urea (a) and GPx (b) levels in serum (means \pm S.E.) in the four studied treatments (M: male, F: female, NN: halothane free, Nn: gene mutation carrier).

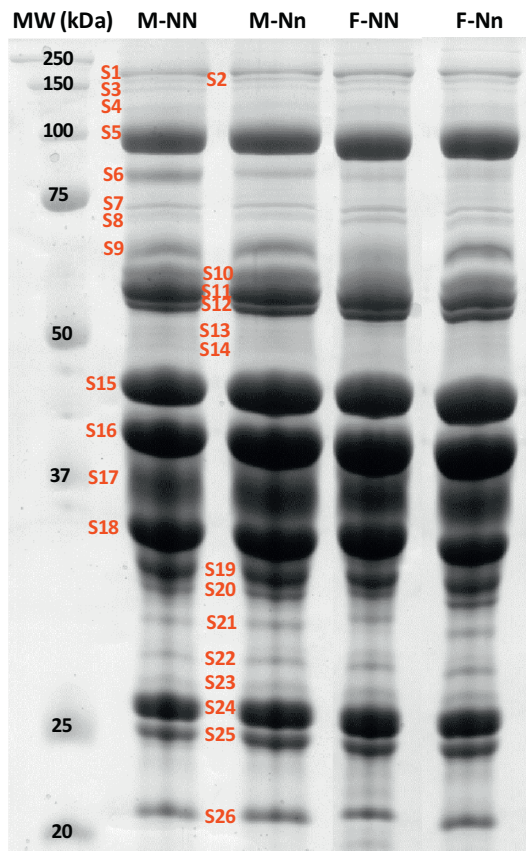


Fig. 3. SDS-PAGE gel image of sarcoplasmic extracts of the LD muscle in the four treatments (M-NN, M-Nn, F-NN, F-Nn). Band names are denoted by S (sarcoplasmic protein) followed by a number.

showed higher serum CK activity, which suggests increased muscle damage, and higher CRP concentration, that may indicate higher stress level and subsequent inflammation. To date, some APPs have been proposed as indicators of animal stress (Saco et al., 2003; Piñeiro et al., 2007; Salamano et al., 2008; Marco-Ramell et al., 2011; Marco-Ramell et al., 2016), although the effect of stress on their serum concentration remains controversial, since it is difficult to distinguish it from the effect of trauma or subclinical infections.

On the other side, the higher GPx activity in homozygous (NN), but especially in females (there was significant S*G interaction, $P < 0.01$) suggests more potent antioxidant defenses in females, probably due to estrogen influence (Fig. 2b).

3.3. Muscle proteins

A total of 26 protein bands (201 to 20 kDa) were differentiated by SDS-PAGE gels in the muscle sarcoplasmic extracts, as shown in Fig. 3, where band names are denoted by S of “sarcoplasmic” protein, followed by a number (1 to 26).

Table 3 gives the identification of protein bands with differential expression between treatments and Table 4 shows the effect of sex and genotype and its interaction on the abundance of these proteins.

3.3.1. Effect of sex

Myosin-binding protein C fast type, “MyBP-C” was overrepresented ($P < 0.05$) in the muscle of females. MyBP-C belongs to the myosin-binding protein C family, including fast- and slow-type isoforms, each of which is a myosin-associated protein found in the cross-bridge-bearing zone (C region) of sarcomeric A bands, where interaction between the thick and thin filaments occurs. Both structural and

regulatory roles have been proposed for MyBP-C, as it may modulate muscle contraction (Oakley, Hambly, Curmi, & Brown, 2004).

The presence of S6 (muscle-6-phosphofructokinase “PFK-M”) was also significantly affected by gender, with lower values in the muscle of females. PFK-M is the main rate-controlling enzyme of glycolysis, which catalyzes the transfer of a phosphoryl group from ATP to fructose-6-phosphate to yield ADP and fructose-1,6-bisphosphate. This enzyme is tightly regulated and responds to diverse molecules and signals by changing its catalytic activity and behaviour and is one of the few examples in which inhibition by the substrate occurs, as ATP may inhibit PFK at different levels, depending on the tissue metabolic state (Sola-Penna, Da Silva, Coelho, Marinho-Carvalho, & Zancan, 2010). Furthermore, lactate potentiates the inhibitory effects of ATP on PFK (Leite, Da Silva, Coelho, Zancan, & Sola-Penna, 2007). Then in our study underexpression of PFK-M in the muscle of females, that showed faster *post mortem* acidification, could be potentiated by inhibition due to lactate, although we cannot discard a possible lower inherent PFK-M concentration in the muscle of females due to physiological differences between males and females.

3.3.2. Effect of genotype

Genotype affected the presence of four peptide bands, thus producing lower presence of S2 (MyBP-C, $P < 0.05$), S18 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase “GAPDH”, $P < 0.01$) and S24 (containing two proteins: carbonic anhydrase “CAIII” and phosphoglycerate mutase-2 “PGM2”, $P < 0.05$) and higher of S23 (ENO3) in the muscle of Nn pigs (Table 4).

Changes of MyBP-C, which corresponds to the muscle fibre structure, could be due to the above mentioned differences of fibre type composition between RYR1 genotypes, while the other significant changes affected to metabolic enzymes (GAPDH, CAIII and/or PGM2, ENO3) that showed significant correlation with the rate of *post mortem* muscle pH decline (pH-amplitude), being this relationship positive for GAPDH ($r = 0.540$, $p < 0.01$) and CAIII/PGM2 ($r = 0.410$, $P < 0.05$) and negative for ENO3 ($r = -0.541$, $P < 0.006$). This agrees with results from Gagaoua et al. (2015) who found negative relationship between ENO3 and pH decline in beef.

Lower GAPDH in the muscle of Nn pigs indicate lower glycolysis, which could be produced by an earlier depletion of muscle metabolites (glycogen) due to stress, as found by Fernandez et al. (2002). It is worthwhile to mention that GAPDH has recently been implicated in different non-metabolic processes, including transcription activation and initiation of apoptosis (Tarze et al., 2007). Moreover, GAPDH may act as a reversible metabolic switch under oxidative stress (Agarwal et al., 2012).

With respect to ENO3, it is a glycolytic enzyme that has been associated in beef with a faster *post mortem* muscle energy metabolism resulting in a faster pH decline (Gagaoua et al., 2015), and also has been correlated to beef color stability (Gagaoua et al., 2015; Gagaoua, Terlouw, & Picard, 2017; Picard, Gagaoua, & Hollung, 2017) and to meat tenderization (Lametsch et al., 2003; Polati et al., 2012). Furthermore, ENO3 has been described as a hypoxic stress protein providing protection of cells by increasing anaerobic metabolism (Pancholi, 2001; Wulff, Jokumsen, Højrup, & Jessen, 2012). Then, it could be expected to find increased ENO3 in the muscle of pigs suffering higher stress at slaughter, that is, those from the Nn genotype.

The interpretation of changes found in the protein band S24 become difficult due to the co-migration of two proteins (CAIII and PGM2) and the resultant joint quantification, which is one of the difficulties of using 1D electrophoresis for protein separation. Band S24 showed significantly ($P < 0.05$) lower abundance in the muscle extracts of Nn animals, and this difference was consistent regardless of sex (males and females), but we could not elucidate if both proteins (CAIII and PGM2) or only one of them had lower presence in Nn pigs. Anyway, lower CAIII (which functions as oxyradical scavenger and thus protects cells from oxidative damage) could be expected in the muscle of Nn pigs and

Table 3
Protein identification in noticeable bands of sarcoplasmic extracts separated by SDS-PAGE acrilamide gels.

Band [MWe ¹]	Identification	Accession no. ²	MOWSE ³ scores	Sequence coverage (%)	Matched queries	MWt ⁴
S2 (175.6 kDa)	Myosin-binding protein C, fast-type [<i>Sus scrofa</i>]: FastMyBP-C	gi 335290041	111	14	13	128.4
S6 (86.8 kDa)	Muscle 6-phosphofructokinase [<i>Sus scrofa</i>]: PFK-M	gi 95117652	524	35	22	82.4
S9 (61.7 kDa)	Albumin [<i>Sus scrofa</i>]	gi 833798	808	38	20	71.4
S18 (32.5 kDa)	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating): (EC 1.2.1.12)- pig: GAPDH	gi 65987	767	55	14	35.9
S23 (26.3 kDa)	β -enolase [<i>Bos taurus</i>]: ENO3	gi 77736349	282	32	9	47.4
S24 (25.3 kDa)	Carbonic anhydrase 3 [<i>Sus scrofa</i>]: CAIII	gi 56711366	858	76	21	29.7
	Phosphoglycerate mutase-2 [<i>Sus scrofa</i>]: PGM2	gi 201066358	400	56	13	28.8
S26 (20.5 kDa)	Adenylate kinase isoenzyme 1 [<i>Sus scrofa</i>]: AK1	gi 350579686	539	65	15	21.7

¹ MWe is the experimental molecular weight (kDa).

² Accession number correspond to NCBI database.

³ The MOWSE score is a numeric descriptor of the likelihood that the identification is correct. Protein scores > 69 are significant ($P < 0.05$).

⁴ MWt is the theoretical molecular weight (kDa).

would reflect lower level of the antioxidant defense, which agrees with the findings of Laville et al. (2009) who described reduced abundance of antioxidant proteins in the SM muscle of pigs with RYR1 mutation (nn genotype) compared with NN pigs, probably because the nn muscle was less oxidative and in consequence presented less antioxidative and repair capacities. The growing interest of meat scientist for the role of the balance between oxidative stress and antioxidant defense in the *post mortem* muscle is more than evident, and gives significant correlations with ultimate meat quality traits such as meat color and tenderness (Laville et al., 2007, 2009; Jia et al., 2009; Ouali et al., 2013; Gagaoua et al., 2015, 2017; te Pas et al., 2017).

The other protein found in band S24 was PGM2, which catalyzes the interconversion of 2-phosphoglycerate and 3-phosphoglycerate in the glycolytic pathway and therefore it has a role of regulation of the energy balance and in the glycogen metabolism and glycolysis of the skeletal muscle (Fontanesi et al., 2008). This protein is encoded by a gene localized on porcine chromosome 18 (Fontanesi, Davoli, Nanni Costa, Scotti, & Russo, 2003) in a region where quantitative trait loci for drip loss, meat color, fat deposition, lean content, muscle fibre diameter and carcass quality have been identified, and it has been described a significant association between PGM2 and drip loss in pigs (Fontanesi et al., 2003), so a lower PGM2 abundance in the muscle of Nn pigs, that showed higher drip loss, would be expected.

As a whole, the deficiency of GAPDH, PGM2 and/or CAIII and the increased amount of ENO3 in the muscle of Nn pigs after slaughter reflects an impairment of the glycolysis function and a higher defense of the muscle cell to oxidative stress, which could be related to metabolic changes due to the RYR1 mutation, that causes a dysregulation of the calcium homeostasis and lead to neuromuscular disorders (Treves et al., 2005) and even can affect immunological and neuroendocrine response of pigs to stress (Ciepielewski et al., 2016). In our study we could not quantify changes in the abundance of muscle proteins involved in

calcium homeostasis, such as sarcalumenin or calsequestrin-1, that were not separated in the 1D SDS-PAGE gels. These proteins have recently been detected by 2D-electrophoresis in mice muscle by Picard et al. (2016) who found that its abundance in the *Tibialis anterior* muscle (fast glycolytic) increased in the absence of Hsp27 (heat shock protein that has been described as beef tenderness biomarker, by the group of Picard).

3.3.3. Interaction of sex and genotype

The statistical analysis showed that there was a significant interaction between sex and genotype for two muscle proteins: S9 (albumin) and S26 (AK-1). That is, in this study, males tended to show higher muscle albumin expression than females, which could reflect physiological differences related to the function of albumin in the skeletal muscle, where it serves as a temporary amino acid storage site, maintains osmotic pressure and acts as a transporter for free fatty acids (Ellmerer et al., 2000), but the presence of the RYR1 mutation increased the albumin expression in the muscle of females and decreased it in males. Regarding AK-1, which catalyzes the reversible transfer of the terminal phosphate group between ATP and AMP and is a key enzyme in the muscle energetic homeostasis, it showed slightly higher level in Nn genotypes, which was more evident in males than in females, then showing significant interaction between sex and genotype. Our results show lower AK-1 level in Nn females, which could be related with alterations of the muscle homeostasis as a result of higher stress response at slaughter, which is in agreement with a previous report from our group that showed that higher pre-slaughter stress produced lower presence of AK-1 in the *post mortem* muscle in pigs when mixed with unfamiliar animals (Oliván et al., 2016).

Table 4

Least squares means and the effect of sex (S), RYR1 genotype (G) and its interaction (S*G) on the expression of noticeable proteins of the muscle sarcoplasmic extracts (optical density, in arbitrary units).

Sex	Male		Female		SEM ¹	P-value		
	NN	Nn	NN	Nn		S	G	S*G
Fast MyBP-C	0.217	0.168	0.370	0.223	0.034	0.048	0.044	0.272
PFK-M	1.328	1.498	0.854	0.790	0.144	0.006	0.911	0.466
Albumin	2.688 ^b	2.329 ^b	1.881 ^a	2.441 ^b	0.119	0.081	0.385	0.006
GAPDH	14.065	13.109	14.398	12.235	0.367	0.710	0.009	0.313
ENO3	0.379	1.049	0.667	0.934	0.124	0.704	0.017	0.211
CAIII/PGM2	7.967	7.140	7.907	7.111	0.204	0.963	0.012	0.870
AK-1	2.085 ^a	1.985 ^a	1.979 ^a	2.160 ^b	0.046	0.658	0.591	0.046

Means in the same row followed by different superscripts are significantly different at $P < 0.05$.

¹ SEM: standard error of means.

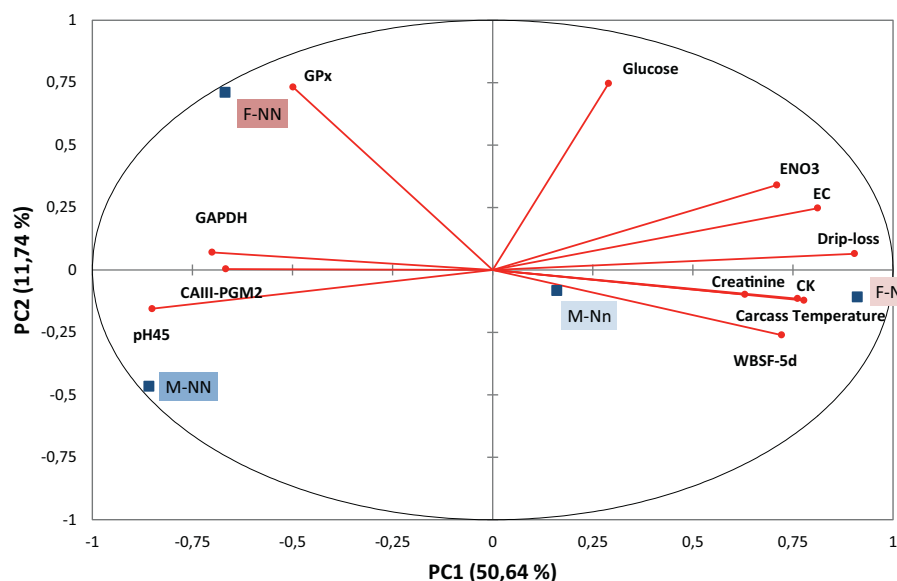


Fig. 4. PCA biplot of meat quality traits and stress biomarkers. Mean scores for animal treatments (M-NN, M-Nn, F-NN, F-Nn) are shown in squares.

Variables: EC: Electrical conductivity; WBSF-5d: Warner Bratzler shear force at 5 days *post mortem*; CK: Creatine kinase; GPx: Glutathione peroxidase; CAIII: Carbonic anhydrase; PGM2: Phosphoglycerate mutase-2; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; ENO3: β -enolase.

Treatments: M-NN (male-halothane free), M-Nn (male-gene mutation carrier), F-NN (female-halothane free) and F-Nn (female-gene mutation carrier).

3.4. Multivariate analysis

Multivariate analysis was applied in order to obtain a synthetic assessment of the complex relationships between the variables best suited for factor analysis ($KMO > 0.6$), that were: three meat quality traits (pH 45, EC and drip), four serum metabolites (glucose, creatinine, CK and GPx) and three protein bands containing muscle proteins of the energy metabolism and antioxidant defense (GAPDH, ENO3 and CAIII/PGM2). The biplot obtained via PCA (Fig. 4) showed that PC1 and PC2 explained 62% of the variability in the data.

The first principal component (PC1) distinguished in the positive side main variables related to poor meat quality: drip loss, EC and meat toughness (shear force at 5 days aging (WBSF-5d)). Other variables with high loadings for PC1 were serum creatinine and CK, which indicate higher muscle damage at slaughter, and ENO3, a muscle protein that has been related to faster energy metabolism and faster pH decline in beef (Gagaoua et al., 2015) and also to hypoxic stress (Sedoris, Thomas, & Miller, 2010).

