

## Nuevos indicadores de carnes DFD: estrés oxidativo, autofagia y apoptosis

A. Díaz-Luis<sup>1</sup>, F. Díaz<sup>2</sup>, Y. Diñeiro<sup>2,3</sup>, L. González-Blanco<sup>1,3</sup>, E. Arias<sup>2</sup>,  
A. Coto-Montes<sup>1,3</sup>, M. Oliván<sup>2,3</sup> y V. Sierra<sup>2,3,\*</sup>

<sup>1</sup> Dpto. de Morfología y Biología Celular, Universidad de Oviedo, C/ Julián Clavería s/n, 33006 Oviedo, Asturias, España

<sup>2</sup> Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), Apdo 13, 33300 Villaviciosa, Asturias, España

<sup>3</sup> Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Avda. Roma s/n, 33011 Oviedo, Asturias, España

### Resumen

En el ganado vacuno, el estrés pre-sacrificio provoca la aparición de carnes conocidas como DFD (Dark, Firm, Dry), que se identifican por un descenso anómalo del pH muscular *post-mortem* y que muestran serios problemas de calidad, lo cual disminuye su valor comercial. El objetivo de este trabajo es conocer las diferencias en los procesos de estrés oxidativo, en los mecanismos de supervivencia/muerte celular (autofagia/apoptosis) y en biomarcadores proteómicos a las 24 h *post-mortem*, entre canales que mostraron un descenso normal de pH (pH = 5,4-5,8 a las 24 h *post-mortem*) utilizadas como CONTROL y canales con pH a las 24 h *post-mortem* (pH<sub>24</sub>) > 6,0 clasificadas como DFD, con el fin de identificar los procesos del metabolismo muscular ligados a la aparición de carnes DFD.

Se analizó el estrés oxidativo celular mediante el estudio de la actividad antioxidante total y los daños en macromoléculas (proteínas y lípidos). Las carnes DFD mostraron mayor actividad antioxidante ( $P < 0,05$ ) a las 24 h *post-mortem*, así como mayor daño de proteínas ( $P < 0,05$ ). También se analizaron biomarcadores de autofagia (Beclin-1 y LC3-II/LC3-I) y apoptosis (caspasa-3), así como los cambios producidos en el proteoma muscular. Los resultados demuestran la coexistencia de autofagia y apoptosis en el tejido muscular a las 24 h *post-mortem*, con diferencias de expresión significativas ( $P < 0,05$ ) que permiten discriminar carnes DFD frente a carnes sin alteraciones de calidad (CONTROL).

**Palabras clave:** Calidad de carne, muerte celular, biomarcadores proteómicos, daño macromoléculas, balance oxidativo, pH<sub>24</sub>.

### Novel indicators of DFD beef: oxidative stress, autophagy and apoptosis

#### Abstract

In cattle, pre-slaughter stress causes the appearance of DFD (Dark, Firm, Dry) beef, with defective *post-mortem* muscle pH decline and detrimental quality that reduce its commercial value. This paper aims to study differences in oxidative stress, cell survival or death mechanisms (autophagy/apoptosis) and pro-

---

\* Autor para correspondencia: veroniss@serida.org

teomic biomarkers at 24 h *post-mortem* between beef carcasses with normal pH decline ( $\text{pH} = 5.4\text{-}5.8$  at 24 h *post-mortem*) used as CONTROL and carcasses with pH at 24 h hours *post-mortem* ( $\text{pH}_{24}$ )  $> 6.0$  classified as DFD, in order to understand the relevant changes on the early *post-mortem* muscle metabolism related to the DFD occurrence.

Cell oxidative stress was analyzed as total antioxidant activity and damage of macromolecules (proteins and lipids). The results showed that DFD meat had increased muscle antioxidant activity ( $P < 0.05$ ) as well as increased protein damage ( $P < 0.05$ ). In addition, biomarkers of autophagy (Beclin-1 and LC3-II/LC3-I) and apoptosis (caspase-3), and changes of the muscle proteome were analyzed. The results showed the coexistence of autophagy and apoptosis in the muscle tissue at 24 h *post-mortem*, but with differential expression ( $P < 0.05$ ), which allows to discriminate between DFD and CONTROL beef.

