

Identificación en la carne de biomarcadores de estrés animal

MAMEN OLIVÁN. Área de Sistemas de Producción Animal. mcolivan@serida.org

FERNANDO DÍAZ-MARTÍNEZ. Área de Sistemas de Producción Animal. ferdm89@gmail.com

YAIZA POTES-OCHOA. Departamento de Morfología y Biología Celular. Universidad de Oviedo. yaizapotesocha@gmail.com

ADRIÁN RUBIO-GONZÁLEZ. Departamento de Morfología y Biología Celular. Universidad de Oviedo. adrianrubiogonzalez@gmail.com

ANA COTO-MONTES. Departamento de Morfología y Biología Celular. Universidad de Oviedo. acoto@uniovi.es



Introducción

Los ciudadanos de los países desarrollados muestran una preocupación creciente por la necesidad de proteger el bienestar de los animales. En el caso de la producción animal, esta preocupación llega incluso a la cadena alimentaria, de modo que hay un número elevado de consumidores que demandan más información para poder tener en cuenta cuestiones relativas al bienestar animal en el momento de decidir sus compras.

Sin embargo, existe una limitación importante para la definición de criterios y medidas de control del estrés, que proviene del hecho de que medir el grado de bienestar o estrés animal es más complicado de lo que parece. Se han realizado grandes esfuerzos por incrementar los

conocimientos en este campo, especialmente en los animales de granja. 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.

Hay que tener en cuenta que diversos factores ligados a la producción, junto con el propio proceso de sacrificio en el matadero, son factores estresantes para el animal, ocasionando en mayor o menor medida un estrés psicológico, que afecta a los procesos fisiológicos y tam-

bién 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 por efecto del estrés, llamadas DFD (del inglés "dark, firm, dry", que en español significa "oscura, dura, seca"), lo cual supone pérdidas de hasta 20 millones de dólares en países como Australia y Gran Bretaña (Adzitey y Nurul, 2011).

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, que pueden tener efectos adversos sobre la calidad final del producto.

Cambios fisiológicos inducidos por el estrés

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 proceso de ruptura de la jerarquía social debido a la mezcla de animales, 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.

Se puede consultar una descripción detallada de las respuestas fisiológicas al estrés, en una revisión de este tema escrita por Romero et al. (2011). En resumen, se puede afirmar que el estrés altera la homeostasis interna de los animales induciendo cambios en la actividad del eje hipotálamo-pituitaria-adrenocortical (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.