Furthermore, carcass temperature showed a positive correlation with PC1, which all together clearly indicates that the positive side of PC1 merged variables related to stress at slaughter. These characteristics corresponded to animals of the Nn genotype, mainly females, whose mean score showed high positive correlation to PC1 (Fig. 4). By contrast, the negative side of the PC1 grouped meat variables indicating normal *post mortem* pH decline (higher pH at 45 min), normal muscle glycolytic metabolism (higher muscle GAPDH and PGM2 at slaughter) and higher muscle antioxidant defense (CAIII), that is, those variables that in general contribute to an appropriate process of muscle-to-meat conversion, being the NN genotype (males “M-NN” and females “F-NN”) represented nearby.

The second PC aimed to distinguish in the positive side animals showing higher blood levels of glucose and GPx, that is, variables indicating stress, inflammation and antioxidant response at slaughter, which corresponded mainly to Females of the NN genotype.

Overall, these results show that the RYR1 mutation in heterozygosity contributed to reduce the ultimate meat quality (higher meat exudation and toughness) and that in some extent its effect was modulated by a higher stress response of Nn individuals at slaughter (higher serum level of creatinine and creatin kinase, compared to NN pigs). On the other hand, females showed faster muscle *post mortem* pH decline and produced more exudative meat than males, and also showed blood biochemical parameters at slaughter that seem to reflect a physiological response to stress (higher glucose and GPx).

Furthermore, from a proteomic perspective, these results allowed the identification of key proteins involved in the *post mortem* glycolytic pathway (GAPDH, PGM2, ENO3) and the antioxidant defense (CAIII) of the muscle that contribute to the process of meat quality acquisition and are influenced by pre-slaughter stress. These proteins have a relevant role in the *post mortem* muscle metabolism and most of them have already been identified as biomarkers of meat quality and animal stress (Laville et al., 2007, 2009; Guillemain, Bonnet, Jurie, & Picard, 2011; Gagaoua et al., 2015, 2017; Oliván et al., 2016).

These results contribute to progress towards the comprehensive identification of proteins linked to the process of meat quality acquisition, being ultimately modulated by the animal's stress reaction at slaughter. Knowing the biological mechanism underlying this process opens up the possibility of monitoring and predicting the resulting changes. Once this is known, these potential protein biomarkers must follow a process of evaluation and validation (Naylor, 2003; te Pas, Hoekman & Smits, 2011; Picard & Gagaoua, 2017), so further research is needed on a larger data set.

4. Conclusions

Pork quality development is largely governed by the rate and extent of *post mortem* muscle metabolism, which is affected by animal factors like sex and RYR1 genotype, with influence as well in the modulation of the animal's individual susceptibility to pre-slaughter stress.

The results of this study showed that the sex and the RYR1 genotype affected several blood biochemical parameters at slaughter and some muscle enzymes with key role on the subsequent process of muscle-to-meat conversion, showing Nn females more susceptibility to stress, with detrimental effect on meat quality.

These differences may be monitored by protein biomarkers related to the fibre composition, the *post mortem* glycolytic pathway and the antioxidant defense of the muscle. However, it is worthwhile to mention that the complex nature of the processes that underlie the *post mortem* meat quality development and the high diversity of factors that may influence the animal's susceptibility to stress at slaughter makes difficult to find universal biomarkers. Then, more research is needed in order to apply combined “omics” techniques that allow the identification of key protein biomarkers and to validate them in different breeds and management systems.

Acknowledgements

This study was funded by projects AGL 2011-30598-C03 (Ministerio de Economía y Competitividad, Spain), FISS-13-RD12/0043/0030 and FISS-14-PI13/02741 (Instituto de Salud Carlos III, Spain). M. Oliván, Y. Potes and A. Coto-Montes are members of the Research Team “cellular Response to Oxidative Stress (cROS)” of University of Oviedo. Y. Potes thanks the FISS pre-doctoral fellowship from the Ministerio de Economía y Competitividad (Instituto de Salud Carlos III). We are grateful to V. Fernández-Suárez for collaboration in analytical procedures.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.03.018>.

References

- Agarwal, A. R., Zhao, L., Sancheti, H., Sundar, I. K., Rahman, I., & Cadenas, E. (2012). Short-term cigarette smoke exposure induces reversible changes in energy metabolism and cellular redox status independent of inflammatory responses in mouse lungs. *American Journal of Physiology: Lung Cell Molecular Physiology*, *303*, 889–898.
- Ampuero Kragten, S., & Gil, M. (2015). Chapter 5: Instrumental tenderness - shear force. In M. Font-i-Furnols, M. Čandek-Potokar, C. Maltin, & M. Prevolnik Povše (Eds.). *A Handbook of Reference Methods for Meat Quality Assessment* (pp. 45–54). Farm Animal Imaging Cost Action FA1102.
- Becerril-Herrera, M., Alonso-Spillsbury, M., Lemus-Flores, C., Guerrero-Legarreta, I., Olmos-Hernández, A., Ramírez-Necochea, R., & Mota-Rojas, D. (2007). CO₂ stunning may compromise swine welfare compared with electrical stunning. *Meat Science*, *81*, 233–237.
- Blanchard, P. J., Warkup, C. C., Ellis, M., Willis, M. B., & Avery, P. (1999). The influence of the proportion of Duroc genes on growth, carcass and pork eating quality characteristics. *Animal Science*, *68*, 495–501.
- Boler, D. D., Dilger, A. C., Bidner, B. S., Carr, S. N., Eggert, J. M., Day, J. W., ... Killefer, J. (2010). Ultimate pH explains variation in pork quality traits. *Journal of Muscle Foods*, *21*, 119–130.
- Channon, H. A., Kerr, M. G., & Walker, P. J. (2004). Effect of Duroc content, sex and ageing period on meat and eating quality attributes of pork loin. *Meat Science*, *66*, 881–888.
- Channon, H. A., Payne, A. M., & Warner, R. D. (2000). Halothane genotype, pre-slaughter handling and stunning method all influence pork quality. *Meat Science*, *56*, 291–299.
- Cheah, K. S., Cheah, A. M., & Krausgrill, D. I. (1995). Variations in meat quality in live halothane heterozygotes identified by biopsy samples of M. longissimus dorsi. *Meat Science*, *39*, 293–300.
- Ciepielewski, Z. M., Stojek, W., Borman, A., Myślińska, D., Pałczyńska, P., & Kamyczek, M. (2016). The effects of ryanodine receptor (RYR1) mutation on natural killer cell cytotoxicity, plasma cytokines and stress hormones during acute intermittent exercise in pigs. *Research in Veterinary Science*, *105*, 77–86.
- Cisneros, F., Ellis, M., Mckeith, F. K., McCaw, J., & Fernando, R. L. (1996). Influence of slaughter weight on growth and carcass characteristics, commercial cutting and curing yields, and meat quality of barrows and gilts from two genotypes. *Journal of Animal Science*, *74*, 925–933.
- Dalmiau, A., Temple, D., Rodriguez, P., Llonch, P., & Velarde, A. (2009). Application of the Welfare Quality® protocol at pig slaughterhouses. *Animal Welfare*, *18*, 497–505.
- D'Eath, R. B., Turner, S. P., Kurt, E., Evans, G., Thölking, L., Looft, H., ... Mormède, P. (2010). Pig's aggressive temperament affects pre-slaughter mixing aggression, stress and meat quality. *Animal*, *4*, 604–616.
- Depreux, F. F. S., Grant, A. L., & Gerrard, D. E. (2002). Influence of halothane genotype and body-weight on myosin heavy chain composition in pig muscle as related to meat quality. *Livestock Production Science*, *73*, 265–273.
- Dokmanovic, M., Baltic, M. Z., Duric, J., Ivanovic, J., Popovic, L., Todorovic, M., ... Pantic, S. (2015). Correlations among stress parameters, meat and carcass quality parameters in pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *28*, 435–441.
- D'Souza, D. N., Dunshea, R. R., Warner, R. D., & Leury, B. J. (1998). The effect of handling pre-slaughter and carcass processing rate post-slaughter on pork quality. *Meat Science*, *50*, 429–437.
- D'Souza, D. N., & Mullan, B. P. (2002). The effect of genotype, sex and management strategy on the eating quality of pork. *Meat Science*, *60*, 95–101.
- EU (2010). Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Communities*, *L276*, 33–79.
- Edwards, L. N., Engle, T. E., Correa, J. A., Paradis, M. A., Grandin, T., & Anderson, D. B. (2010). The relationship between exsanguination blood lactate concentration and carcass quality in slaughter pigs. *Meat Science*, *85*, 435–440.
- Edwards, L. N., Grandin, T., Engle, T. E., Porter, S. P., Ritter, M. J., Sosnicki, A. A., & Anderson, D. B. (2010). Use of exsanguination blood lactate to assess the quality of pre-slaughter pig handling. *Meat Science*, *86*, 384–390.
- Ellmerer, M., Schaupp, L., Brunner, G. A., Sendhofer, G., Wutte, A., Wach, P., & Pieber, T. R. (2000). Measurements of interstitial albumin in human skeletal muscle and adipose tissue by open-low microperfusion. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, *285*, E352–E356.
- Fàbrega, E., Manteca, X., Font, J., Gispert, M., Carrión, D., Velarde, A., ... Diestre, A. (2004). A comparison of halothane homozygous negative and positive pietrain sire lines in relation to carcass and meat quality, and welfare traits. *Meat Science*, *66*, 777–787.
- Fàbrega, E., Velarde, A., Cros, J., Gispert, M., Suarez, P., Tibau, J., & Soer, J. (2010). Effect of vaccination against gonadotropin-releasing hormone, using Improvac®, on growth performance, body composition, behaviour and acute phase proteins. *Livestock Science*, *132*, 53–59.
- Fernandez, X., Neyraud, E., Astruc, T., & Sante, V. (2002). Effects of halothane genotype and pre-slaughter treatment on pig meat quality. Part 1. Post mortem metabolism, meat quality indicators and sensory traits of m. Longissimus lumborum. *Meat Science*, *62*, 429–437.
- Fiedler, I., Ender, K., Wicke, M., Maak, S., Lengerken, G. V., & Meyer, W. (1999). Structural and functional characteristics of muscle fibres in pigs with different malignant hyperthermia susceptibility (MHS) and different meat quality. *Meat Science*, *53*, 9–15.
- Fontanesi, L., Davoli, R., Nanni Costa, L., Beretti, F., Scotti, E., Tazzoli, M., Tassone, F., Colombo, M., Buttazzoni, L., & Russo, V. (2008). Investigation of candidate genes for glycolytic potential of porcine skeletal muscle: Association with meat quality and production traits in Italian Large White pigs. *Meat Science*, *80*, 780–787.
- Fontanesi, L., Davoli, R., Nanni Costa, L., Scotti, E., & Russo, V. (2003). Study of candidate genes for glycolytic potential of porcine skeletal muscle: identification and analysis of mutations, linkage and physical mapping and association with meat quality traits in pigs. *Cytogenetic and Genome Research*, *102*, 145–151.
- Franco, D., Mato, A., Salgado, F. J., López-Pedrouso, M., Carrera, M., Bravo, S., ... Zapata, C. (2015). Tackling proteome changes in the longissimus thoracis bovine muscle in response to pre-slaughter stress. *Journal of Proteomics*, *122*, 73–85.
- Fujii, J., Otsu, K., Zorzato, F., De Leon, S., Khanna, V. K., Weiler, J. E., ... MacLennan, D. H. (1991). Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*, *253*, 448–451.
- Gagaoua, M., Terlouw, E. M. C., Micol, D., Boudjellal, A., Hocquette, J. F., & Picard, B. (2015). Understanding early post-mortem biochemical processes underlying meat color and pH decline in the Longissimus thoracis muscle of young blond d'Aquitaine bulls using protein biomarkers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*, 6799–6809.
- Gagaoua, M., Terlouw, E. M. C., & Picard, B. (2017). The study of protein biomarkers to understand the biochemical processes underlying beef color development in young bulls. *Meat Science*, *134*, 18–27.
- Gispert, M., Àngels Oliver, M., Velarde, A., Suarez, P., Pérez, J., & Font i Furnols, M. (2010). Carcass and meat quality characteristics of immunocastrated male, surgically castrated male, entire male and female pigs. *Meat Science*, *85*, 664–670.
- Guillemin, N., Bonnet, M., Jurie, C., & Picard, B. (2011). Functional analysis of beef tenderness. *Journal of Proteomics*, *75*, 352–365.
- Hambrecht, E., Eissen, J. J., Newman, D. J., Smits, C. H. M., den Hartog, L. A., & Verstege, M. W. A. (2005a). Negative effects of stress immediately before slaughter on pork quality are aggravated by suboptimal transport and lairage conditions. *Journal of Animal Science*, *83*, 440–448.
- Hambrecht, E., Eissen, J. J., Newman, D. J., Smits, C. H. M., Verstege, M. W. A., & den Hartog, L. A. (2005b). Preslaughter handling effects on pork quality and glycolytic potential in two muscles differing in fiber type composition. *Journal of Animal Science*, *83*, 900–907.
- Havlis, J., Thomas, H., Sebela, M., & Shevchenko, A. (2003). Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins. *Analytical Chemistry*, *75*, 1300–1306.
- Hollung, K., Veiseth, E., Jia, X., Færgestad, E. M., & Hildrum, K. I. (2007). Application of proteomics to understand the molecular mechanisms behind meat quality. *Meat Science*, *77*, 97–104.
- Jami, M. S., Barreiro, C., García-Estrada, C., & Martín, J. F. (2010). Proteome analysis of the penicillin producer *Penicillium chrysogenum*: characterization of protein changes during the industrial strain improvement. *Molecular & Cellular Proteomics*, *9*, 1182–1198.
- Jia, X., Veiseth-Kent, E., Grove, H., Kuziora, P., Aass, L., Hildrum, K. I., & Hollung, K. (2009). Peroxiredoxin-6-A potential protein marker for meat tenderness in bovine longissimus thoracis muscle. *Journal of Animal Science*, *87*, 2391–2399.
- Kazemi, S., Ngadi, M. O., & Gariépy, C. (2011). Protein denaturation in pork longissimus muscle of different quality groups. *Food and Bioprocess Technology*, *4*, 102–106.
- Krischek, C., Natter, R., Wigger, R., & Wicke, M. (2011). Adenine nucleotide concentrations and glycolytic enzyme activities in longissimus muscle samples of different pig genotypes collected before and after slaughter. *Meat Science*, *89*, 217–220.
- Lametsch, R., Karlsson, A., Rosenvold, K., Andersen, H. J., Roepstorff, P., & Bendixen, E. (2003). Postmortem proteome changes of porcine muscle related to tenderness. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 6992–6997.
- Laville, E., Sayd, T., Terlouw, C., Blinet, S., Pinguet, J., Fillaut, M., ... Chérel, P. (2009). Differences in pig muscle proteome according to HAL genotype: Implications for meat quality defects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*, 4913–4923.
- Laville, E., Sayd, T., Terlouw, C., Chambon, C., Damon, M., Larzul, C., ... Chérel, P. (2007). Comparison of sarcoplasmic proteomes between two groups of pig muscles selected for shear force of cooked meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 5834–5841.
- Leite, T. C., Da Silva, D., Coelho, R. G., Zancan, P., & Sola-Penna, M. (2007). Lactate favours the dissociation of skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase tetramers down-regulating the enzyme and muscle glycolysis. *Biochemical Journal*, *408*, 123–130.
- Marco-Ramell, A., Arroyo, L., Peña, R., Pato, R., Saco, Y., Fraile, L., ... Bassols, A. (2016). Biochemical and proteomic analyses of the physiological response induced by individual housing in gilts provide new potential stress markers. *BMC Veterinary*