**Keywords:** Meat quality, cell death, proteomic biomarkers, macromolecules damage, oxidative balance,  $\text{pH}_{24}$ .

## Introducción

La obtención de carne de calidad requiere la aplicación de condiciones de cría y manejo pre- y peri-mortem adecuadas, para evitar situaciones de estrés animal que pueden influir en el metabolismo *post-mortem* muscular, afectando de forma negativa a la calidad de la carne (Apple et al., 2005; Terlouw et al., 2008). Estos defectos de calidad producen importantes pérdidas económicas en el sector, porque afectan en mayor grado a las partes más valiosas de la canal (Xing et al., 2018). En nuestro país, por ejemplo, se ha descrito una incidencia de un 13,9% de carne de vacuno con pH a las 24 h *post-mortem* ( $\text{pH}_{24}$ ) superior a 5,8 viéndose penalizado el precio de la canal entre un 30% y un 60% (Mach et al., 2008).

En la carne de vacuno, se consideran normales valores de  $\text{pH}_{24}$  de entre 5,4 y 5,6 (Pearson y Young, 1989; Warriss, 2000). Sin embargo, el estrés animal puede producir defectos de calidad relacionados con una menor acidificación *post-mortem* del músculo, de modo que el  $\text{pH}_{24}$  se mantiene en valores superiores a 6, produciendo carnes oscuras y de textura defectuosa, conocidas como carnes DFD (del inglés Dark, Firm, Dry), que son rechazadas por el consumidor (Viljoen et al., 2002; Wulf et al., 2002; Mach et al., 2008; Ponnampalam et al., 2017). Generalmente, el fenómeno DFD se asocia con un agotamiento tem-

prano de las reservas de glucógeno muscular (Muchenje et al., 2009) como consecuencia de un incremento de adrenalina *in vivo* en respuesta a situaciones de estrés y/o por una actividad muscular excesiva en momentos previos al sacrificio. Como consecuencia de este agotamiento, la glicolisis anaerobia *post-mortem* se ve alterada y se produce un descenso anormal del pH.

En estas condiciones de  $\text{pH}_{24} > 6$ , las proteínas musculares estarán por encima de su punto isoeléctrico y retendrán fuertemente el agua aumentando el volumen de las fibras musculares. Este aumento se produce a nivel del entramado miofibrilar, reduciéndose el espacio extracelular, por lo que se produce un mayor empaquetamiento de los haces de fibras. Todo esto afectará a la capacidad de retención de agua, que se incrementa, y también se producirán alteraciones en el color y la textura (Apple et al., 2005; Zhang et al., 2005). Así, la reducción del espacio extracelular junto con el mayor empaquetamiento de las fibras producirá una reducción en el índice de refracción de las miofibrillas y el sarcoplasma, además, este mayor empaquetamiento dificultará la oxidación de la mioglobina por lo que estos músculos serán más oscuros (Mounier et al., 2006).

Otro defecto importante en las carnes DFD se produce a nivel de los procesos de ablanda-

miento y maduración (Silva et al., 1999), generando carnes con textura anómala. Se ha comprobado que la degradación miofibrilar se ve afectada por el pH final, de modo que a pH intermedios ( $5,7 < \text{pH}_{24} < 6,3$ ) las proteínas de choque térmico (HSPs) pueden proteger a las proteínas miofibrilares por lo que se producirá menor degradación proteolítica de estas, mientras que si el  $\text{pH}_{24}$  es menor de 5,7 o mayor de 6,3, es decir está más cercano al pH óptimo de los distintos sistemas proteolíticos celulares, se producirá mayor degradación enzimática de las proteínas miofibrilares y mayor desnaturalización proteica (Pulford et al., 2009). Por otro lado, también se producirá una importante reducción de la vida útil debido a que los microorganismos, en ausencia de glucosa, utilizarán los aminoácidos como fuente de energía por lo que aparecerán más rápidamente olores inadecuados y se producirá una degradación microbiana más rápida (Newton y Gill, 1981; Ponnampalam et al., 2017). Todo esto afectará negativamente a la palatabilidad y aceptabilidad, ya que estas carnes no solo tendrán defectos en color, sino que mostrarán un desarrollo más temprano de sabores y olores no deseados junto con una textura inadecuada (Viljoen et al., 2002; Wulf et al., 2002; Ponnampalam et al., 2017).