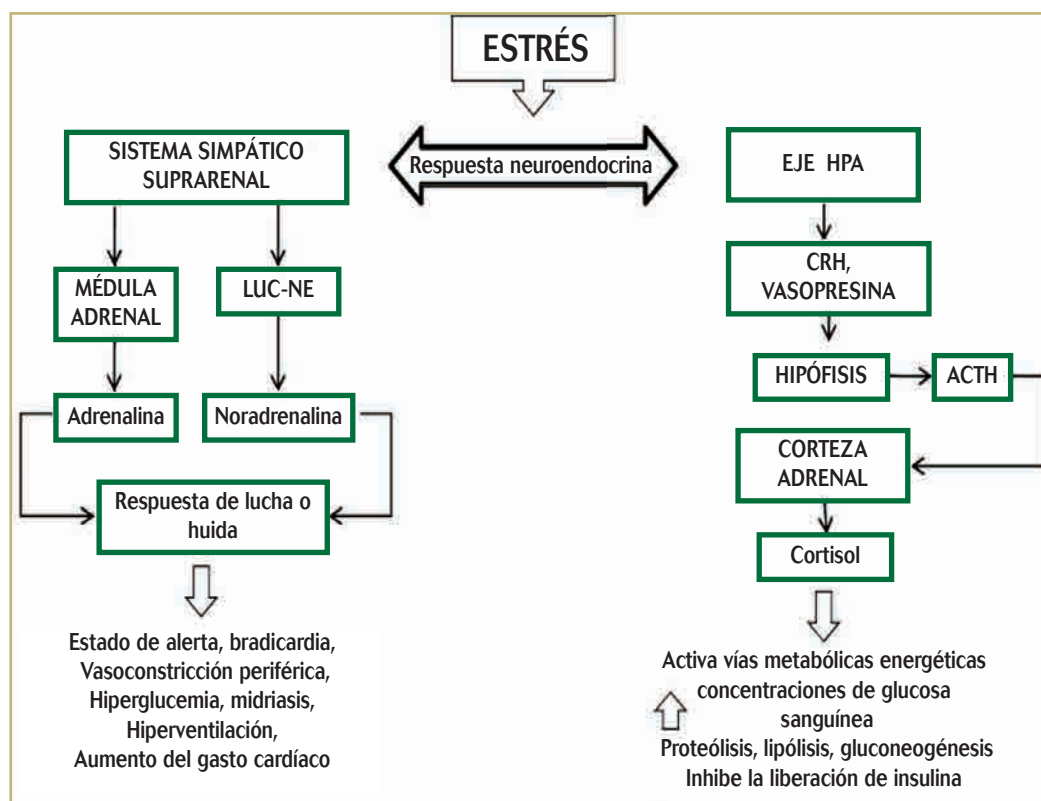


Figura 1.-Esquema general de la respuesta al estrés (Romero et al., 2011).

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 et al., 2009). También disminuye el transporte y utilización de glucosa por las células, incrementando la concentración de glucosa sanguínea (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 creatinfosfoquinasa (CK) o las concentraciones de beta-hidroxibutirato y lactato (Averós et al. 2008, Dokmanovic et al., 2014, Oliván et al., 2014).

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 (Marco-Ramell et al., 2011; Piñeiro et al., 2007; Saco et al., 2003).

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 et al., 2012). En general, el estrés ocasiona un incremento en la producción de radicales libres, lo cual provoca un desequilibrio entre las especies reactivas al oxígeno (reactive oxygen species, “ROS”) y la capacidad del sistema para detoxificar y reparar el daño resultante (Lardone et al., 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 (Burke et al., 2009; Pregel et al., 2005). Sin embargo, resulta difícil medir directamente las especies reactivas al oxígeno (ROS), 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 et al., 2012).

La determinación de estos biomarcadores en sangre o suero es un método práctico para monitorizar el grado de estrés o bienestar animal en vivo, pero su uso está ligado al ámbito experimental, y por el momento no tiene aplicación práctica en mataderos o salas de despiece, en los que no es operativo aplicar protocolos que precisen una analítica de la sangre.

Identificación de biomarcadores de estrés en la carne

En la carne, el efecto del estrés sufrido por el animal en los momentos previos al sacrificio se puede valorar utilizando las medidas tradicionales de calidad físico-química (pH, color, capacidad de retención de agua, textura), así como las características sensoriales. Sin embargo, estos parámetros van siendo evidentes a medida que avanza la maduración de la carne, siendo preciso detectar indicadores que puedan medirse en las primeras horas post-mortem y que permitan una detección temprana de situaciones de estrés.

Entre los posibles indicadores de estrés destacan las proteínas, que juegan un papel esencial en los cambios post-