- Research*, 12, 265.
- Marco-Ramell, A., Pato, R., Peña, R., Saco, Y., Manteca, X., Ruiz de la Torre, J. L., & Bassols, A. (2011). Identification of serum stress biomarkers in pigs housed at different stocking densities. *Veterinary Journal*, 190, 66–71.
- Mota-Rojas, D., Becerril-Herrera, M., Roldan-Santiago, P., Alonso-Spilsbury, M., Flores-Peinado, S., Ramírez-Necochea, R., ... Trujillo-Ortega, M. E. (2012). Effects of long distance transportation and CO₂ stunning on critical blood values in pigs. *Meat Science*, 90, 893–898.
- Mota-Rojas, D., Herrera, M. B., Trujillo-Ortega, M. E., Alonso-Spilsbury, M., Flores-Peinado, S. C., & Guerrero-Legarreta, I. (2009). Effects of pre-slaughter transport, lairage and sex on pig chemical serologic profiles. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8, 246–250.
- Murata, H. (2007). Stress and acute phase protein response: An inconspicuous but essential linkage. *Veterinary Journal*, 173, 473–474.
- Naylor, S. (2003). Biomarkers: Current perspectives and future prospects. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 3, 525–529.
- Oakley, C., Hambly, B. D., Curmi, P. M. G., & Brown, L. J. (2004). Myosin binding protein C: Structural abnormalities in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Cell Research*, 14, 95–110.
- Oliván, M., Fernández-Suárez, V., Díaz-Martínez, F., Sierra, V., Coto-Montes, A., de Luxán-Delgado, B., ... Velarde, A. (2016). Identification of biomarkers of stress in meat of pigs managed under different mixing treatments. *British Biotechnology Journal*, 11, 1–13.
- Ouali, A., Gagaoua, M., Boudida, Y., Becila, S., Boudjellal, A., Herrera-Mendez, C., & Sentandreu, M. A. (2013). Biomarkers of meat tenderness: Present knowledge and perspectives in regards to our current understanding of the mechanisms involved. *Meat Science*, 95, 854–870.
- Pancholi, V. (2001). Multifunctional alpha-enolase: Its role in diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58, 902–920.
- tePas, M. F. W., Hoekman, A. J. W., & Smits, M. A. (2011). Biomarkers as management tools for industries in the pork production chain. *Journal on Chain and Network Science*, 11, 155–166.
- tePas, M. F. W., Leuret, B., & Oksbjerg, N. (2017). Measurable biomarkers linked to meat quality from different pig production systems. *Archives Animal Breeding*, 60, 271–283.
- Picard, B., & Gagaoua, M. (2017). Chapter 11: Proteomic investigations of beef tenderness. In M. Colgrave (Ed.), *Proteomics in Food Science: From Farm to Fork* (pp. 177–197). Academic Press.
- Picard, B., Gagaoua, M., & Hollung, K. (2017). Chapter 12: Gene and Protein expression as a tool to explain/predict meat (and fish) quality. In P. Purslow (Ed.), *New Aspects of Meat Quality: From Genes to Ethics* (pp. 321–354). Netherlands: Elsevier Science.
- Picard, B., Kammoun, M., Gagaoua, M., Barboiron, C., Meunier, B., Cambon, C., & Cassar-Malek, I. (2016). Calcium homeostasis and muscle energy metabolism are modified in HspB1-null mice. *Proteomes*, 4, 17.
- Piñeiro, C., Piñeiro, M., Morales, J., Carpintero, C., Campbell, F. M., Eckersall, P. D., ... Lampreave, F. (2007). Pig acute-phase protein levels after stress induced by changes in the pattern of food administration. *Animal*, 1, 133–139.
- Piñeiro, M., Piñeiro, C., Carpintero, R., Morales, J., Campbell, F. M., Eckersall, P. D., ... Lampreave, F. (2007). Characterisation of the pig acute phase protein response to road transport. *The Veterinary Journal*, 173, 669–674.
- Polati, R., Menini, M., Robotti, E., Millioni, R., Marengo, E., Novelli, E., ... Cecconi, D. (2012). Proteomic changes involved in tenderization of bovine Longissimus dorsi muscle during prolonged ageing. *Food Chemistry*, 135, 2052–2069.
- Rasmussen, A., & Andersson, M. (1996). New method for determination of drip loss in pork muscles. Paper presented at the Proceedings of the 42th International Congress of Meat Science and Technology, Lillehammer, Norway (pp. 286–287). 1-6/09/1996.
- Roberts, S. A., Schaefer, A. L., Murray, A. C., & Thibault, L. (1998). Fall and winter hormone concentrations related to stress in pigs identified as normal and carrier for stress susceptibility. *Chronobiology International Journal*, 15, 275–281.
- Saco, Y., Docampo, M. J., Fàbrega, E., Manteca, X., Diestre, A., Lampreave, F., & Bassols, A. (2003). Effect of transport stress on serum haptoglobin and Pig-MAP in pigs. *Animal Welfare*, 12, 403–409.
- Salamano, G., Mellia, E., Candiani, E., Ingravalle, F., Bruno, R., Ru, G., & Doglione, L. (2008). Changes in haptoglobin, C-reactive protein and pig-MAP during a housing period following long distance transport in swine. *The Veterinary Journal*, 177, 110–115.
- Sedoris, K. C., Thomas, S. D., & Miller, D. M. (2010). Hypoxia induces differential translation of enolase/MBP-1. *BMC Cancer*, 10, 157.
- Shen, Q. W., Underwood, K. R., Means, W. J., McCormick, R. J., & Du, M. (2007). The halothane gene, energy metabolism, adenosine monophosphate-activated protein kinase, and glycolysis in postmortem pig longissimus dorsi muscle. *Journal of Animal Science*, 85, 1054–1061.
- Sierra, V., Fernández-Suárez, V., Castro, P., Osoro, K., Vega-Naredo, I., García-Macia, M., ... Oliván, M. (2012). Identification of biomarkers of meat tenderisation and its use for early classification of Austrian beef into fast and late tenderizing meat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 2727–2740.
- Sola-Penna, M., Da Silva, D., Coelho, W. S., Marinho-Carvalho, M. M., & Zancan, P. (2010). Regulation of mammalian muscle type 6-Phosphofructo-1-kinase and its implication for the control of the metabolism. *IUBMB Life*, 62, 791–796.
- Tarrant, P. V. (1990). Transportation of cattle by road. *Applied Animal Behaviour Science*, 28, 153–170.
- Tarze, A., Deniaud, A., Le Bras, M., Maillier, E., Molle, D., Larochette, N., ... Brenner, C. (2007). GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. *Oncogene*, 26, 2606–2620.
- Terlouw, C. (2005). Stress reactions at slaughter and meat quality in pigs: Genetic background and prior experience: A brief review of recent findings. *Livestock Production Science*, 94, 125–135.
- Terlouw, C., & Rybarczyk, P. (2008). Explaining and predicting differences in meat quality through stress reactions at slaughter: The case of Large White and Duroc pigs. *Meat Science*, 79, 795–805.
- Treves, S., Anderson, A. A., Ducreux, S., Divet, A., Bleunven, C., Grasso, C., ... Zorzato, F. (2005). Ryanodine receptor 1 mutations, dysregulation of calcium homeostasis and neuromuscular disorders. *Neuromuscular Disorders*, 15, 577–587.
- Van den Maagdenberg, K., Stinckens, A., Lefaucheur, L., Buys, N., & De Smet, S. (2008). The effect of mutations in the insulin-like growth factor-II and ryanodine receptor-1 genes on biochemical and histochemical muscle fibre characteristics in pigs. *Meat Science*, 79, 757–766.
- Wulff, T., Jokumsen, A., Højrup, P., & Jessen, F. (2012). Time-dependent changes in protein expression in rainbow trout muscle following hypoxia. *Journal of Proteomics*, 75, 2342–2351.

Pig cognitive bias affects the conversion of muscle into meat by antioxidant and autophagy mechanisms

Y. Potes^{1a}, M. Oliván^{2a}, A. Rubio-González^{1a}, B. de Luxán-Delgado^{1a}, F. Díaz², V. Sierra^{1,2}, L. Arroyo³, R. Peña³, A. Bassols³, J. González⁴, R. Carreras⁴, A. Velarde⁴, M. Muñoz-Torres⁵ and A. Coto-Montes^{1†a}

¹Departamento de Morfología y Biología Celular, Universidad de Oviedo, Av Julián Clavería s/n, 33006 Oviedo, Asturias, Spain; ²Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), Apdo 13, 33300 Villaviciosa, Asturias, Spain; ³Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès, Spain; ⁴Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Finca Camps i Armet s/n, 17121 Monells, Gerona, Spain; ⁵Hospital Universitario San Cecilio, Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada, C/Dr. Azpitarte, 4, 18012 Granada, Spain

(Received 12 October 2016; Accepted 8 March 2017)

Slaughter is a crucial step in the meat production chain that could induce psychological stress on each animal, resulting in a physiological response that can differ among individuals. The aim of this study was to investigate the relationship between an animal's emotional state, the subsequent psychological stress at slaughter and the cellular damage as an effect. In all, 36 entire male pigs were reared at an experimental farm and a cognitive bias test was used to classify them into positive bias (PB) or negative bias (NB) groups depending on their decision-making capabilities. Half of the animals, slaughtered in the same batch, were used for a complete study of biomarkers of stress, including brain neurotransmitters and some muscle biomarkers of oxidative stress. After slaughter, specific brain areas were excised and the levels of catecholamines (noradrenaline (NA) and dopamine (DA)) and indoleamines (5-hydroxyindoleacetic acid and serotonin (5HT)) were analyzed. In addition, muscle proteasome activity (20S), antioxidant defence (total antioxidant activity (TAA)), oxidative damage (lipid peroxidation (LPO)) and autophagy biomarkers (Beclin-1, microtubule-associated protein I light chain 3 (LC3-I) and LC3-II) were monitored during early postmortem maturation (0 to 24 h). Compared with PB animals, NB pigs were more susceptible to stress, showing higher 5HT levels ($P < 0.01$) in the hippocampus and lower DA ($P < 0.001$) in the pre-frontal cortex. Furthermore, NB pigs had more intense proteolytic processes and triggered primary muscle cell survival mechanisms immediately after slaughter (0 h postmortem), thus showing higher TAA ($P < 0.001$) and earlier proteasome activity ($P < 0.001$) and autophagy (Beclin-1, $P < 0.05$; LC3-II/LC3-I, $P < 0.001$) than PB pigs, in order to counteract the induced increase in oxidative stress, that was significantly higher in the muscle of NB pigs at 0 h postmortem (LPO, $P < 0.001$). Our study is the first to demonstrate that pig's cognitive bias influences the animal's susceptibility to stress and has important effects on the postmortem muscle metabolism, particularly on the cell antioxidant defences and the autophagy onset. These results expand the current knowledge regarding biomarkers of animal welfare and highlight the potential use of biomarkers of the proteasome, the autophagy (Beclin-1, LC3-II/LC3-I ratio) and the muscle antioxidant defence (TAA, LPO) for detection of peri-slaughter stress.

Keywords: pigs, cognitive bias, decision making, oxidative stress, autophagy

Implications

This transversal study shows the role of oxidative stress as a link between animal behavior and the *postmortem* muscle metabolism, which may have an effect on the ultimate meat quality. Based on the results of this study, variations in animal behavior, as assessed by a novel cognitive bias test,

correlate with significant differences in the oxidative stress levels of the muscle after slaughter. In turn, these changes modulate the *postmortem* autophagic pathway and the antioxidant defences of muscle cells, which are likely involved in the first steps of meat tenderization. This discovery improves the understanding of animal's decision making and its influence on the *postmortem* muscle metabolism, and allows the improvement of knowledge regarding animal welfare biomarkers.

^a Members of Research team: cellular Response to Oxidative Stress (cROS).

[†] E-mail: acoto@uniovi.es

Introduction

Concern for farm animal welfare is based on the belief that animals can suffer physically and psychologically during their rearing, transport, lairage at the abattoir and obviously at slaughter. This concern is clearly an important issue for ordinary people across Europe who demand that animals are treated as humanely as possible (European Union, 2007).

It is known that psychological stress due to environmental conditions (heat and cold) and novel experiences, such as weaning and road transportation, induce the release of neurotransmitters (NTs), particularly catecholamines and their metabolites, which may be mediated by the cognitive bias of each animal (Berridge and Waterhouse, 2003; Logue and Gould, 2013). Recent research has focused on the development of non-invasive tests that allow the characterization of animals based on their cognitive bias (Carreras *et al.*, 2015) and refer to the influence of the emotional state on cognitive processes and information processing including attention, learning, memory and decision making. Our hypothesis is that this characterization could be linked to the animal's susceptibility to stress at slaughter, which may have important effects on its redox status and therefore on the *postmortem* muscle metabolism and the resulting meat quality.

It has been shown that psychological stress is usually related to increased levels of reactive oxygen species (ROS), which cause an accumulation of oxidative damage when antioxidant defences are unbalanced (Jorgensen, 2013; Nakhaee *et al.*, 2013). Furthermore, at slaughter the process of exsanguination deprives cells and tissues of nutrients and oxygen, leading to massive accumulation of ROS, halting ATP production and causing cytoplasmic acidification and calcium dysregulation (Rubio-Gonzalez *et al.*, 2015). This massive production of ROS is the pivotal event of the muscle-to-meat conversion, and stimulates muscle cells to react in order to cope with the oxidative stress (Lana and Zolla, 2015).

These stimuli may trigger different muscle cell responses, including changes in autophagy (Garcia-Macia *et al.*, 2014; Lana and Zolla, 2015), which is a cell survival mechanism in which eukaryotic cells self-digest part of their cytosolic components to degrade long-lived proteins and organelles in response to starvation and other stressors (Coto-Montes *et al.*, 2012). Previous studies from our group have shown that some rearing practices, like mixing unfamiliar animals at the farm and/or before slaughtering, produce increased oxidative stress in the muscle tissue and triggers autophagy in the first hours after slaughter (Rubio-Gonzalez *et al.*, 2015).

The objective of this work was to study the effect of the cognitive bias (positive bias (PB) or negative bias (NB)) on the animal's susceptibility to stress at slaughter and the resulting muscle *postmortem* metabolism, with a special examination to the muscle oxidative status and cell autophagic processes. This study is part of a broader investigation focused on the development of novel animal-based approaches to animal welfare, including methods to assess the animal's emotional state (Carreras *et al.*, 2015) and physiological biomarkers of fear and stress susceptibility (Arroyo *et al.*, 2016).

Material and methods

This study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA) (Monells, Spain). The care and use of animals were performed in accordance with the European Union Directive 2010/63 on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes (European Union, 2010).

Animal management and the cognitive bias test

A total of 36 entire male pigs (crosses of *Large White* × *Landrace* halothane gene-RYR1-free (NN) sows with *Pietrain* heterozygous (Nn) boars) were raised at the experimental farm of IRTA from weaning to slaughter. Animals were housed in slatted pens (5 × 2.7 m) under natural light conditions at a constant environmental temperature of 22°C ± 3°C. Each pen was provided with one steel drinker bowl (15 × 16 cm) connected to a nipple and a concrete feeder (58 × 34 cm) with four feeding places. Pigs had water and feed *ad libitum*. The pigs were inspected daily and no health problems were observed during the experimental period.

A period of 1 month before slaughter, the pigs were subjected to a cognitive bias test that allows the classification of the animals into 'PB' or 'NB', with non-classifiable animals being considered as 'neutral' (Carreras *et al.*, 2015). In brief, pigs were individually trained during 16 sessions to discriminate between a bucket with or without access to chopped apples according to its position (left or right) in a 34-m² test pen. Then, each animal was subjected individually to the test session, where the bucket was placed at a central situation (ambiguous cue). To classify the animals by their cognitive bias, the time to contact the bucket in the test session was compared with the mean time of the last four training sessions. If the time taken in the test session was between the mean ± SEM of the last two sessions with access to feed, then the animal was classified as 'PB' for cognitive bias. If the time taken in the test session was between the mean ± SEM of the last two sessions with no access to food, then the animal was classified as 'NB' for cognitive bias. As a result of this test, 19 animals were classified as PB, six as NB and 11 were neutral, being this proportion homogeneously distributed between the groups.

Slaughtering conditions

When pigs reached 100 to 110 kg weight, they were fasted 8 h before being transported to the experimental abattoir of IRTA (1.2 km of distance), where they were handled calmly and slaughtered after a lairage time ranging from 30 min to 1 h, maintaining the housing groups during lairage. Animals were stunned in groups of two by exposure to 90% CO₂ at atmospheric air for 3 min and exsanguinated by vertical system afterwards.

There were two slaughtering batches performed in two different dates. For this experiment, animals of the same slaughtering batch (*n* = 18) were selected to avoid any possible difference of handling that could influence on the

animal's susceptibility to stress. Within the 18 pigs, nine were classified as PB, three were NB and six were non-classifiable, thus reflecting the proportion 3 : 1 (PB:NB) of the original population. Then, a complete analysis of the brain NTs and the biomarkers of muscle *postmortem* metabolism was performed on the 12 classified animals (nine PB and three NB) and non-classifiable pigs were discarded.

Tissue collection and sampling procedure

Immediately after slaughter, the skull was opened carefully, and the selected brain structures (amygdala, hippocampus and pre-frontal cortex) were dissected and samples collected, dipped into liquid nitrogen as quickly as possible and kept frozen at -80°C until analysis. In addition, muscle samples (20 g) were taken from the *Longissimus dorsi* (LD) muscle of each animal, starting at the last rib and following the cranial direction, at 0, 4, 8 and 24 h *postmortem*. These samples were immediately snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until the analyses were performed.