El metabolismo *post-mortem* muscular se ve afectado por el estrés oxidativo ocasionado a nivel celular tras la muerte del animal, debido al corte súbito del aporte de oxígeno y la inhibición de la respiración mitocondrial. Se ha demostrado que la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) se incrementa en los tejidos estresados, alterándose gradualmente el balance redox entre moléculas oxidantes y antioxidantes, lo que produce daño oxidativo (Li et al., 2011). Ante esta situación de estrés y daño oxidativo, las células que aún permanecen excitables en el *post-mortem* temprano desencadenarán distintos mecanismos que mediante el reciclado

y recambio de orgánulos dañados (autofagia), o mediante la eliminación selectiva de células dañadas sin dañar a las células circundantes (apoptosis), intentarán restaurar la homeostasis y supervivencia tisular (Ouali et al., 2006; Sierra y Oliván, 2013).

El papel que desempeñan estos mecanismos de supervivencia y/o muerte celular sobre el proceso de conversión del músculo en carne y su influencia en la calidad final ha sido objeto de estudio en las últimas décadas. Así, se sabe que la apoptosis induce la pérdida de la función mitocondrial, la reducción del volumen de las células musculares, la traslocación de los fosfolípidos de membrana, la rotura de las proteínas miofibrilares y el desmantelamiento de las estructuras celulares, lo que repercute en la terneza y calidad final de la carne (Ouali et al., 2006; Kemp y Parr 2012; Chen et al., 2015; Wang et al., 2018). Se ha demostrado también la ocurrencia de autofagia en el tejido muscular bovino en las primeras horas tras el sacrificio (García-Macía et al., 2014) y en el músculo de animales sometidos a diferentes situaciones de estrés (Rubio-González et al., 2015; Potes et al., 2017; Díaz et al., 2020).

Las variaciones de calidad de la carne que resultan de canales con  $\text{pH}_{24}$  elevado dependerán de los cambios específicos que se produzcan a nivel de la estructura y el metabolismo celular, en función de las rutas metabólicas que prevalezcan a nivel celular. En este sentido, los cambios en el perfil proteómico del tejido muscular pueden ser claves para entender estos procesos (Sierra et al., 2012; Picard et al., 2015; Schilling et al., 2017; Poletti et al., 2018).

En general, valores de  $\text{pH}_{24}$  por encima de 5,8 se relacionan con la aparición de carnes DFD, sin embargo, existe cierta controversia a este respecto en la bibliografía, ya que se ha visto que la relación entre el  $\text{pH}_{24} > 6$  y la aparición de defectos de calidad relacionados con el color o la capacidad de retención de agua no

siempre se mantiene (Ponnampalam et al., 2017). Así, Hughes et al. (2014) demostraron que en el *Longissimus dorsi* solamente el 28% de las carnes con valores de  $\text{pH}_{24} > 5,8$ , tenían características DFD para el color, aumentando al 74% en el caso de  $\text{pH}_{24} > 6$ . En este mismo sentido apunta el trabajo de García-Torres et al. (2019) en el que se demostró que el valor de  $\text{pH} > 6$  no es siempre un criterio suficientemente fiable para la clasificación de carne DFD de distintas razas de vacuno.

Por todo esto, en vista de que el descenso *post-mortem* del pH no parece ser el único indicador fiable de canales DFD, se propuso este trabajo cuyo objetivo fue estudiar las diferencias a nivel de biomarcadores proteómicos, de estrés oxidativo y de mecanismos de supervivencia y muerte celular (apoptosis, autofagia) entre carnes con valores normales de  $\text{pH}_{24}$  (entre 5,4 y 5,8) y carnes DFD ( $\text{pH}_{24} > 6$ ) con el fin de entender los cambios relevantes en el metabolismo *post-mortem* muscular que afectan al proceso de conversión de músculo en carne así como tratar de definir nuevos biomarcadores de los procesos relacionados con las carnes DFD.

