

EFECTO DEL ESTRÉS PRE-SACRIFICIO SOBRE EL DESARROLLO DE CARNES DFD EN LA RAZA RETINTA

Fuente-García^{1,2}, C., Serrano-Hernández¹, L., Sentandreu¹, E., Aldai², N., Romero³, P., Cabeza de Vaca³, M., Tejerina³, D. y Sentandreu¹, M.A.

¹ Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), 46980 Paterna (Valencia).

² Grupo de Investigación Lactiker, Departamento de Farmacia y Ciencias de los Alimentos, UPV/EHU, 01006 Vitoria-Gasteiz.

³ Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX), 06187 Guadajira (Badajoz)
ciesen@iata.csic.es

INTRODUCCIÓN

Desde hace décadas, el estudio y control de los distintos factores que afectan a la calidad final de la carne de vacuno ha sido uno de los principales retos de la industria. La gran variabilidad individual, unida a los diferentes sistemas de manejo hace que actualmente haya una falta de homogeneidad en la calidad final del producto que llega al consumidor. Uno de los principales factores que influyen en esa calidad final puede deberse a diferencias en la susceptibilidad individual de los animales al estrés. El estrés pre-sacrificio puede ser intrínseco al animal, pero son los factores asociados al manejo los que desempeñan un papel fundamental. Antes del sacrificio, los animales sometidos a estrés agotan sus reservas de glucógeno y, como consecuencia, la acidificación *post-mortem* del músculo es limitada, ya que no hay glucógeno disponible para transformarse en ácido láctico, siendo los valores de pH *post-mortem* superiores a 6.0 (McVeigh et al., 1982). Esto favorece la aparición de carnes DFD (*dry, firm, dark*) que se caracterizan por ser oscuras y secas, con alta capacidad de retención de agua y baja estabilidad microbiológica. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es estudiar diferentes parámetros relacionados con el estrés pre-sacrificio y determinar su efecto en la aparición de carnes DFD en la raza Retinta.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon terneros añojos machos de aptitud cárnica de 14-15 meses de edad de la raza Retinta (n=20) bajo un sistema de producción de cebo intensivo. Durante la fase de transporte y espera en matadero, nueve animales (n=9) se transportaron respetando los lotes y la jerarquía establecida en granja (no mezcla - NM), y los restantes (n=11) se mezclaron con animales de lotes distintos (mezcla - M). Del total de muestras, 13 fueron clasificadas como carnes "normales", con un pH inferior a 5.9 (6 NM y 7 M), y las otras 7 fueron consideradas carnes "DFD" con valores de pH iguales o superiores a 5.9 (3 NM y 4 M). Los valores de pH se tomaron a las 24 h *post-mortem* a nivel de la 6ª costilla del músculo *Longissimus thoracis et lumborum* (LTL). Para la medida de los parámetros séricos, se recogieron muestras de sangre de cada animal en el momento de la exsanguinación y se extrajo el plasma mediante centrifugación a 2000g durante 15 min. El sobrenadante se congeló a -80 °C en tubos Eppendorf. El cortisol sérico se determinó por la técnica ELISA (NovaTec Immunodiagnóstica GmbH, Dietzenbach, Alemania). El análisis de los biomarcadores del metabolismo energético se llevó a cabo por la determinación de la glucosa (kit enzimático Biosystem®) y el lactato (Edwards et al., 2010). Para la determinación de la actividad de las caspasas 3 y 7, se extrajeron muestras de LTL de la media canal izquierda a nivel de la 13ª costilla a las 2 h *post-mortem*. Las muestras se transportaron al laboratorio (refrigeración) y a las 24 h *post-mortem* se congelaron a -80 °C (nitrógeno líquido). Para extraer la fracción sarcoplásmica, cada muestra se homogeneizó en 2 mL de tampón de extracción (10mM HEPES, pH 7.5, 0,1 % Brij 35, 10 % sacarosa, 1mM EDTA) y se centrifugó a 20,000g durante 20 min (4 °C). El sobrenadante se filtró con filtros PVDF de 0.45 µm y se almacenó a -80 °C. La actividad caspasa se determinó incubando el extracto sarcoplásmico con el sustrato fluorogénico Ac-DEVD-AMC específico de las caspasas 3/7 durante 30 min a 37 °C. Los resultados obtenidos se analizaron mediante análisis univariante y multivariante. El test de Welch se empleó como variante del T-test para estudiar las diferencias entre carnes normales y DFD ($P \leq 0.05$) en las distintas variables de estudio utilizando el programa SPSS 24.0 (IBM, New York, NY, EEUU).