Brain neurotransmitter analysis

Frozen brain samples from specific areas were weighed and homogenized rapidly using a steel mortar in the continued presence of liquid nitrogen in ice-cold 0.25 M perchloric acid containing 0.1 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ and 0.25 M ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) (1 : 10 w/w). Dihydroxybenzylamine and $\text{N}\omega$ ($\text{N}\omega$ -methyl-5-hydroxytryptamine oxalate salt) were added as internal standards for catecholamines and indoleamines, respectively. The mixture was homogenized by sonication, followed by centrifugation at $3000 \times g$ for 10 min at 4°C , and the supernatants were kept frozen at -80°C . After centrifugation at $12\,000 \times g$ for 10 min at 4°C , concentrations of NA, DA, serotonin (5HT) and its metabolite 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) were determined in 20- μl aliquots using HPLC (Elite LaChrom; Merck, Hitachi, Japan) equipped with a Cromolith Rp-18e 100×4.6 mm column (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) with electrochemical detection (ESA Coulochem II 5200; ESA, Bedford, MA, USA). The mobile phase consisted of 0.5 M citrate buffer (pH 2.8), 0.05 mM EDTA, 1.2 mM sodium octyl sulphate and 1% acetonitrile (v/v). Electrochemical detection was achieved using a dual-electrode analytical cell with porous graphite electrodes set at potentials of 0.05 and 0.4 V, respectively, and the flow rate was 1 ml/min (Sabria *et al.*, 2003). Linearity was verified in triplicate with six different standard concentrations over the concentration range of the samples, resulting in correlation coefficients >0.999 . For NA, DA, 5HT and 5-HIAA, the intra-assay coefficients of variation values were 3.76%, 2.08%, 4.07% and 2.43%, respectively, and the inter-assay coefficients of variation values were 3.37%, 2.83%, 3.63% and 2.40%, respectively. The concentrations of monoamines and metabolites were expressed as ng/g weight tissue.

Muscle biochemical measurements

Small muscle pieces (0.5 g) were homogenized using a Ultra-turrax homogenizer (Ultra-Turrax T25 digital; IKA, Staufen, Germany) at 4°C in 4.5 ml of homogenization buffer (10 mM

potassium phosphate buffer (pH 7.4), 50 mM sodium chloride and 0.1% Triton-X 100 (BDH Prolabo Chemicals, VWR, Radnor, PA, USA) (1 : 10 w/v)). Then, the tissue homogenates were centrifuged at $1500 \times g$ for 6 min at 4°C , and the supernatants were collected. The amount of protein in the supernatants was measured using the method described by Bradford (1976).

The concentrations of the end products of the lipid peroxidation (LPO) cascade, reactive aldehyde malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxy-2-(E)-nonenal (4-HNE), were determined using an LPO Assay Kit (No. 437634; Calbiochem, San Diego, CA, USA) based on the condensation of the chromogene 1-methyl-2-phenylindole with either MDA or 4-HNE. The results are expressed as nmol (MDA + 4-HNE)/g protein. Total antioxidant activity (TAA) was determined using the ABTS/ H_2O_2 /HRP method (Arnao *et al.*, 2001; de Gonzalo-Calvo *et al.*, 2010). The results are expressed as equivalents of mg Trolox/mg protein.

Muscle western blot analysis

The muscle tissue homogenates (100 μg of protein per sample) were mixed with Laemmli sample buffer (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) and denatured by boiling at 100°C for 5 min. The samples were fractionated using SDS-PAGE at 100 V per two gels and subsequently transferred onto polyvinylidene fluoride membranes at 100 V (Immobilon TM-P; Millipore Corp., Bedford, MA, USA). The membranes were blocked for 1 h at room temperature with 10% (w/v) skim milk dissolved in Tris-buffered saline (TBS) (50 mM Tris/HCl (pH 7.5) and 150 mM NaCl). Subsequently, the membranes were incubated with the respective primary antibodies anti-Beclin-1 (4445; Cell Signaling, Danvers, MA, USA), anti-light chain 3 (LC3) (PD014; Medical & Biological Laboratories Co. Ltd, Naka-ku Nagoya, Japan) and anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (anti-GAPDH) (sc-20356; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), which were diluted previously in TBS buffer containing 1% (w/v) skim milk. After three 10 min washes (for Beclin-1 and GAPDH) or 20 min washes (for LC3) in TBS-T (50 mM Tris/HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl and 0.05% Tween-20), the membranes were incubated with the corresponding horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), which was diluted in TBS buffer containing 1% (w/v) skim milk, for 2 h at room temperature, followed by three 10 or 20 min washes in TBS-T. The membranes were developed using a chemiluminescent horseradish peroxidase substrate (WBKLS0500; Millipore Corp., Darmstadt, Germany) according to the manufacturer's instructions. The levels of proteins were analyzed quantitatively using Quantity One 5.5.1 software (Bio-Rad Laboratories Inc.). The results were normalized to GAPDH as a loading control.

Proteasome activity assay

Proteasome activity was assessed in homogenized muscle tissue using a 20 S proteasome activity assay kit (Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA). This assay is based on the detection of the fluorophore 7-amino-4-methylcoumarin

(AMC) after its cleavage from the labeled substrate IIVY-AMC by proteasome chymotrypsin-like activity. Free AMC is detected by fluorimetric quantification (380/460 nm). The data are presented as μM AMC/mg protein.

Statistical analysis

The individual animal was the experimental unit. The effect of cognitive bias on NT brain levels was determined by ANOVA using the GLM procedure of SPSS version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). For variables measured at different *postmortem* times (TAA, LPO, proteasome activity, Beclin-1, LC3-II/LC3-I ratio), the model included the effects of cognitive bias, aging time and their interaction as main effects. Once the interaction between the main factors was established, the effect of cognitive bias or the effect of aging time (with animal as the random factor) was tested. When significant, differences between individual means were analyzed with the Bonferroni *post hoc* test. It is worth to notice that the experimental design was unbalanced, due to the unequal sample size that reflected the reality of the population. For this reason, the general lineal model procedure that applies sums of squares type III was used as a correction method, although its estimates may be slightly conservative (1% to 5% lower rejection rates of H_0 in comparison with analyses of balanced datasets, as shown by Landsheer and van den Wittenboer, 2015).

Results

Neurotransmitter profile study

The analysis of NT levels in the selected brain structures showed that DA level in the pre-frontal cortex was significantly lower ($P < 0.001$) in NB pigs than in PB pigs. Also, a significant increase in 5HT ($P < 0.01$) and higher but not significant values of NA and 5-HIAA in the hippocampus of NB individuals were observed compared with those in the PB individuals (Table 1).

Oxidative stress status

Table 2 shows the results of biomarkers of oxidative stress, including muscle LPO (indicator of oxidative damage) and

TAA (antioxidant defence). There was a significant effect ($P < 0.001$) of cognitive bias on the muscle TAA, which showed higher values in NB pigs compared with PB ones at any *postmortem* time. This difference was significant even at 0 h *postmortem*, probably as a response of the muscle cells to an increased free radical generation at slaughter, and was maintained throughout the whole *postmortem* period. However, this antioxidant response was not fast enough to prevent higher levels of LPO in the muscle tissue of NB pigs at 0 h, but contributed to a significant decrease in oxidative damage during meat maturation ($P < 0.001$).

This decrease of LPO at early *postmortem* time (0 to 4 h) was greater ($P < 0.001$) in NB animals, thus showing a significant interaction of cognitive bias and *postmortem* time on meat oxidative damage.

Proteasome activity

Consistent with the oxidative stress status, the results indicate significantly higher ($P < 0.001$) 20S proteasome activity in the muscle tissues of NB pigs at 0 h *postmortem* (Figure 1a), whereas PB pigs showed significantly increased 20S proteasome activity at 4 h *postmortem* ($P < 0.001$) (Figure 1b), thus showing an evident lag in the system response of the muscle cells. These results seem to indicate higher free radical production in the muscle tissues of NB animals due to higher peri-slaughter stress, whereas this effect was retarded in PB pigs. The gradual decay in proteasome activity over time ($P < 0.001$) was equivalent in both cases (Figure 1b).

Characterization of autophagic processes

The levels of the autophagy biomarkers Beclin-1 and microtubule-associated protein I LC3 were analyzed in the muscle extracts. Beclin-1 is a class III phosphatidylinositol 3-kinase-interacting protein (60 kDa) that plays an important role in promoting autophagy. The immunoblot analysis in both animal groups (NB and PB) showed active Beclin-1 and therefore autophagic activities in the *postmortem* muscle tissue (Supplementary Figure S1), although the evolution of

Table 1 Effect of cognitive bias (positive bias (PB) or negative bias (NB)) on the concentrations of catecholamines and indoleamines in different brain regions

	Amygdale				Cortex				Hippocampus			
	PB	NB	SE	Sign.	PB	NB	SE	Sign.	PB	NB	SE	Sign.
Catecholamines (ng/g)												
Noradrenaline (NA)	175.58	166.49	42.48	ns	89.01	104.06	22.85	ns	116.63	150.50	27.89	ns
Dopamine (DA)	407.26	449.42	137.48	ns	30.49	10.52	2.33	***	26.58	23.25	9.41	ns
Ratio NA/DA	0.32	0.42	0.08	ns	2.73	9.83	1.62	ns	5.20	6.97	3.01	ns
Indoleamines (ng/g)												
5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA)	289.05	249.51	48.48	ns	82.41	83.85	18.29	ns	120.87	156.29	27.02	ns
Serotonin (5HT)	1138.03	872.01	232.73	ns	275.01	231.35	39.95	ns	241.92	336.51	23.19	**
Ratio 5-HIAA/5HT	0.25	0.31	0.04	ns	0.31	0.36	0.06	ns	0.51	0.47	0.12	ns

SE = pooled standard error; ns = not significant.

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Table 2 Effect of cognitive bias (CB) (positive bias (PB) or negative bias (NB)), postmortem time (T) (0, 4, 8, 24 h) and their interaction (CB × T) on total antioxidant activity (TAA, mg Trolox/mg protein) and lipid peroxidation (LPO, μmol malondialdehyde +4-hydroxy-2-(E)-nonenal/g protein) in Longissimus dorsi muscle

CB	PB				NB				SE	Statistical significance		
	0 h	4 h	8 h	24 h	0 h	4 h	8 h	24 h		CB	T	CB × T
TAA	24.05	21.77	27.08	25.18	37.88	28.43	32.48	31.73	10.56	***	ns	ns
LPO	34.96 ^a	30.54 ^{ab}	31.81 ^{ab}	26.31 ^b	59.02 ^a	30.02 ^a	26.31 ^b	22.42 ^b	16.04	ns	***	***

SE = pooled standard error; ns = not significant.

^{a,b}For a given CB, means in the same row followed by different letters are significantly different at $P < 0.05$.

*** $P < 0.001$.

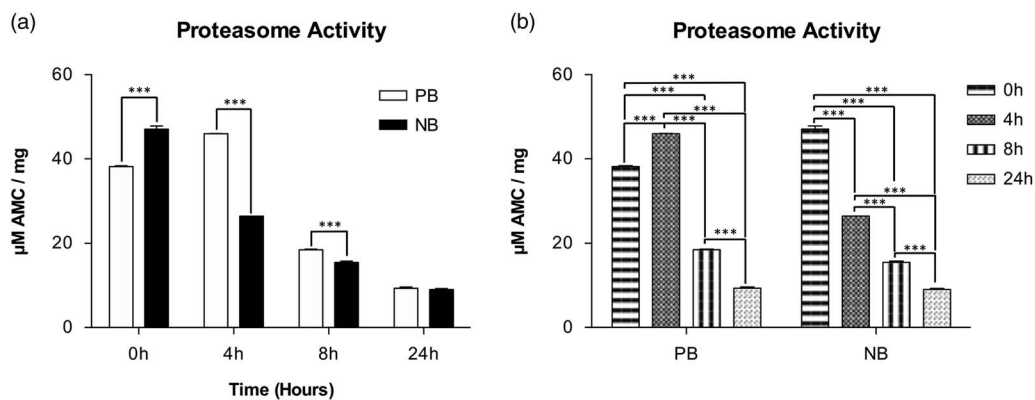


Figure 1 Proteasome activity in the muscle (mean \pm SEM), expressed as μM 7-amino-4-methylcoumarin (AMC)/mg protein; (a) effect of cognitive bias (positive bias (PB) or negative bias (NB)) on the proteasome activity at different *postmortem* time; (b) effect of *postmortem* time (0, 4, 8 and 24 h) on the muscle proteasome activity within the different animal groups for the cognitive bias test (PB and NB). *** $P < 0.001$.

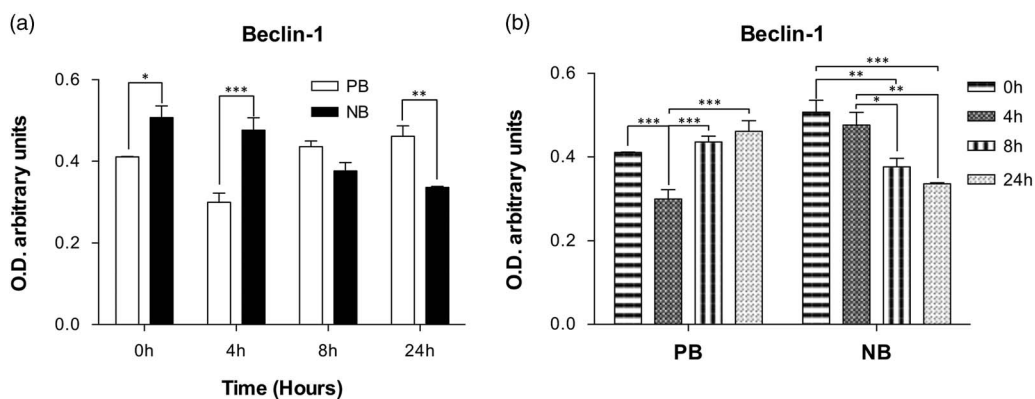


Figure 2 (a) Effect of cognitive bias (positive bias (PB) or negative bias (NB)) on Beclin-1 expression at different *postmortem* time; (b) effect of *postmortem* time (0, 4, 8 and 24 h) on Beclin-1 expression within the different animal groups for the cognitive bias test (PB and NB). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Data expressed as semi-quantitative optical density (arbitrary units) of blot bands normalized to GAPDH.

these activities differed depending on the animal's cognitive bias. Beclin-1 evolution in NB animals showed a similar trend to that found for the proteasome activity, with higher levels than in PB pigs at 0 ($P < 0.05$) and 4 h *postmortem* ($P < 0.001$, Figure 2a), followed by a gradual decrease during meat conditioning (from 4 to 24 h *postmortem*). However, an opposite trend was observed in the muscle of PB pigs, with significant increased Beclin-1 expression over the final hours of the study, that is, from 4 to 24 h *postmortem* (Figure 2b).

The conversion of LC3-I (soluble unlipidated form) to LC3-II (membrane-bound, phospholipid conjugate form) correlates with completed autophagosomes and autolysosomes and with inevitable autophagy; thus, the immunoblot analysis of the autophagy flux (i.e. the ratio LC3-II/LC3-I) is a useful marker of autophagic activity. Western blot analysis showed two bands corresponding to LC3-I and LC3-II (18 and 16 kDa, respectively, Supplementary Figure S2). Significant differences were observed between both animal groups in the autophagy flux (Figure 3a), with higher level of the ratio

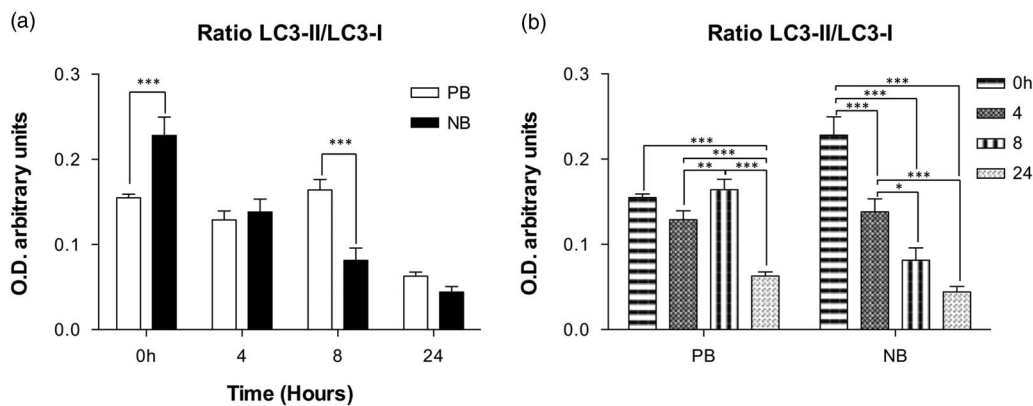


Figure 3 (a) Effect of cognitive bias (positive bias (PB) or negative bias (NB)) on the autophagy flux (LC3-II/LC3-I ratio) at different *postmortem* time; (b) effect of *postmortem* time (0, 4, 8 and 24 h) on LC3-II/LC3-I ratio within the different animal groups for the cognitive bias test (PB and NB). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Data expressed as semi-quantitative optical density (arbitrary units) of blot bands normalized to GAPDH.