## Material y métodos

### Recogida de muestras

Se monitorizaron, en un matadero comercial, un total de 100 canales de terneros añejos (13 a 18 meses) en las que se midió el pH a las 24 h *post-mortem* ( $\text{pH}_{24}$ ) en el músculo *Longissimus dorsi* (LD) a nivel de la 13ª costilla del lado izquierdo de la canal. Del total de canales medidas, 10 canales mostraron un  $\text{pH}_{24}$  elevado ( $\text{pH}_{24} > 6,0$ ), y fueron clasificadas como DFD. Por cada canal DFD encontrada, se seleccionó una canal de características similares, es decir del mismo lote de sacrificio, edad, grupo racial y origen, pero con un  $\text{pH}_{24}$  normal (5,4-5,8) que fueron clasificadas como

canales CONTROL. Debido a la elevada heterogeneidad racial del grupo de canales DFD encontradas, en el que había animales de las razas Parda, Limusina, Charolesa y del cruce comercial "Asturiana de los Valles x Frisona" y para tratar de minimizar la variabilidad debida al efecto de la raza, se seleccionaron para este estudio las muestras del grupo racial más numeroso ( $n = 8$ ), que fueron las canales del cruce "Asturiana de los Valles x Frisona" de las que se obtuvieron 4 canales DFD y 4 CONTROL.

A las 24 h *post-mortem* se extrajeron con un cuchillo 20 g del músculo *Longissimus dorsi* de cada canal, a nivel de la 13ª costilla en la zona anexa a donde se realizó la medida de pH. Cada una de estas muestras se troceó, en fragmentos de 1 g aproximadamente, que fueron introducidos en tubos falcon (10 g por tubo, 2 tubos por animal) y congelados inmediatamente en nitrógeno líquido, conservándose a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para el posterior análisis de biomarcadores proteómicos, estrés oxidativo y muerte celular.

### Obtención de extractos celulares: sarcoplásmico y miofibrilar

Para realizar las extracciones sarcoplásmicas y miofibrilares se procedió a la descongelación de un trozo de carne de aproximadamente 1 g del que se pesaron 0,5 g que fueron homogeneizados en 4 ml de tampón de extracción TES (Tris 10 mM pH 7,6, 1 mM de EDTA y 0,25 M de sacarosa) al que se añadió un cóctel de inhibidores de proteasas (P8340, Sigma-Aldrich Inc., San Luis, USA) al 0,6%. El tejido fue homogeneizado empleando un Polytron PT1200 E (Kinematica. Inc., Luzern, Suiza) 2 x 15 s a 20000 rpm. El homogeneizado se centrifugó durante 20 min a 13000 rpm y  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  tras lo cual, se recogió el sobrenadante, que contiene las proteínas sarcoplásmicas, que fue filtrado con un filtro de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (0,45  $\mu\text{m}$ ) y

alicuotado en tubos eppendorf (25 alícuotas de 120  $\mu$ l), que fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. El pellet resultante de la centrifugación, que contiene la fracción miofibrilar, fue sometido a una fase de lavado en 4 ml de tampón TES repitiendo el paso anterior de homogeneizado y centrifugado para remover todas las proteínas solubles en TES antes de proceder a la extracción miofibrilar. El pellet resultante fue homogeneizado en 4 mL de tampón Lisis (10 mM Tris-HCl pH = 7,6, 7 M Urea, 2 M Tiourea, 2% CHAPS, 10 mM DTT) con el Polytron 2 x 15 s a 20000 rpm. Posteriormente esta solución se agitó durante 1 h en un agitador Multi Reax (Heidolph Instruments, Schwabach, Alemania), se centrifugó a 13.000 rpm durante 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y se recogió el sobrenadante que contiene las proteínas miofibrilares, que se filtró con un filtro de nylon (5  $\mu$ m) y fue alicuotado en tubos eppendorf (25 alícuotas de 120  $\mu$ l) y almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. De cada muestra se realizaron tantas extracciones como fueron necesarias para disponer de suficiente cantidad para la realización de la batería completa de ensayos con sus respectivas réplicas. La concentración de proteína obtenida en los extractos miofibrilar y sarcoplásmico se analizó siguiendo el método de Bradford (Bradford, 1976) para cada muestra y extracción.