Para el análisis multivariante se llevó a cabo el análisis de componentes principales utilizando el programa XLSTAT 2010.5.02 (Addinsoft, Paris, Francia).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con respecto al efecto M/NM durante el transporte y la espera en el matadero, no se observaron diferencias significativas en ninguna de las variables estudiadas. Sin embargo, sí que se observaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en los parámetros séricos y actividad caspasa entre muestras normales y DFD (**Tabla 1**). El pH_{24} , parámetro más utilizado por la industria cárnica para la detección de carnes DFD, fue un factor claramente discriminante entre carnes normales y DFD ($P \leq 0.001$) aunque no siempre es suficiente para detectar este defecto. La activación del eje HPA (hipotálamo-Pituitaria-Adrenal) como respuesta al estrés conlleva la producción de glucocorticoides (cortisol) para mantener la homeostásis (Cafe et al., 2011). Asimismo, el estrés también provoca un aumento en la síntesis de catecolaminas. La liberación de estas hormonas puede generar cambios importantes en el metabolismo energético mediante la activación de la glucogenólisis debido a la mayor demanda de glucosa por parte del músculo y el cerebro (Tarrant, 1990). En este estudio, los niveles de cortisol y lactato fueron más altos en las muestras DFD, mientras que la concentración de glucosa fue más baja. Un mayor nivel de estrés implicaría, al igual que pasa con el glucógeno, una bajada de los niveles de glucosa, y por tanto, un aumento de la concentración de lactato.

Tabla 1. Efecto del tipo de carne (normal, DFD) sobre los parámetros séricos y actividad caspasa 3/7 (t_{10} , t_{20} , t_{30}).

		Cortisol (ng mL ⁻¹)	Glucosa (g L ⁻¹)	Lactato (g L ⁻¹)	Actividad Caspasa 3/7 (unidades fluorescencia)		
					t_{10}	t_{20}	t_{30}
Normal (n=13)	Media	168	1,00	0,986	1,45	2,97	4,42
	EEM	36,7	0,120	0,0897	0,134	0,260	0,369
DFD (n=7)	Media	436	0,240	1,32	2,58	5,26	7,81
	EEM	86,0	0,0271	0,118	0,071	0,128	0,228
<i>P</i> -valor		**	***	*	***	***	***

La actividad caspasa está expresada $\times 10^4$ unidades de fluorescencia; t_{10} , t_{20} y t_{30} , medida actividad caspasa a los 10, 20 y 30 min de incubación; EEM, error estándar de la media; *, $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,01$; ***, $P \leq 0,001$

La apoptosis o muerte celular programada es un mecanismo que consiste en eliminar las células dañadas y potencialmente peligrosas de los organismos vivos sin dañar las células adyacentes. Es un proceso rápido que se lleva a cabo por la acción proteolítica de las caspasas. La actividad de las caspasas 3/7 fue significativamente mayor ($P \leq 0.001$) en el grupo DFD para los tres tiempos de estudio (**Tabla 1**). El estrés induce la síntesis de proteínas protectoras llamadas *proteínas de choque térmico* cuya función es proteger al resto de proteínas de la posible desnaturalización o pérdida de función (Kültz, 2003). Estas proteínas pueden interactuar con las caspasas en los procesos de apoptosis, pero todavía existe cierta controversia con respecto al papel pro- o anti-apoptótico que ejercen.

En la **Figura 2A**, el primer componente (PC1) explicó el 73,8 % de la variabilidad total encontrada entre los diferentes individuos, mientras que PC2 explicó el 13,2 %. A pesar de la gran variabilidad individual, se observó que las muestras identificadas como DFD se separaron de las muestras normales en el primer componente, presentando puntuaciones factoriales positivas con respecto a las muestras normales. Sin embargo, dos muestras clasificadas como normales por su valor de pH_{24} también presentaron puntuaciones factoriales positivas. Esto se explicaría por el hecho de que en estas muestras los índices de cortisol, glucosa y lactato siguieron la misma tendencia que en las muestras DFD. En la **Figura 2B** se observa una alta correlación de todas las variables con el PC1, excepto para el lactato, que se correlacionó con el PC2. Las muestras clasificadas como DFD se relacionaron positivamente con el cortisol y la actividad caspasa, y negativamente con la glucosa, siendo la actividad caspasa la variable que más peso tuvo sobre la separación entre muestras

normales y DFD, ya que presentó una carga factorial (en el PC1) de 0,95. La conclusión a estos resultados es que para evaluar correctamente la influencia del estrés pre-sacrificio sobre la aparición de carnes DFD habría que considerar diversos parámetros además de la medida del pH₂₄.