LC3-II/LC3-I in the LD muscle of NB pigs at early *postmortem* time (0 h), followed by a significant decrease during meat conditioning (Figure 3b). However, the muscle of PB pigs showed a delay in the presence of these autophagy markers, thus showing higher level ($P < 0.001$) than in NB pigs at later *postmortem* times (8 h).

Discussion

The results of this study show that biochemical and cellular mechanisms involved in the *postmortem* conversion of muscle into meat may vary as a function of the psychological condition of animals at slaughter, which, in turn, depends on their cognitive bias, that reflects their emotional state and its influence on cognitive processes and information processing including attention, learning, memory and decision making (Mendl *et al.*, 2009).

In the present study, pigs were classified using a novel cognitive test that allows individual animals to be classified into 'PB' or 'NB', thus reflecting a positive or negative emotional state. Our hypothesis was that the pig's emotional state would affect its interpretation of the different stimuli related to slaughter and consequently its susceptibility to stress at slaughter and this should be associated with a specific pattern of NTs, that have been proposed as physiological markers of stress (Yeates and Main, 2008). In the literature, changes in brain NT profile in genetically stress-susceptible pigs and their involvement in aggressiveness and dominance have been reported (Adeola *et al.*, 1993; Poletto *et al.*, 2010, 2011). Also, the relationship between brain NTs and fear-related behavior in pigs have recently been demonstrated by our group (Arroyo *et al.*, 2016) in a study in which fearful animals subjected to stressful handling showed higher concentration of catecholamines and indoleamines, specially serotonin, in the hippocampus.

Our findings are in accordance with these previous publications, although it is worthwhile to mention that the low number of animals classified as NB limits a general interpretation of our results. In our study NB pigs, that were presumably more prone to regard with suspicion and fear

any strange and threatening stimuli related to slaughter, showed higher serotonin levels in the hippocampus at slaughter, despite having a calm and smooth pre-slaughter handling, which indicate higher susceptibility to slaughtering stress. Furthermore, higher serotonin concentration found in the hippocampus of NB individuals agree with several studies that have described that under different situations of stress there is an increased release of noradrenaline and serotonin in the hippocampus in rats (Mora *et al.*, 2012) and pigs (Piekarzewska *et al.*, 1999). Our results also agree with the report of Bauer (2015) who associated higher levels of serotonin with fear or anxiety. This could be due to the fact that the hippocampus is the brain structure that was first recognized as the target for stress hormones (Mora *et al.*, 2012). All these results support the idea that animals in a negative psychological state may have poorer management of stress situations.

Dopamine has also been linked to a number of important psychological processes including reward-motivated behavior, hedonic reactions to positive reward, provision of an error detection signal during the acquisition of new learning, response to novel stimuli, provision of reinforcement signals essential for acquisition of new action patterns and incentive motivation (Phillips *et al.*, 2008). All these arguments reinforce the suggestion that the higher levels of DA in the pre-frontal cortex of PB animals could be linked to a positive reaction to new stimuli, even those related to pre-slaughter management.

It is widely accepted that the pre-slaughter management is likely the most stressful situation for the animal destined to meat production, whose effects are clearly related to each animal's ability to cope with it. A recent review indicated the relationship between mood disorders, including anxiety and stress, and several potential contributors to cellular oxidative stress and proposed LPO as an important damage marker for anxiety disorders (Salim, 2014). Also, it has been shown that psychological stress results in oxidative damage in the muscle (Li *et al.*, 2011; Rubio-Gonzalez *et al.*, 2015). Our results are in agreement with these authors in showing higher oxidative damage in the LD muscle of NB pigs at

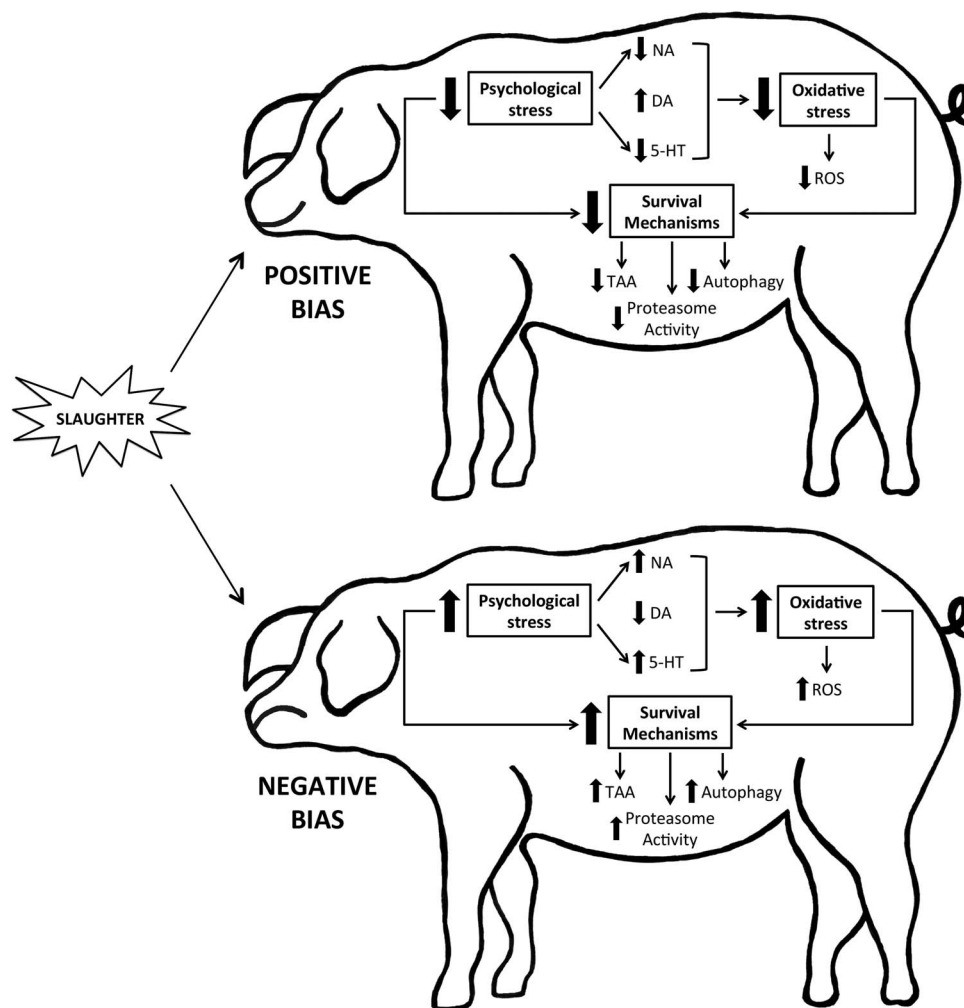


Figure 4 Summary of primary factors implicated in this study and the relation established between them. An animal's susceptibility to stress at slaughter depends on its cognitive bias and shows some neurotransmitter variations, which induce physiological responses and changes in the muscle response to oxidative stress, triggering autophagy as a muscle cell survival mechanism. NA = noradrenaline; DA = dopamine; 5HT = serotonin; ROS = reactive oxygen species; TAA = total antioxidant activity.

slaughter (0 h *postmortem*), which demonstrate a relationship between psychological stress at slaughter and muscle cell damage. Increased enzymatic antioxidant systems have also been observed as possible adaptive response to stress under different situations (Caballero *et al.*, 2006; Rubio-Gonzalez *et al.*, 2015). In the present study, this adaptive response to stress was higher in the muscle of NB pigs compared with PB ones. However, this antioxidant response was not fast enough to prevent higher levels of LPO in the muscle tissue of NB pigs at 0 h *postmortem*, but contributed to a significant decrease in oxidative damage during meat maturation.

All these factors, together with the animal's cognitive bias and its susceptibility to stress may affect to the weakening of muscle cells under *postmortem* conditions, which depends on the proteolysis extent of key target proteins that are regulated by the synergic and combined action of different proteolytic systems, such as lysosome and proteasome (Houbak *et al.*, 2008; Ouali *et al.*, 2013). It has been demonstrated the role of lysosomal cathepsins in meat maturation (Maribo *et al.*, 1999; Caballero *et al.*, 2007) and

also that lysosomal permeabilization and cathepsins release is often an early event in the cell response to oxidative stress (Conus and Simon, 2008). Also, It is known that the proteasome degrade most intracellular proteins, including both short- and long-lived proteins, being the Ub/20S proteasome system responsible for this protein degradation (Ouali *et al.*, 2013). However, the role of the proteasome system in early meat tenderization is still unknown, but its activation is considered one of the first responses to cellular stress. In this study, the higher proteasome activity in the LD muscle of NB at 0 h *postmortem* compared with PB pigs and its faster *postmortem* decline could have been induced by the psychological and oxidative stress suffered by these animals at slaughter. Based on these results, NB pigs seem to be more susceptible to slaughter stress than PB pigs, that showed a delay in the *postmortem* evolution of the proteasome activity in the muscle.

Oxidative stress produced by pre-slaughter stress can induce in the muscle another proteolytic mechanism known as autophagy (Rubio-Gonzalez *et al.*, 2015). This can be

related to an increase in the tissue ROS level, which can activate autophagy as a defence mechanism to prevent cellular damage. Based on our previous findings that demonstrated the occurrence of autophagy processes in the *pre-rigor* phase of beef conditioning (García-Macia *et al.*, 2014), and that certain degree of psychological stress at slaughter may influence the time-scale evolution of autophagy biomarkers in the *postmortem* muscle of pigs (Rubio-Gonzalez *et al.*, 2015), the present study aimed to extend the knowledge regarding the relationship between autophagy markers and the animal's cognitive bias and its subsequent susceptibility to peri-slaughter stress. Our results show a significant effect of the animal's emotional state on the *postmortem* evolution of autophagy in the muscle tissue, with NB pigs showing increasing values of Beclin-1 at early *postmortem* time (0 to 4 h *postmortem*), most likely resulting from the attempt of the muscle cell to counteract oxidative stress at slaughter, followed by a significant decrease during meat conditioning. However, PB pigs showed a delay in the muscle autophagy onset, with lower level of Beclin-1 at early *postmortem* times.

A similar pattern of variation showed the ratio LC3-II/LC3-I (considered marker of autophagy) in the LD muscle of NB pigs, then showing that the autophagy onset occurred earlier in the muscle of NB animals, that had higher susceptibility to stress, and it appeared as a mechanism of cell survival in order to counteract the increased oxidative stress.

In conclusion, the present study reveals the effect of the animal's cognitive bias and its related response to pre-slaughter stress on the *postmortem* muscle metabolism, and its high influence on the muscle oxidative stress, the proteasome activity and the autophagy onset during the first phases of *postmortem* tenderization (Figure 4). Furthermore, our results highlight the potential contribution of biomarkers of proteolysis, autophagy and oxidative stress in the cell muscle for the assessment of pre-slaughter stress. Our findings expand the current knowledge regarding biomarkers of animal welfare and we propose the use of the proteasome activity (20S), the main biomarkers of autophagy (Beclin-1, LC3-II/LC3-I ratio) and the muscle antioxidant defence (TAA, LPO) as potential biomarkers of peri-slaughter stress. However, our study was limited due to the low number of NB animals detected in the population, so further studies will be necessary in order to confirm these results.

Acknowledgment

The authors would like to thank to the staff of IRTA involved in animal handling and sample collection. This work was supported by FISS-13-RD12/0043/0030 and FISS-14-PI13/02741 (Instituto de Salud Carlos III), GRUPIN-071 (PCTI), AGL2010-21578-C03 and AGL2011-30598-C03 (Ministerio de Economía y Competitividad) and FEDER funds. Y. P. thanks a pre-doctoral fellowship from the Vicerrectorado de Investigación y Campus de Excelencia Internacional (Universidad de Oviedo) and FISS pre-doctoral fellowship (F114/00405) from the Ministerio de

Economía y Competitividad (Instituto de Salud Carlos III). B. d. L.-D. is a FICYT pre-doctoral fellowship (BP11-135) from PCTI of Gobierno del Principado de Asturias. Some of the authors are members of the INPROTEOLYS and INEUROPA networks.

Supplementary material

To view supplementary material for this article, please visit <https://doi.org/10.1017/S1751731117000714>

References

- Adeola O, Ball RO, House JD and O'Brien PJ 1993. Regional brain neurotransmitter concentrations in stress-susceptible pigs. *Journal of Animal Science* 71, 968–974.
- Arnao MB, Cano A and Acosta M 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry* 73, 239–244.
- Arroyo L, Carreras R, Valent D, Pena R, Mainau E, Velarde A, Sabria J and Bassols A 2016. Effect of handling on neurotransmitter profile in pig brain according to fear related behaviour. *Physiology & Behavior* 167, 374–381.
- Bauer EP 2015. Serotonin in fear conditioning processes. *Behavioural Brain Research* 277, 68–77.
- Berridge CW and Waterhouse BD 2003. The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Research Reviews* 42, 33–84.
- Bradford MM 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Caballero B, Sierra V, Oliván M, Vega-Naredo I, Tomás-Zapico C, Álvarez-García O, Tolvía D, Hardeland R, Rodríguez-Colunga MJ and Coto-Montes A 2007. Activity of cathepsins during beef aging related to mutations in the myostatin gene. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87, 192–199.
- Caballero B, Tomas-Zapico C, Vega-Naredo I, Sierra V, Tolvía D, Hardeland R, Rodríguez-Colunga MJ, Joel A, Nevo E, Avivi A and Coto-Montes A 2006. Antioxidant activity in *Spalax ehrenbergi*: a possible adaptation to underground stress. *Journal of Comparative Physiology* 192, 753–759.
- Carreras R, Mainau E, Rodríguez P, Dalmáu A, Manteca X and Velarde A 2015. Cognitive bias in pigs: individual classification and consistency over time. *Journal of Veterinary Behavior* 10, 577–581.
- Conus S and Simon H-U 2008. Review: cathepsins: key modulators of cell death and inflammatory responses. *Biochemical Pharmacology* 76, 1374–1382.
- Coto-Montes A, Boga JA, Rosales-Corral S, Fuentes-Broto L, Tan DX and Reiter RJ 2012. Role of melatonin in the regulation of autophagy and mitophagy: a review. *Molecular and Cellular Endocrinology* 361, 12–23.
- de Gonzalo-Calvo D, Neitzert K, Fernandez M, Vega-Naredo I, Caballero B, García-Macia M, Suarez FM, Rodríguez-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 Radical Biology & Medicine* 49, 733–737.
- European Union 2007. Amendments to the treaty on European Union and to the treaty establishing the European community. *Official Journal of the European Communities* 50, 1–271.
- European Union 2010. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Communities* L276, 33–79.
- García-Macia M, Sierra V, Palanca A, Vega-Naredo I, de Gonzalo-Calvo D, Rodríguez-Gonzalez S, Oliván M and Coto-Montes A 2014. Autophagy during beef aging. *Autophagy* 10, 137–143.
- Houbak MB, Ertbjerg P and Therkildsen M 2008. *In vitro* study to evaluate the degradation of bovine muscle proteins post-mortem by proteasome and mu-calpain. *Meat Science* 79, 77–85.
- Jorgensen A 2013. Oxidatively generated DNA/RNA damage in psychological stress states. *Danish Medical Journal* 60, B4685.
- Lana A and Zolla L 2015. Apoptosis or autophagy, that is the question: two ways for muscle sacrifice towards meat. *Trends in Food Science & Technology* 46, 231–241.
- Landsheer J and van den Wittenboer G 2015. Unbalanced 2 x 2 factorial designs and the interaction effect: a troublesome combination. *PLoS ONE* 10, e0121412.