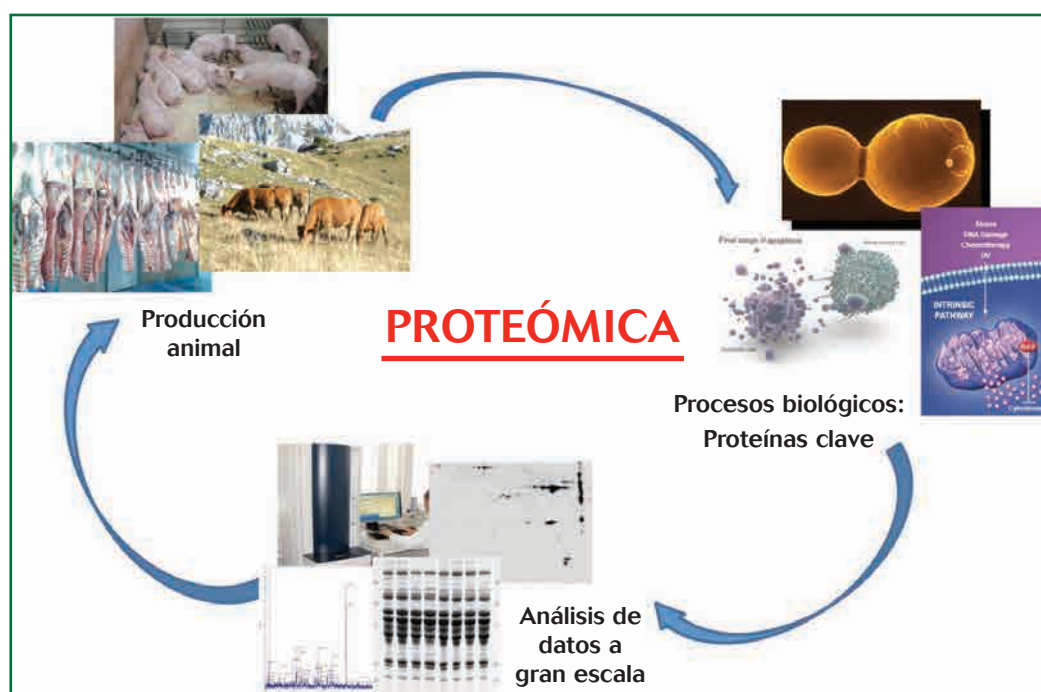


Figura 2.-Aplicación de la proteómica para estudiar biomarcadores de calidad en la carne.

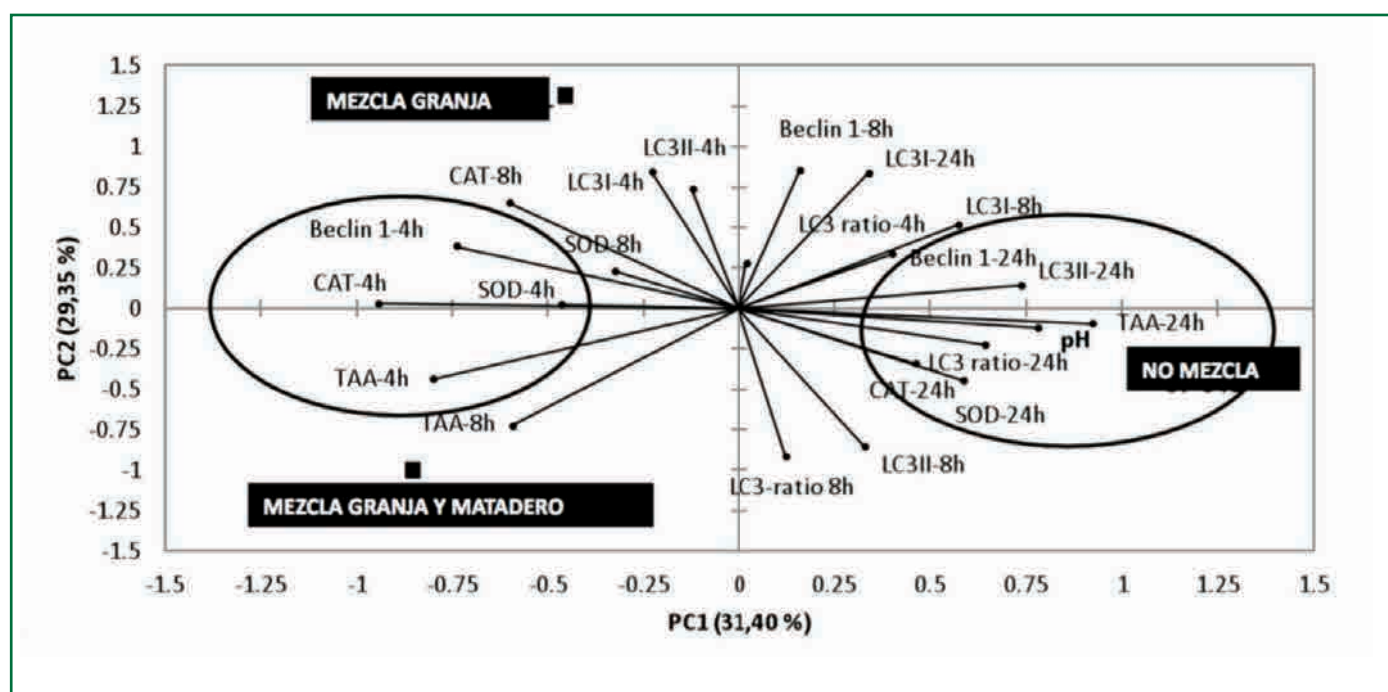
mortem del músculo, por su participación en los procesos glicolíticos, oxidativos y proteolíticos que determinan en gran medida la calidad final de la carne (Rowe et al., 2004; Sierra et al., 2012; Sierra y Oliván, 2013). Las proteínas participan en estas reacciones como enzimas, pero también como moléculas “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 et al., 2007).