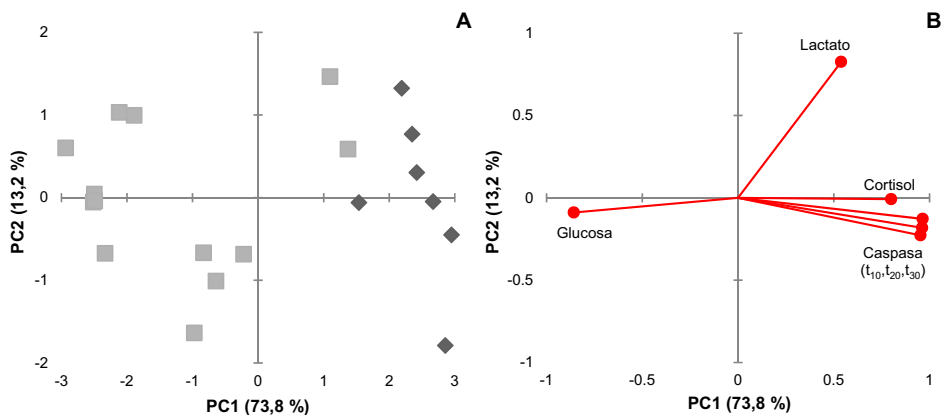


Figura 2. Distribución de los individuos (A) y las variables de estudio (B) en el sistema de coordenadas de dos dimensiones definido por los componentes principales (PC) 1 y 2. Cada punto representa una muestra animal (■: Normal; ◆: DFD) y las variables de estudio (●).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- McVeigh, J., Tarrant, P. & Harrington, M. 1982. *J. Anim Sci.* 54: 790-795.
- Edwards, L.N., Engle, T.E., Correa, J.A., Paradis, M.A., Grandin, T. & Anderson, D.B. 2010. *Meat Sci.* 85: 435-440.
- Cafe, L.M., Robinson, D.L., Ferguson, D.M., Greesink, G.H. & Greenwood. 2011. *Domest Anim Endocrin.* 40: 230-240.
- Tarrant, P.V. 1990. *Appl Anim Behav Sci.* 28: 153-170
- Kültz, D. 2003. *J. Exp Biol.* 206: 3119-3124.

Agradecimientos: Al Departamento de desarrollo Económico y Competitividad del Gobierno Vasco por la beca de C. Fuente-García. Este trabajo ha sido financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (subproyectos RTA2014-00034-C04-03 y RTA2014-00034-C04-04) y los fondos FEDER.

EFFECT OF PRE-SLAUGHTER STRESS ON DFD MEAT DEVELOPMENT

ABSTRACT: Animal handling might induce stress at slaughter, giving rise to changes on the ultimate meat quality. In this study, a total of 20 yearling bulls from Retinta beef breed were reared under intensive system. Prior to slaughter, 11 animals were mixed with unfamiliar individuals during transport and lairage while the other 9 were kept together (non-mixed). Moreover, muscle samples were classified as normal or DFD meat using pH measurements at 24h *post-mortem*. Blood samples were collected from each animal during exsanguination to determine plasma cortisol, glucose and lactate levels. Activity of caspases 3/7 from sarcoplasmic extract was measured at 24 h *post-mortem* using a specific fluorogenic substrate. Mixed and non-mixed handling practices did not show significant differences, but statistical differences were found between normal and DFD groups for all studied parameters. Animals with high pH (DFD group) showed higher plasma cortisol and lactate levels and caspase activity compared with animals with low pH (normal group), while the concentration of glucose was significantly lower in DFD group. These results suggest that, apart from pH₂₄ values, plasma cortisol, glucose and lactate levels, together with caspase activity, may be useful to accurately identify DFD meats in beef cattle.

Keywords: pre-slaughter stress, DFD, caspase, blood parameters.