- Li Q, Zhang M, Chen YJ, Wang YJ, Huang F and Liu J 2011. Oxidative damage and HSP70 expression in masseter muscle induced by psychological stress in rats. *Physiology & Behavior* 104, 365–372.
- Logue SF and Gould TJ 2013. The neural and genetic basis of executive function: attention, cognitive flexibility, and response inhibition. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 123, 45–54.
- Maribo H, EWrtbjerg P, Andersson M, Barton-Gade P and Müller AJ 1999. Electrical stimulation of pigs- effect on pH fall, meat quality and Cathepsin B+L activity. *Meat Science* 52, 179–187.
- Mendl M, Burman OHP, Parker RMA and Paul ES 2009. Cognitive bias as an indicator of animal emotion and welfare: emerging evidence and underlying mechanisms. *Applied Animal Behaviour Science* 118, 161–181.
- Mora F, Segovia G, Del Arco A, de Blas M and Garrido P 2012. Stress, neurotransmitters, corticosterone and body-brain integration. *Brain Research* 1476, 71–85.
- Nakhaee A, Shahabizadeh F and Erfani M 2013. Protein and lipid oxidative damage in healthy students during and after exam stress. *Physiology & Behavior* 118, 118–121.
- Ouali A, Gagaoua M, Boudida Y, Becila S, Boudjellal A, Herrera-Mendez CH and Sentandreu MA 2013. Review: biomarkers of meat tenderness: present knowledge and perspectives in regards to our current understanding of the mechanisms involved. *Meat Science* 95, 854–870.
- Phillips AG, Vacca G and Ahn S 2008. A top-down perspective on dopamine, motivation and memory. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 90, 236–249.
- Piekarzewska A, Sadowski B and Rosochacki SJ 1999. Alterations of brain monoamine levels in pigs exposed to acute immobilization stress. *Zentralbl Veterinarmed A* 46, 197–207.
- Poletto R, Cheng HW, Meisel RL, Garner JP, Richert BT and Marchant-Forde JN 2010. Aggressiveness and brain amine concentration in dominant and subordinate finishing pigs fed the beta-adrenoreceptor agonist ractopamine. *Journal of Animal Science* 88, 3107–3120.
- Poletto R, Cheng HW, Meisel RL, Richert BT and Marchant-Forde JN 2011. Gene expression of serotonin and dopamine receptors and monoamine oxidase-A in the brain of dominant and subordinate pubertal domestic pigs (*Sus scrofa*) fed a beta-adrenoreceptor agonist. *Brain Research* 1381, 11–20.
- Rubio-Gonzalez A, Potes Y, Illan-Rodriguez D, Vega-Naredo I, Sierra V, Caballero B, Fabrega E, Velarde A, Dalmau A, Olivan M and Coto-Montes A 2015. Effect of animal mixing as a stressor on biomarkers of autophagy and oxidative stress during pig muscle maturation. *Animal* 9, 1188–1194.
- Sabria J, Torres D, Pasto M, Peralba JM, Allali-Hassani A and Pares X 2003. Release of neurotransmitters from rat brain nerve terminals after chronic ethanol ingestion: differential effects in cortex and hippocampus. *Addiction Biology* 8, 287–294.
- Salim S 2014. Oxidative stress and psychological disorders. *Current Neuropharmacology* 12, 140–147.
- Yeates JW and Main DC 2008. Assessment of positive welfare: a review. *Veterinary Journal* 175, 293–300.



Identification of Biomarkers of Stress in Meat of Pigs Managed under Different Mixing Treatments

Mamen Oliván^{1*}, Verónica Fernández-Suárez¹, Fernando Díaz-Martínez¹,
Verónica Sierra^{1,2}, Ana Coto-Montes², Beatriz de Luxán-Delgado²,
Raquel Peña³, Anna Bassols³, Emma Fàbrega⁴, Antoni Dalmau⁴
and Antonio Velarde⁴

¹Área de Sistemas de Producción Animal, SERIDA, Apdo.13, 33300 Villaviciosa, Asturias, Spain.

²Departamento de Morfología y Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo, C/ Julián Clavería s/n, 33006 Oviedo, Spain.

³Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Servei de Bioquímica Clínica Veterinària, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès, Spain.

⁴Animal Welfare Subprogram, IRTA, Veïnat de Sies s/n, 17121 Monells, Girona, Spain.

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration between all authors. Authors MO, AB and AV designed the study. Authors EF and AD were responsible of animal management. Authors VFS, FDM, VS, BDL and RP was performed sample analysis and data acquisition. Authors MO and VS performed the statistical analysis. Author MO wrote the manuscript. Authors MO, ACM, AB and AV performed data interpretation. All authors read and approved the final manuscript.

Article Information

DOI: 10.9734/BBJ/2016/22402

Editor(s):

(1) Kuo-Kau Lee, Department of Aquaculture, National Taiwan Ocean University, Taiwan.

Reviewers:

(1) Anonymous, Virginia State University, USA.

(2) Adela Marcu, Banat University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Romania.

(3) Cinthia Maria Carlos Pereira, State University of Santa Cruz, USA.

(4) Marcela Paola Castro, Universidad Nacional del Chaco Austral, Argentina.

(5) Paolo Polidori, University of Camerino, Italy.

Complete Peer review History: <http://sciencedomain.org/review-history/12376>

Original Research Article

Received 30th September 2015
Accepted 11th November 2015
Published 21st November 2015

ABSTRACT

Aims: The objective of this work was to apply the proteomic approach for identification of animal-based stress biomarkers during pig muscle maturation.

Study Design: Pigs were subjected to management treatments that may promote stress, like

*Corresponding author: Email: mcolivan@serida.org;

mixing unfamiliar animals on farm and/or during transport and lairage before slaughter. Three pre-slaughter treatments were applied: UF-UTL (Unmixed on Farm - Unmixed during Transport and at Lairage), MF-UTL (Mixed in Farm - Unmixed during Transport and at Lairage) and MF-MTL (Mixed in Farm - Mixed during Transport and at Lairage).

Methodology: Fifteen entire male pigs were used in this experiment. At slaughter, blood samples were taken for biochemical analysis. Meat quality traits (pH, electrical conductivity, drip loss, meat colour) were measured and muscle samples from the *Longissimus thoracis* were taken within the first 24 h post-mortem and used for analysis of total antioxidant activity (TAA) and sarcoplasmic protein profile study by SDS-PAGE.

Results: Mixing treatments (MF-UTL and MF-MTL) provoked faster muscle pH post-mortem decline ($P = .009$), lower total antioxidant activity ($P < .001$) and changes in some key proteins, like the heat shock 70kDa protein-1B ($P = .040$), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase "GAPDH" ($P = .047$), lactate dehydrogenase-A "LDH-A" ($P < .001$) and adenylate kinase isoenzyme-1 "AK-1" ($P < .001$). Furthermore, serum molecules related to fat metabolism (LDL-cholesterol and triglycerides) and changes of muscle proteins involved in the adenine nucleotide metabolism (AK-1) and glycolysis regulation (pyruvate kinase "PK" and GAPDH) allowed accurate prediction of muscle pH and discriminated correctly 87% of meat samples into "no-mixing" or "mixing" treatments.

Conclusions: Early monitorization (within 24 h after slaughter) of selected biomarkers could be used in the meat industry as a tool for detection of situations of pre-slaughter stress related to animal mixing practices. However more research is needed in order to validate these results on a broader animal population.

Keywords: Stress; biomarker; sarcoplasmic proteins; fat metabolism; pig; meat quality.

1. INTRODUCTION

Over the last decades, animal production systems have been intensified in order to be more efficient and to increase production. In this context, different housing strategies and management practices on farm and previous to slaughter are being studied as they could have a great influence on performance, animal welfare and product quality.

The welfare status of farm animals is becoming an important aspect of overall food quality from the consumer point of view in terms of ethical quality. However, animal welfare assessment is not a simple issue and requires a multi-criteria approach [1]. Furthermore, individual differences in agonistic abilities, emotional reactivity and animal responsiveness to stress make even more difficult to establish the welfare status of every single individual, which could differ from the average status of the animal group. Then, there is increasing interest in the development of reliable animal-based methodologies to assess individual perceptions of stress and its possible effect on animal's health and welfare status and consequently on the ultimate meat quality.

Mixing unfamiliar animals is a common practice in pig production, but it may lead to injuries and social stress within the group. Previous reports

have shown that mixing of unacquainted pigs is usually followed by fighting in order to create a new hierarchy [2,3]. Also, the removal of one or more animals in a pen may disrupt the already established rank orders and lead to fighting or stress in the remaining animals [4].

Exposing an animal to a pre-slaughter stressor will initiate a cascade of physiological reactions that may have an effect on meat quality, mostly negative. This phenomenon is well described in pigs, and a growing body of evidence suggest that pre-slaughter stress explains a large portion of the variation in the post-mortem muscle metabolism, and consequently of meat quality traits [5-7].

Most of the processes occurring in the muscle post-mortem are regulated by proteases and other proteins. Thus proteomics could be a useful tool for understanding biochemical pathways and cellular events involved in the process of meat quality acquisition and also for the identification of biomarkers of animal stress. To date, several studies have investigated proteins as potential biomarkers of meat quality, using proteomic approaches [8-11], some of them focused on the animal's susceptibility to stress [12,13]. However, the high inconsistency of results reflects the complexity of the processes involved.

The objective of this work was to apply the proteomic approach to increase our understanding of the effect of mixing unfamiliar pigs at different stages of the production process on the individual animal's responsiveness to stress and therefore on its physiological responses at slaughter and on the post-mortem muscle metabolism, in order to identify candidate animal-based biomarkers of pre-slaughter stress.

This study is a part of a broader investigation in which the effect of mixing and slaughter strategy on behaviour, welfare, performance and meat quality was evaluated. The results of animal behavior, welfare and productivity [4] and biomarkers of autophagy and oxidative stress [14] have already been published.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Animals and Experimental Management

Fifteen entire male piglets ((Large White x Landrace) x Duroc) were used in this experiment and subjected to rearing treatments that may promote stress, like mixing unfamiliar animals on farm and/or during transport and lairage prior to slaughter. These pigs took part of a bigger experiment in which 96 animals were managed under two rearing treatments during the fattening period: half of them were in a wean-to-finish regime, and the others were mixed as in conventional farms practice (for complete explanation of management and housing conditions, see [4]).

When reaching 120 kg weight, pigs were slaughtered at an experimental abattoir located at a distance of 1 km (5-10 minutes lorry drive) and the handling and transport was gentle to avoid additional stress. During the phase of pre-slaughter management, two different treatments were applied: some animals were not mixed with animals from other pens during transport and lairage previous to slaughter (Unmixed group during transport and lairage, "UTL") and others were mixed with unfamiliar animals (Mixed group during transport and lairage, "MTL"). Lairage time ranged from 30 min to 2 h. Within the whole experiment of 96 animals, 15 pigs from the same slaughtering batch were randomly selected for the biochemical and proteomic study, in order to standardize slaughtering conditions, having 5 animals in each of three different management treatments:

- UF-UTL (Unmixed on Farm - Unmixed during Transport and at Lairage)
- MF-UTL (Mixed on Farm - Unmixed during Transport and at Lairage)
- MF-MTL (Mixed on Farm - Mixed during Transport and at Lairage)

2.2 Sample Collection and Meat Quality Measurements

Blood was collected at exsanguination in tubes without anticoagulant. Serum was obtained by centrifugation at 2000xg for 10 min and kept in aliquots at -80°C.

The left side of each carcass was used to assess meat quality. Muscle pH was measured at 45 min (pH45) and at 24 h (pH24) post-mortem on the *Semimembranosus* (SM) muscle, using a Crison portable pH-meter equipped with a xerolyt electrode. Electrical conductivity (EC) was also measured at 24 h post-mortem on the SM using a Pork Quality Meter (PQM-I, INTEK Aichach, Germany). Meat samples (20 g) were taken from the *Longissimus thoracis* (LT) muscle immediately after slaughter (t= 0 h) and after 4 h, 8 h and 24 h of meat conditioning at 4°C, for analysis of electrophoretic protein profile and total antioxidant activity (TAA). These muscle samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

Meat colour was recorded on three 10 mm diameter spots on the exposed cut surface of the LT muscle at the last rib level at 24 h post-mortem. Indicators of lightness (L*), redness (a*) and yellowness (b*) were taken using a Minolta C2002 Spectrophotometer, illuminant C (Konica Minolta Inc., Madrid, Spain), and the average value of the three spots was used.

Meat drip loss (% exudates) was determined in duplicate on 25 mm diameter fresh samples taken from the LT at 24 h post-mortem and placed in a special container (Meat juice collector, Sarstedt, Germany), according to the method of Rasmussen and Andersson [15] with small modifications.

2.3 Biochemical and Physiological Parameters

The measurement of serum metabolic parameters was carried out with the Olympus AU400 Chemistry Analyzer (Beckman Coulter Inc., Barcelona, Spain). Glucose (hexokinase method), cholesterol (CHOP-PAP-method),

high density lipoprotein (HDL)-cholesterol (Immunoinhibition method), low density lipoprotein (LDL)-cholesterol (Selective protection method), triglycerides (GPO-PAP method), lactate (LDH method), total protein (Biuret method), haptoglobin (Phase Haptoglobin kit) and creatine kinase ("CK", IFCC method) were determined using the Olympus System Reagents (Olympus Diagnostica GmbH, Dublin, Ireland). Non-esterified fatty acids (NEFAs) were determined with NEFA-C reagent (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Germany), 3-hydroxybutyrate with Ranbut and Glutathione Peroxidase (GPx) with Ransel (both from Randox Laboratories Ltd., Crumlin, UK). All parameters were analyzed in duplicate. Muscle Total Antioxidant Activity (TAA) was determined at 0 h post-mortem using the ABTS/H₂O₂/HRP method described by de Gonzalo-Calvo et al. [16]. Results are expressed in equivalents of mg Trolox/mg protein.

2.4 Sarcoplasmic Protein Extraction and Electrophoresis

Sarcoplasmic proteins were extracted from 2 g of muscle homogenized in 15 ml of extraction buffer (pH=7.4) containing 0.1M Phosphate buffer using an Ultra-Turrax T25 mixer (IKA, Staufen, Germany) three times for 15 s at maximum speed. Homogenates were centrifuged at 1000xg for 30 min at 4°C. Supernatants were filtered through cheesecloth and samples were frozen at -20°C. Protein concentrations were determined by the Bradford method [17], using bovine serum albumin as standard. 120µg of proteins were denatured by mixing with sample buffer (62.5 mM Tris/HCl pH 6.8, 2% SDS, 20% glycerol, 5% mercaptoethanol, 0.025% of bromophenol blue) and heated at 95°C for 5 min, and loaded to 1mm dual vertical slab gels (Xi Protean II, Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA) for one-dimensional sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The resolving gel contained 11% and the stacking gel 4% of 30% (w/v) acrylamide:bisacrylamide and a mixture of Tris/HCl (375 mM) pH 8.8, milli-Q water, SDS 10% (w/v), ammonium persulphate 10% (w/v), and 0.1% TEMED. Pre-stained molecular weight standards (Precision Plus Protein™ All Blue Standards, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA) were added on each gel. Gels were run at 80 volts for 2 h, 160 volts for 2 h, 250V 10 h and 500 volts for 20 min (Universal PowerPack 500, Bio-Rad), stained in a mixture of 30% (v/v) methanol, 10% (v/v) acetic acid and 0.01% (w/v)

Coomassie Brilliant Blue R-250 and destained using a mixture of 40% (v/v) methanol and 10% (v/v) acetic acid. Three gels were produced per sample.

2.5 Image Analysis and Protein Identification by Peptide Mass Fingerprint

Stained gel images were captured using a GS-800 Imaging Densitometer (Bio-Rad) and analyzed using image analysis software Quantity One 5.5.1 (Bio-Rad). To account for slight variations in protein loading, the density protein bands was expressed as relative intensity.

Bands of interest were manually excised and sent for identification to the proteomics laboratory of Inbiotec S.L. (León, Spain), where the proteins were digested following the method of Havlis et al. [18] and processed for further analysis as indicated by Jami et al. [19]. The samples were analyzed with a 4800 Proteomics Analyzer matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF/TOF) mass spectrometer (ABSciex, MA, USA). A 4700 proteomics analyzer calibration mixture (Cal Mix 5, ABSciex) was used as external calibration. All MS spectra were internally calibrated using peptides from the trypsin digestion. The analysis by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry produced peptide mass fingerprints, and the peptides observed (up to 65 peptides per spot) were collected and represented as a list of monoisotopic molecular weights with a signal to noise (S/N) ratio greater than 20 using the 4000 Series Explorer v3.5.3 software (ABSciex). All known contaminant ions (trypsin- and keratin- derived peptides) were excluded for later MS/MS analysis. Hence, from each MS spectra, the 10 most intensive precursors with S/N greater than 20 were selected for MS/MS analyses with CID in 2-kV ion reflector mode and precursor mass windows of ±7 Da. The default calibration was optimized for the MS/MS spectra.

For protein identification, Mascot Generic Files combining MS and MS/MS spectra were automatically created and used to interrogate a non-redundant protein database using a local license of Mascot v 2.2 from Matrix Science through the Global Protein Server v 3.6 (ABSciex). The search parameters for peptide mass fingerprints and tandem MS spectra obtained were set as follows: i) NCBI nr (2012.06.26) sequence databases were used; ii) taxonomy: All entries (18713758 sequences,

6412106995 residues); iii) fixed and variable modifications were considered (Cys as S carbamidomethyl derivative and Met as oxidized methionine); iv) one missed cleavage site was allowed; v) precursor tolerance was 100 parts per million and MS/MS fragment tolerance was 0.3 Da; vi) peptide charge: 1+; and vii) the algorithm was set to use trypsin as the enzyme. Protein candidates produced by this combined peptide mass fingerprinting/tandem MS search were considered valid when the global Mascot score was greater than 85 with a significance level of $P < .05$.

2.6 Statistical Analysis

The effect of mixing treatment (UF-UTL, MF-UTL or MF-MTL) on meat quality traits, biochemical and proteomic variables was analyzed by Analysis of Variance (ANOVA) using the General Linear Model (GLM) procedure of SPSS (v 15.0 2006, SPSS Inc, Chicago, USA). For variables measured at different post-mortem time (sarcoplasmic protein profile) the model included the effects of mixing treatment, post-mortem time and their interaction as main effects. Once the interaction between mixing treatment and time was discarded, the effect of mixing treatment or the effect of time (with animal as random factor), were tested. When significant, differences were analysed by means of the Tukey post-hoc test (Games-Howell test when variances were not homogeneous).