Esta información se completa con el análisis del grado de estrés oxidativo que sufre el tejido muscular tras la muerte del animal, que tiene un efecto importante sobre la maduración de la carne. Los estudios realizados por nuestro grupo (SERIDA-Universidad de Oviedo) en el marco del proyecto AGL2011-30598-C03-03, financiado por el Plan Nacional de I+D en el que colaboramos con investigadores del IRTA (Gerona) y la Universidad Autó-

noma de Barcelona, han permitido demostrar que las estrategias de manejo que causan estrés psicológico en los cerdos (sistema de manejo en granja, condiciones de transporte, mezcla con animales extraños, sesgo cognitivo y/o tipo de interacción humano-animal) incrementan el estrés oxidativo y desencadenan procesos de autofagia en el tejido muscular. La información obtenida hasta la fecha parece indicar que una monitorización de la presencia y evolución de los principales marcadores de autofagia (Beclin 1, LC3-II/LC3-I ratio) y/o de la defensa antioxidante muscular (Actividad Antioxidante Total “AAT”, Actividad de las enzimas Superóxido Dismutasa “SOD” y Catalasa “CAT”) en la carne en tiempos tempranos post-mortem puede servir para detectar situaciones de estrés animal, así como para predecir la calidad final del producto.

La investigación continúa y por el momento podemos afirmar que:

- La aplicación de las técnicas “ómicas” de análisis masivo, como es la proteómica, va produciendo listas de biomarcadores que podrían servir como indicadores de estrés en la carne



↑

Figura 3.-Análisis multivariante que muestra relaciones entre los indicadores de estrés (Beclin1, Catalasa "CAT", Superóxido Dismutasa "SOD", Actividad antioxidante total "TAA") medidos en la carne recogida de la canal a distintos tiempos post-mortem (4 h, 8 h, 24 h) y el manejo de los animales previo al sacrificio (no mezcla con animales extraños, mezcla en granja, mezcla en granja y matadero). Rubio-González et al., 2015).

– La información disponible no permite definir un único indicador, sino que posiblemente habrá que buscar una combinación adecuada de biomarcadores que den una visión completa del estado metabólico del músculo.

– La biología de sistemas (ciencia emergente que estudia los sistemas biológicos complejos teniendo en cuenta información multivariada, incluyendo genes, proteínas y rutas metabólicas) permitirá analizar toda la información de forma integrada, con el fin de formular modelos matemáticos que describan la estructura del sistema y su respuesta a distintos tipos de perturbaciones.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Ministerio de Economía y Competitividad la financiación del proyecto AGL2011-30598-C03-03 titulado "Identificación de biomarcadores de calidad en la carne relacionados con el estrés celular ante- y peri-sacrificio", lo cual ha permitido obtener la información mostrada en este artículo. También agradecen al INIA la financiación del proyecto RTA2014-00034-C04-01 titulado "Identificación de biomarcadores de estrés en

distintas razas autóctonas de vacuno (IBER-VAC) asociados con la calidad de la carne", que comienza en septiembre de 2015 y tendrá una duración de tres años, en los que continuaremos la investigación sobre biomarcadores de estrés, en nuevos estudios aplicados en el ganado vacuno.