Multiple linear regression models were calculated for prediction of main meat quality traits (pH45, EC24, L*, drip loss) and independent variables (metabolites detected in the serum at slaughter, muscle TAA and the muscle sarcoplasmic profile obtained at 0 h, 4 h, 8 h and 24 h post-mortem) were selected by the stepwise method, which included or removed iteratively independent variables from the model according to their significance ($P < .05$). The purpose of the model was to determine which biomarkers (metabolites and peptide bands) contributed to the ultimate meat quality. The predictive ability of the obtained models was evaluated in terms of the coefficient of determination (R^2), root mean square error of prediction (RMSEP) and the residual predictive deviation (RPD) which is the ratio of prediction error (SEP) to range in reference values (SD) and is used to test the accuracy of prediction models.

In order to ascertain if bioindicators (biochemical variables and bands/peptides) included in the regression models could be used for

discrimination of meat products according to the pre-slaughter animal management ("no-mixing" or "mixing"), discriminant analysis was performed using the dummy regression technique on the biochemical/electrophoretic profiles, by applying The Unscrambler® software (v 9.8, CAMO, Trondheim, Norway). The meat samples were identified with dummy variables (no-mixing = 1; mixing = 2) and PLS (partial least squares) regression was used to generate a mathematical model that was cross-validated (leave one-out) to select the most relevant PLS components. According to this model, a meat sample was correctly classified as belonging to a specific management category (no-mixing/mixing) if the predicted value was within ± 0.5 of the dummy value.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Meat Quality Traits

There was a significant ($P = .009$) effect of the mixing treatment on the pH measured on the SM muscle at 45 minutes post-mortem (pH45, Table 1), with a faster pH decline in the treatments with animal mixing, either mixing on farm (MF-UTL) or mixing on farm and during transport and at lairage (MF-MTL), although ultimate pH was similar in all groups (pH24=5.5). This is in agreement with Støier et al. [20], who found that pre-slaughter handling (traditional vs low stress stunning) significantly resulted in changes of pH fall in pork meat within the first 6 h post-mortem, although the muscle pH became similar at 24 h post-mortem.

It has been shown that post-mortem pH and temperature kinetics of the muscle may influence the rate and extent of protein denaturation, oxidation and proteolysis, colour characteristics and water holding capacity of meat [21]. In our trial there was a tendency for more exudative meat (higher drip loss, $P = .157$) when animals were subjected to mixing treatments (MF-UTL and MF-MTL) compared to animals coming from the unmixed group (UF-US), although the difference was not significant (Table 1). This could be due to the small sample size but also could reflect high individual variability, especially in the MF-UTL group, where the standard deviation exceeded the mean. This high individual variation could reflect high variability in the animal's susceptibility to stress, which could be the reason for the inconsistencies found in the literature, with some works describing a negative effect of pre-slaughter stress on meat quality

[21,22], while others did not find significant effects [23,24].

3.2 Biochemical and Physiological Parameters

Biochemical and physiological parameters measured on serum and muscle samples at slaughter are presented in Table 2. There was a significant ($P < .001$) effect of mixing treatment on the total antioxidant activity (TAA) of the muscle at 0 h post-mortem, being higher in the tissue of animals from the unmixed treatment (UF-UTL=19.55 mg Trolox/mg protein) than in animals mixed at farm (MF-UTL= 11.62 mg/mg) or at farm and during transport and lairage (MF-MTL=12.40 mg/mg). This seems to indicate a healthier oxidative status of the muscle tissue of animals coming from the unmixed treatment, probably due to lower level of pre-slaughter stress.

Mixing treatments did not switch other physiological variables, although there was a marked increase in concentrations of glucose, haptoglobin and CK in blood serum, as the level

of animal mixing increased (UF-UTL<MF-UTL<MF-MTL) and also higher levels of triglycerides and hydroxybutyrate in the serum of animals coming from the double mixing treatment (at farm and previous to slaughter: MF-MTL). Then, it seems that social stress due to animal mixing could impose higher demand on the energy metabolism, which turned into higher levels of serum glucose (due to the gluconeogenic effects of glucocorticoids, as found by Becker et al. [25], associated with animal stress during transportation), CK (marker of skeletal muscle and good indicator of vigorous physical activity or tissue damage and fatigue [26,27]) and haptoglobin (bioindicator of animal stress during transport and a marker of inflammation [28,29]).

3.3 Electrophoretic Pattern of Muscle Extracts

SDS-PAGE gels allowed separation and quantification of a total of 27 bands of protein (260 to 23 kDa) (Fig. 1). Table 3 shows protein identification.

Table 1. Effect of mixing treatments on meat quality traits

	UF-UTL	MF-UTL	MF-MTL	SEM	P
pH45	6.63±0.10 a	6.41±0.16 b	6.33±0.12 b	0.058	.009
pH24	5.48±0.03	5.53±0.07	5.49±0.09	0.031	.490
EC24 (mS)	4.25±0.29	4.53±0.83	5.23±1.22	0.389	.226
Drip loss (%)	1.26±0.60	2.92±3.35	4.56±2.70	1.122	.157
L* (lightness)	48.38±1.24	49.78±1.98	49.74±2.08	0.807	.407

*Results are shown as means ±SD (standard deviation); Means in the same row followed by different letters are significantly different at $P < .05$; SEM: Standard error of means; EC: Electrical conductivity

Table 2. Effect of mixing treatments on serum and muscle biochemical parameters

	UF-UTL	MF-UTL	MF-MTL	SEM	P
Glucose (mg/dL)	121.84±23.77	129.76±31.73	139.70±40.21	14.579	.694
Cholesterol (mg/dL)	100.68±8.69	91.78±8.43	92.90±17.08	5.406	.470
HDL-cholesterol (mM)	1.106±0.11	0.998±0.16	1.006±0.18	0.068	.483
LDL-cholesterol (mM)	1.568±0.12	1.468±0.11	1.450±0.29	0.086	.596
Triglycerides (mg/dL)	63.40±8.29	55.40±9.29	70.0±29.05	8.161	.471
Lactate (mmol/L)	8.694±3.17	8.394±4.05	8.806±5.03	1.858	.987
Total protein (g/dL)	7.164±0.31	7.210±0.34	7.170±0.23	0.131	.964
Haptoglobin (mg/mL)	0.096±0.03	0.126±0.06	0.210±0.24	0.066	.470
Creatine Kinase (U/L)	1140.46±277.07	1444.28±682.39	1564.98±767.80	274.706	.547
NEFAs (mmol/L)	0.558±0.10	0.496±0.14	0.592±0.21	0.070	.625
Hydroxybutyrate (mmol/L)	0.085±0.02	0.085±0.02	0.097±0.03	0.011	.683
Glutathione peroxidase (U/L)	6115.0±543.21	5649.6±138.39	5670.4±730.74	237.795	.329
TAA 0h (mg Trolox/mg prot)	19.550±3.19 a	11.619±2.36 b	12.395±2.73 b	1.243	.001

*Results are shown as means ± SD (standard deviation); Means in the same row followed by different letters are significantly different at $P < .05$; SEM: Standard error of means; HDL: High density lipoprotein, LDL: Low density lipoprotein, NEFAs: Non-esterified fatty acids; TAA: Total antioxidant activity

Table 3. Protein identification of individual bands of sarcoplasmic extracts separated by SDS-PAGE

Band (MWe ^a)	Identification	Accession no. ^b	MOWSE ^c scores	Seq. Cov. ^d (%)	Matched Queries	MWt ^e
B1 (316.5)	Filamin-C isoform 2 [Sus scrofa]	gi 311275459	876	26	50	289.6
B2 (244.0)	Myosin-2 [Sus scrofa]	gi 55741490	899	20	33	223.9
B3 (184.5)	Glycogen debranching enzyme [Bos Taurus]	gi 300794727	600	23	33	176.2
B4 (162.2)	Myosin-binding protein C, fast-type [Sus scrofa]	gi 335290041	628	35	32	128.4
B5 (113.1)	SERCA 1: Sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPase 1 [Sus scrofa]	gi 324120946	831	33	30	110.4
B6 (95.1)	Glycogen phosphorylase, muscle form isoform 1 [Sus scrofa]	gi 335281566	1140	57	44	97.7
B7 (82.5)	Muscle 6-phosphofructokinase [Sus scrofa]	gi 95117652	666	48	26	82.4
B8 (76.5)	Transferrin [Sus scrofa]	gi 833800	464	16	18	78.9
B9 (72.3)	Heat shock 70kDa protein 8 "HSP70-8" [Sus scrofa]	gi 345441750	683	45	22	71.0
B10 (68.7)	Heat shock 70kDa protein 1B "HSP70-1B" [Sus scrofa]	gi 47523308	344	36	15	70.3
B11 (64.4)	Albumin [Sus scrofa]	gi 833798	1020	53	27	71.4
B12 (60.2)	Phosphoglucomutase-1 [Sus scrofa]	gi 350538593	751	41	19	62.0
B13 (56.4)	Pyruvate kinase isozymes M1/M2 "PK" [Sus scrofa]	gi 335292434	826	50	28	68.5
B14 (51.6)	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial [Sus scrofa]	gi 297591975	467	37	15	55.3
B15 (48.8)	ATP synthase H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex beta subunit "ATP5B"[Sus scrofa]	gi 89574051	297	54	14	47.1
B16 (44.8)	β -enolase [Sus scrofa]	gi 113205498	757	70	23	47.4
B17 (40.3)	Creatine kinase M-Type [Sus scrofa]	gi 194018722	851	65	23	43.3
B18 (37.2)	Fructose-bisphosphate aldolase A [Bos taurus]	gi 156120479	556	53	15	39.9
B19 (34.4)	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating) "GAPDH" (EC1.2.1.12)-pig	gi 65987	736	53	13	35.9
B20 (32.8)	L-lactate dehydrogenase A chain "LDH-A" [Sus scrofa]	gi 288860136	637	70	17	36.8
B21 (31.2)	Malate dehydrogenase precursor (EC 1.1.1.37), partial [Sus scrofa]	gi 164541	207	12	12	32.2
B22 (29.7)	four and a half LIM domain 1 protein, isoform C [Sus scrofa]	gi 47523806	566	67	19	35.6
B23 (27.4)	Carbonic anhydrase 3 [Sus scrofa]	gi 56711366	277	60	14	29.7
B24 (26.4)	Carbonic anhydrase 3 [Sus scrofa]	gi 56711366	655	57	20	29.7
B25 (25.4)	Triosephosphate isomerase 1 [Sus scrofa]	gi 262263205	872	77	17	26.9
B26 (24.0)	Myosin light chain MLC1f [Sus scrofa]	gi 117660874	556	57	18	21.0
B27(22.5)	Adenylate kinase isoenzyme 1 "AK-1" [Sus scrofa]	gi 350579688	623	69	19	23.6

^a MWe is the experimental molecular weight (kDa); ^b Accession number correspond to NCBI nr database; ^c The MOWSE score is a numeric descriptor of the likelihood that the identification is correct. Protein scores greater than 69 are significant (P<0.05); ^d Percentage of coverage of the entire amino acid sequence; ^e MWt is the theoretical molecular weight (kDa)

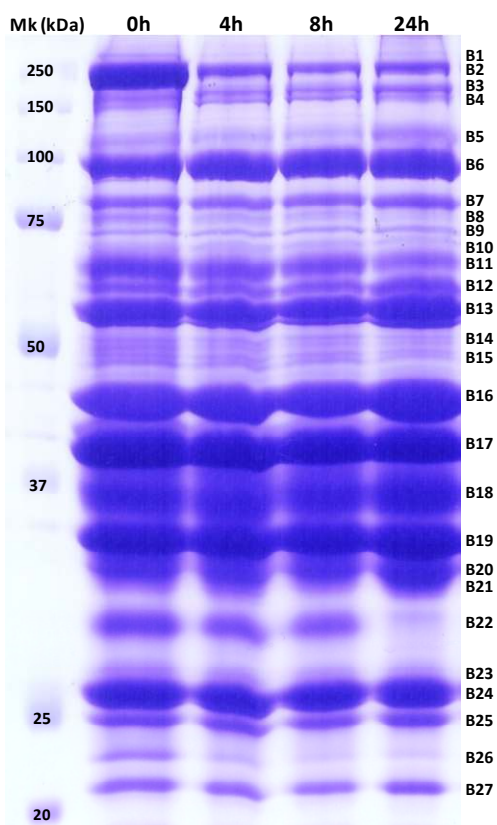


Fig. 1. SDS-PAGE gel image of a sarcoplasmic extracts of the muscle tissue at different post-mortem times (0 h, 4 h, 8 h, 24 h)

*Mk, pre-stained molecular weight marker (Bio-Rad).
Band names are denoted by B (band) followed by a number*

It is worth noting that several protein bands (B1, B2, B8, B11, B17, B22, B23, B24, B26) showed decreasing pattern during meat aging in all treatments. Most of them have structural and maintenance functions in the muscle tissue, so its disappearance during the first 24 h post-mortem seems to be related to the cellular dismantlement and proteolysis. These were B1 (filamin-C isoform 2, $P= .028$), the myosin fragments B2 (Myosin-2, $P< .001$) and B26 (Myosin light chain "MLC1f", $P= .032$), B8 (transferrin, $P= .027$), B11 (albumin, $P< .001$) and B22 (four and a half LIM domains protein 1 isoform C "FHL1C", $P< .001$). Four and a half LIM domains protein 1 isoform C "FHL1C", also known as cypher protein, is confined to the Z-line of skeletal muscle and its proteolysis has been correlated with the release of intact alpha-actinin from bovine myofibrils and would contribute to the weakening of the Z-line during meat aging [12].

Within the group of proteins with decreasing post-mortem pattern we also found a metabolic protein, B17 (Creatine kinase "CK", $P< .001$), related to the glycolysing metabolism. This is in accordance with previous reports describing a faster reduction of CK in fast glycolysing pork meat [30,31].

In contrast, some protein bands showed increasing pattern with aging, like B5 (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 1 "SERCA 1", $P= .020$), linked to the translocation of calcium from the cytosol to the sarcoplasmic reticulum lumen, and others related to the glycolysis pathway and the muscle-to-meat transition metabolism, like B6 (glycogen phosphorylase, $P< .001$), B7 (muscle 6-phosphofructokinase, $P= .043$), B12 (phosphoglucomutase-1 "PGM-1", $P= .010$), B13 (Pyruvate Kinase "PK", $P< .001$), B16 (β -enolase, $P< .001$), B18 (fructose-bisphosphate aldolase A, $P< .001$) and B20 (L-lactate dehydrogenase chain A "LDH-A", $P< .001$), some of which have been identified as relevant in comparative proteomic studies between extreme groups of tenderness in beef [32]. Furthermore, most of them have been related to different situations of muscle degradation or meat conditioning, like β -enolase [8,33] or PK [11,34].

However, the effect of mixing treatment was significant on few protein bands, namely B10 (Heat Shock 70kDa protein 1B, "HSP70-1B", $P= .040$), B19 (GAPDH, $P= .047$), B20 (LDH-A, $P< .001$) and B27 (Adenylate kinase isoenzyme 1 "AK-1", $P< .001$). It is known that HSP70-1A/1B functions in the anti-apoptotic pathway and the inhibition of ROS formation [35] and it brings chaperone activity with HSP40 to ensure a good functioning of the muscle under oxidative stress conditions [36]. In this trial, HSP70 showed higher values in the muscle of animals mixed at farm (MF-UTL), with significant differences at 4 h post-mortem ($P= .010$). In contrast, LDH-A showed lower values in meat from animals mixed at farm (MF-UTL), being significantly different at 0 h ($P= .007$) and 24 h ($P= .036$) post-mortem. In a similar way, GAPDH, enzyme implicated in glycolysis, showed lower values in meat from animals managed under mixing treatments, both MF-UTL and MF-MTL.

With respect to AK-1 (B27), which catalyzes the reversible transfer of the terminal phosphate group between ATP and AMP, significantly higher values were found in meat from the group of unmixed animals (UF-UTL) at 4 h ($P< .001$) post-mortem. In skeletal muscle, AK1 plays an

important role in the maintenance of the cellular energy homeostasis, therefore its higher level in meat from unmixed animals seems to indicate that animal mixing treatments (MF-UTL and MF-MTL) produced early post-mortem muscle cell dismantlement and hence earlier AK-1 exhaustion.

3.4 Relationship between Meat Quality Traits and Biochemical/ Electrophoretical Variables

Table 4 shows the best prediction model and sampling time obtained for every meat quality trait (dependent variable), and the significant biomarkers included. In the global data, pH45 was accurately explained ($R^2=0.961$, $RPD=2.25$) from the serum levels of LDL-cholesterol and triglycerides (both related to the metabolism of fats), and the muscle abundance at 4 h post-mortem of some peptides playing important roles in the adenine nucleotide metabolism (AK-1) and glycolysis regulation (PK and GAPDH). This agrees with previous reports that describe high influence of physiological stress on the lipid metabolism and/or the glycolytic potential of the muscle [37,38]. In our study, all significant variables included in the prediction model for pH45 contributed positively, except PK that showed negative relationship, which indicates higher enzyme levels in meat with lower pH at 45

minutes post-mortem, (i.e, meat showing higher or faster post-mortem glycolysing metabolism) which agrees with findings of Sierra et al. [11] in beef.

Meat exudation (EC24), was accurately predicted ($R^2=0.994$, $RPD=3.26$) at shorter post-mortem time (0 h) from the presence in the muscle extracts of some peptides involved in muscular contraction and/or the ATP synthesis/hydrolysis (myosin-2, SERCA 1, ATP-synthase- α mitochondrial) combined with results of fat metabolites in serum (NEFAs, hydroxybutyrate and triglycerides), thus showing a significant relationship between meat exudation (higher EC) and changes influenced by the dismantlement of the muscle structure and the metabolic homeostasis, as well as fat metabolism.

Other main meat quality traits, such as meat lightness (L^*) and drip loss were also significantly ($P < .001$) predicted by different peptides detected in the muscle at 4 h (drip) or 24 h (L^*) post-mortem (Table 4), but showed lower variance explanation ($R^2 < 0.85$) and the level of accuracy did not reach the value needed for analytical purposes, as RPD value was lower than 2. Thus, these regression models were rejected from further use for testing meat classification.

Table 4. Multiple linear regression models for the prediction of main meat quality traits (pH45, CE24, L^* , drip-loss) based on biomarkers (biochemical and electrophoretical variables) detected in the muscle sarcoplasmic extracts

Dependent variable	Predictors included in the model (positive "+" or negative "-" contribution)	Post-mortem time point	R^2 (sign.)	RPD	RMSEP
pH45	AK-1(+) LDL-cholesterol (+) PK (-) GAPDH (+) Triglycerides (+)	4h	0.961 ^(***)	2.25	0.077
EC24	NEFAs (+) SERCA 1 (+) Myosin-2 (-) Hydroxybutyrate (+) ATP synthase subunit alpha, mitochondrial (+) Triglycerides (+) ATP5B (+)	0h	0.994 ^(***)	3.26	0.272
L^*	HSP70-8 (-) Haptoglobin (+) Carbonic anhydrase 3 (-)	24h	0.811 ^(***)	0.65	1.216
Drip loss	Glycogen debranching enzyme (-) AK-1 (-) PK (+)	4h	0.828 ^(***)	1.83	1.439

3.5 Testing the Use of Biomarkers for Identification of Meat Obtained under Animal Mixing Management

Fig. 2 shows the predicted value obtained for the dummy variable (no-mixing =1; mixing = 2) calculated for every meat sample (n=15) by discriminant analysis based on the selected biomarkers of meat quality (pH45 and EC24), and its acceptability range (± 0.5). The model predicting pH45 (Fig. 2a) could successfully discriminate 86.7% of the meat samples

according to the pre-slaughter animal treatment: "no-mixing" (predicted dummy variable within the acceptance range 1 ± 0.5 for 80% of meat samples) and "mixing" treatments "MF-UTL" and "MF-MTL" (predicted dummy variable within the range 2 ± 0.5 for 93.3% of samples), while biomarkers included in the prediction model for EC24 (Fig. 2b) failed to correctly classify meat samples, as all of them were grouped into the "mixing" treatment (predicted dummy variable included within the acceptance range 2 ± 0.5 for 100% of meat samples).

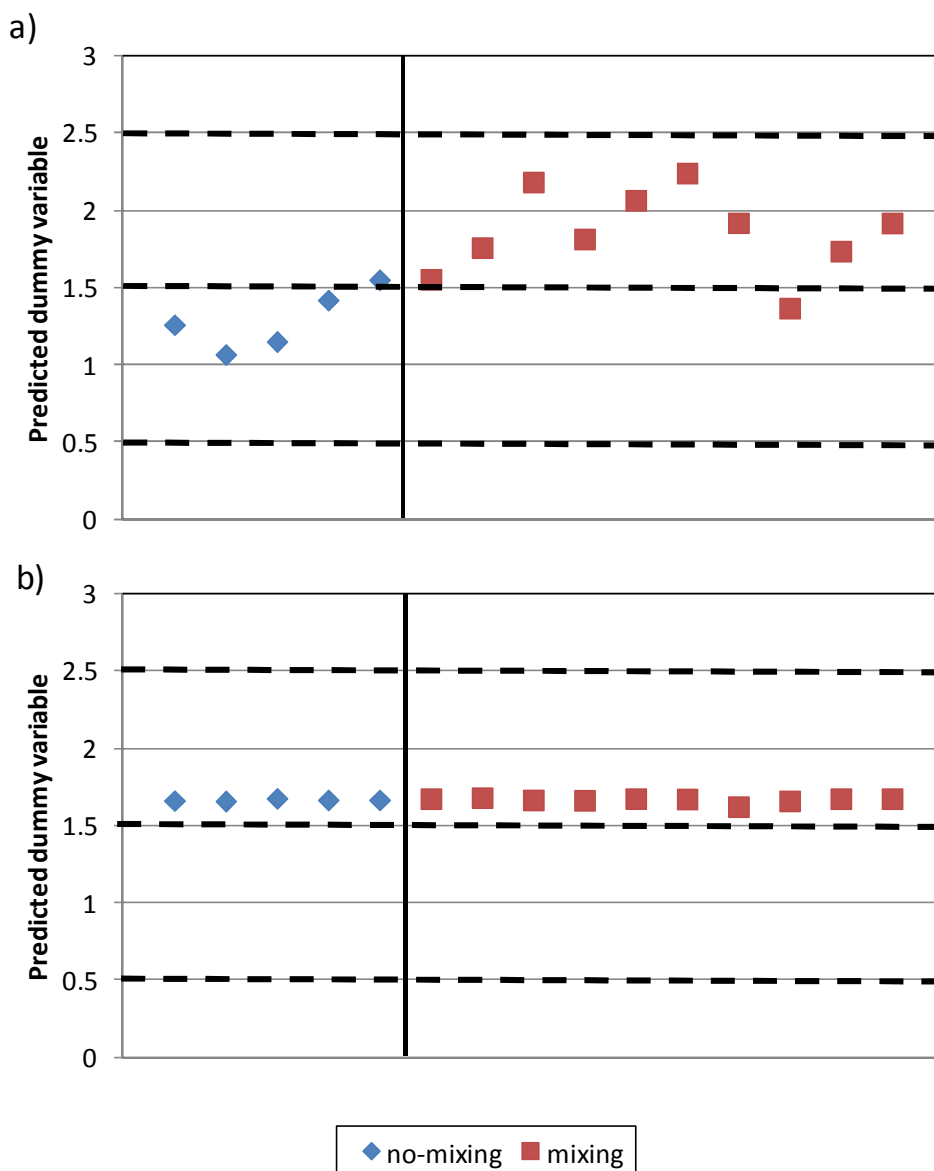


Fig. 2. Discriminant analysis of meat samples based on biomarkers included in the best predictive regression for: a) pH45, b) EC24

4. CONCLUSION

From these results we can suggest that some of the biochemical and proteomic variables measured at slaughter or within the first 24 h post-mortem could be used for the detection of situations of pre-slaughter stress related to animal mixing practices. In particular, the detection of higher levels of serum molecules related to the fat metabolism (LDL-cholesterol and triglycerides) together with changes in peptides playing a crucial role in the adenine nucleotide metabolism (AK-1) and the glycolysis regulation (PK and GAPDH) of the muscle, allowed a good identification of animals coming from pre-slaughter mixing treatments, at farm and/or during transport and lairage. However, it is worthwhile to mention that the obtained prediction model has been calculated in a small size population and more research is needed in order to validate these results on a broader animal population.

ETHICAL APPROVAL

This experiment complied with the appropriate laws and institutional guidelines for animal pre-slaughter management, as common routines allowed in animal production were applied.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by projects AGL2010-21578-C03, AGL2011-30598-C03, FISS-13-RD12/0043/0030, FISS-14-PI13/02741, RTA2007-00049-00-00 and FEDER funds. B.L-D thanks FICYT pre-doctoral fellowship.

COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

1. Velarde A, Dalmau A. Animal welfare assessment at slaughter in Europe: Moving from inputs to outputs. *Meat Sci.* 2012;92:244-51.
2. Arey DS, Franklin MF. Effects of straw and unfamiliarity on fighting between newly mixed growing pigs. *Appl Anim Behav Sci.* 1995;45:23-30.
3. Andersen IL, Andenaes H, Boe KE, Jensen P, Bakken M. The effects of weight asymmetry and resource distribution on aggression in groups of unacquainted pigs. *Appl Anim Behav Sci.* 2000;68:107-20.
4. Fàbrega E, Puigvert X, Soler J, Tibau J, Dalmau A. Effect of on farm mixing and slaughter strategy on behaviour, welfare and productivity in Duroc finished entire male pigs. *Appl Anim Behav Sci.* 2013; 143:31-9.
5. Hambrecht E, Eissen JJ, Newman DJ, Smits CHM, Verstegen MWA, den Hartog LA. Preslaughter handling effects on pork quality and glycolytic potential in two muscles differing in fiber type composition. *J Anim Sci.* 2005;93:900-7.
6. Bertram HC, Oksbjerg N, Young JF. NMR-based metabolomics reveals relationship between pre-slaughter exercise stress, the plasma metabolite profile at time of slaughter, and water-holding capacity in pigs. *Meat Sci.* 2010;84:108-13.
7. Gajana CS, Nkukwana TT, Marume U, Muchenje V. Effects of transportation time, distance, stocking density, temperature and lairage time on incidences of pale soft exudative (PSE) and the physico-chemical characteristics of pork. *Meat Sci.* 2013;95: 520-5.
8. Lametsch R, Karlsson A, Rosenvold K, Andersen HJ, Roepstorff P, Bendixen E. Postmortem proteome changes of porcine muscle related to tenderness. *J Agric Food Chem.* 2003;51:6992-6997.
9. Jia X, Veiseth-Kent E, Grove H, Kuziora P, Aass L, Hildrum KI, et al. Peroxiredoxin-6-A potential protein marker for meat tenderness in bovine longissimus thoracis muscle. *J Anim Sci.* 2009;87:2391-9.
10. Di Luca A, Mullen AM, Elia G, Davey G, Hamill RM. Centrifugal drip is an accessible source for protein indicators of pork ageing and water-holding capacity. *Meat Sci.* 2001;88:261-70.
11. Sierra V, Fernández-Suárez V, Castro P, Osoro K, Vega-Naredo I, García-Macia M, et al. Identification of biomarkers of meat tenderisation and its use for early classification of Asturian beef into fast and late tenderizing meat. *J Sci Food Agric.* 2012;92:2727-40.
12. Morzel M, Chambon C, Hamelin M, Santé-Lhoutellier V, Sayd T, Monin G. Proteome changes during pork meat ageing following use of two different pre-slaughter handling procedures. *Meat Sci.* 2004;67:689-96.
13. Kim NK, Park HR, Lee HC, Yoon D, Son ES, Kim YS, et al. Comparative studies of skeletal muscle proteome and

- transcriptome profilings between pig breeds. *Mamm Genome*. 2010;21:307–19.
14. Rubio-González A, Potes Y, Illán-Rodríguez D, Vega-Naredo I, Sierra V, Caballero B, et al. Effect of animal mixing as a stressor on biomarkers of autophagy and oxidative stress during pig muscle maturation. *Animal*. 2015;9:1188-94.
 15. Rasmussen AJ, Andersson M. New method for determination of drip loss in pork muscles. In *Proceedings of the 42nd International Congress of Meat Science and Technology*; Lillehammer, Norway. 1996;286–287.
 16. De Gonzalo-Calvo D, Neitzert K, Fernández M, Vega-Naredo I, Caballero B, García-Macia M, et al. Differential inflammatory responses in aging and disease: TNF-alpha and IL-6 as possible biomarkers. *Free Radical Biol Med*. 2010; 49:733-7.
 17. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72:248-54.
 18. Havlis J, Thomas H, Sebela M, Shevchenko A. Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins. *Anal Chem*. 2003;75:1300-6.
 19. Jami MS, Barreiro C, García-Estrada C, Martín JF. Proteome analysis of the penicillin producer *Penicillium chrysogenum*: Characterization of protein changes during the industrial strain improvement. *Mol Cell Proteomics*. 2010; 9:1182-98.
 20. Støier S, Aaslyng MD, Olsen EV, Henckel P. The effect of stress during lairage and stunning on muscle metabolism and drip loss in Danish pork. *Meat Sci*. 2001;59: 127-31.
 21. Rosenvold K, Andersen HJ. The significance of pre-slaughter stress and diet on colour and colour stability of pork. *Meat Sci*. 2003;63:199-209.
 22. Terlouw EMC, Porcher J, Fernandez X. Repeated handling of pigs during rearing. II. Effect of reactivity to humans on aggression during mixing and on meat quality. *J Anim Sci*. 2005;83:1664–72.
 23. Warriss PD, Brown SN. The physiological responses to fighting in pigs and the consequences for meat quality. *J Sci Food Agric*. 1985;36:87–92.
 24. Nanni Costa L, Lo Fiego DP, Dall'Olio S, Davoli R, Russo V. Combined effects of pre-slaughter treatments and lairage time on carcass and meat quality in pigs of different halothane genotype. *Meat Sci*. 2002;61:41-7.
 25. Becker BA, Mayes HF, Hahn GL, Nienaber JA, Jesse GW, Anderson ME, et al. Effect of fasting and transportation on various physiological parameters and meat quality of slaughter hogs. *J Anim Sci*. 1989;67: 334-41.
 26. Miranda-de la Lama GC, Rivero L, Chacón G, Garcia-Belenguer S, Villarroel M, Maria GA. Effect of the pre-slaughter logistic chain on some indicators of welfare in lambs. *Livest Sci*. 2010;128:52-9.
 27. Knowles TG, Warriss PD. Stress physiology of animals during transport. In: *Livestock Handling and Transport*, 2nd ed. Grandin T, editor. Wallingford: CAB International; 2000.
 28. Saco Y, Docampo MJ, Fàbrega E, Manteca X, Diestre A, Lampreave F, et al. Effect of stress transport on serum haptoglobin and Pig-MAP in pigs. *Anim Welfare*. 2003;12:403-9.
 29. Salamano G, Mellia E, Candiani D, Ingravalle F, Bruno R, Ru G, et al. Changes in haptoglobin, C-reactive protein and pig-MAP during a housing period following long distance transport in swine. *Vet J*. 2008;177:110-5.
 30. Joo ST, Kauffman RG, Kim BC, Park GB. The relationship of sarcoplasmic and myofibrillar protein solubility to colour and water-holding capacity in porcine longissimus muscle. *Meat Sci*. 1999;52: 291-7.
 31. Ryu YC, Choi YM, Kim BC. Variations in metabolite contents and protein denaturation of the longissimus dorsi muscle in various porcine quality classifications and metabolic rates. *Meat Sci*. 2005;71:522-9.
 32. Picard B, Gagaoua M, Micol D, Cassar-Malek I, Hocquette JF, Terlouw CEM. Inverse relationships between biomarkers and beef tenderness according to contractile and metabolic properties of the muscle. *J Agric Food Chem*. 2014;62: 9808–18.
 33. Chosa E, Sekimoto T, Sonoda N, Yamamoto K, Matsuda H, Takahama K, et al. Evaluation of human beta-enolase as a serum marker for exercise-induced muscle damage. *Clin J Sport Med*. 2003;13:209-12.

34. Lametsch R, Roepstorff P, Bendixen E. Identification of protein degradation during post-mortem storage of pig meat. *J Agric Food Chem.* 2002;50:5508-12.
35. Laufen T, Mayer MP, Beisel C, Klostermeier D, Mogk A, Reinstein J, et al. Mechanism of regulation of Hsp70 chaperones by Dna J cochaperones. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:5452-7.
36. Guillemin N, Juire C, Cassar-Malek I, Hocquette JF, Renand G, Picard B. Variations in the abundance of 24 protein biomarkers of beef tenderness according to muscle and animal type. *Animal.* 2011;5:885-94.
37. Hambrecht E, Eissen JJ, Newman DJ, Smits CHM, Verstegen MWA, den Hartog LA. Preslaughter handling effects on pork quality and glycolytic potential in two muscles differing in fiber type composition. *J Anim Sci.* 2005;83:900-7.
38. White HM, Richert BT, Latour MA. Impacts of nutrition and environmental stressors on lipid metabolism. In: *Lipid Metabolism.* Valenzuela R, editor. InTech (Open access); 2013.

© 2016 Oliván et al.; This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Peer-review history:

*The peer review history for this paper can be accessed here:
<http://sciencedomain.org/review-history/12376>*