Referencias bibliográficas

- ADZITEY, F.; NURUL, H. (2011): Pale soft exudative (PSE) and dark firm dry (DFD) meats: causes and measures to reduce these incidences-a mini review. *International Food Research Journal* 18: 11-20.
- 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.
- 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: 365-370.
- DOKMANOVIC, M.; VELARDE, A.; TOMOVIC, V.; GLAMOCLJICA, N.; MARKOVIC, R.; JANJIC, J.; BALTIC, M.



- Z. (2014): The effects of lairage time and handling procedure prior to slaughter on stress and meat quality parameters in pigs. *Meat Science* 98: 220-226.
- 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.
- LARDONE, P. J.; ÁLVAREZ-GARCÍA, O.; 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: 153-157.
- 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.
- LI, Y.; ZHENG, Y.; QIAN, J.; CHEN, X.; SHEN, Z.; TAO, L.; LI, H.; QIN, H.; LI, M.; 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: 285-291.
- 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. *Vet J.* 190:66-71.
- MUCHENJE, V.; DZAMA, K.; CHIMONYO, M.; STRYDOM, P. E.; RAATS, J. G. (2009): *Veterinary Journal*. Relationship between pre-slaughter stress responsiveness and beef quality in three cattle breeds. *Meat Science* 81:653-657.
- 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.
- PIÑEIRO, M.; PIÑEIRO, C.; CARPINTERO, R.; MORALES, J.; CAMPBELL, F. M.; ECKERSALL, P. D.; TOUSSAINT, M. J.; LAMPREAVE, F. (2007): Characterisation of the pig acute phase protein response to road transport. *Vet. J.* 173: 669-674.
- PREGEL, P.; BOLLO, E.; CANNIZZO, F. T.; BIOLATTI, B.; CONTATO, E.; BIOLATTI, P. G. (2005): *Veterinary Journal*. Antioxidant capacity as a reliable marker of stress in dairy calves transported by road. *Vet. Rec.* 156: 53-54.
- ROMERO, M. H.; URIBE-VELÁSQUEZ, L. F.; SÁNCHEZ J. A. (2011): *Veterinary Record*. Biomarcadores de estrés como indicadores de bienestar animal en ganado de carne. *Biosalud* 10: 71-87.
- ROWE, L. J.; MADDOCK, K. R.; LONERGAN, S. M.; HUFF-LONERGAN, E. (2004): Influence of early postmortem protein oxidation on beef quality. *Journal of Animal Science* 82: 785-793.
- RUBIO-GONZÁLEZ, A.; POTES-OCHOA, Y.; ILLÁN-RODRÍGUEZ, D.; VEGA-NAREDO, I.; SIERRA, V.; CABALLERO, B.; FÁBREGA, E.; VELARDE, A.; DALMAU, A.; OLIVÁN, M.; COTO-MONTES, A. (2015): Effect of animal mixing as a stressor on biomarkers of autophagy and oxidative stress during pig muscle maturation. *Animal* 9: 1188-1194.
- SACO, Y.; DOCAMPO, M. J.; FÁBREGA, 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.
- 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.
- SIERRA, V.; FERNÁNDEZ-SUÁREZ, V.; CASTRO, P.; OSORO, K.; VEGA-NAREDO, I.; GARCÍA-MACIA, M.; RODRÍGUEZ-COLUNGA, M. J.; COTO-MONTES, A.; 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: 2727-2740.
- 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 (Suppl.1): 265-286.
- VEGA-NAREDO, I.; CABALLERO, B.; SIERRA, V.; GARCÍA-MACIA, M.; DE GONZALO-CALVO, D.; OLIVEIRA, P. J.; RODRÍGUEZ-COLUNGA, M. 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. *J Pineal Res.* 52: 80-92.
- VELARDE, A.; DALMAU, A. (2012): *Journal of Pineal Research*. Animal welfare assessment at slaughter in Europe: Moving from inputs to outputs. *Meat Science* 92: 244-251. ■