#### **Biomarcadores de estrés oxidativo**

El balance en el equilibrio oxidativo celular se analizó en el extracto sarcoplásmico mediante el cálculo de la Actividad Antioxidante Total (AAT) y los daños sobre macromoléculas, en concreto sobre lípidos y proteínas.

Para la valoración de la AAT se utilizó el método ABTS/ $\text{H}_2\text{O}_2$ /HRP de Arnao et al. (2001) modificado por de Gonzalo-Calvo et al. (2010). Los resultados se expresan como equivalentes de mg de Trolox/g de proteína.

Para estimar los daños de los lípidos, se midió la peroxidación lipídica (LPO), es decir, la producción de peróxidos de lípidos y sus derivados como malondialdehído (MDA) y 4-Hidroxiacetalquenal (4-HNE) según el método de Esterbauer et al. (1990).

La determinación del daño oxidativo de proteínas se llevó a cabo siguiendo el protocolo desarrollado por Levine et al. (1990) con las variaciones introducidas por Coto-Montes y Hardeland (1999).

#### **Análisis de marcadores moleculares de Autofagia y Apoptosis**

Para el estudio de estos procesos se analizó la expresión de algunos de sus marcadores en el extracto sarcoplásmico muscular mediante Western-Blot. Como marcadores de autofagia se utilizaron Beclin-1 y la proteína de cadena ligera asociada a microtúbulos LC3 y como marcador de apoptosis, la actividad de caspasa-3.

Se utilizaron 50  $\mu$ g de proteína por muestra que se sometieron a separación electroforética 1D-SDS-PAGE y posterior transferencia a membrana de PVDF (Immobilon TM-P; Millipore Corp., Bedford, MA, USA) según el procedimiento descrito por Díaz et al. (2020). Finalizada la transferencia, las membranas se bloquearon 1 h a temperatura ambiente con leche desnatada en polvo al 10% (170-6404, Bio-rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) disuelta en tampón TBS (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl). Posteriormente, las membranas se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios: anti-Beclin-1 dilución 1:1500 (3738; Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA), anti-LC3 dilución 1:1000 (PD014; Medical & Biological Laboratories Co. Ltd, Naka-ku Nagoya, Japón) y anti-Caspasa-3 dilución 1:500 (9661, de Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA) en tampón TBS y leche desnatada en polvo al 1% en

agitación y 4 °C toda la noche. Posteriormente se realizaron tres lavados (de 10 min para Beclin-1 y de 20 min para LC3 y caspasa-3) en TBS-T (50 mM Tris / HCl pH 7,5; 150 mM NaCl y 0,5% Tween-20) tras lo que se incubaron las membranas con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa de rábano (70745, Antirabbit IgG HRP linked AB, Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA), diluido en tampón TBS al 1% de leche desnatada en polvo (con diluciones 1:2500, 1:5000 y 1:1000 respectivamente), durante 1 h a temperatura ambiente y agitación, seguido de tres lavados de 10 min (Beclin-1) o 20 min (LC3 y caspasa-3) en TBS-T.

Las membranas fueron reveladas con el sustrato quimio-luminiscente de peroxidasa de rábano (WBKLS0500; Millipore Corp., Darmstadt, Alemania) y se analizaron los niveles de expresión de las proteínas mediante el software Image Studio Lite 3.1. Los resultados de densitometría se expresaron semi-cuantitativamente como unidades arbitrarias de densidad óptica de las bandas proteicas (por triplicado) normalizadas con una banda constante de la tinción con Ponceau como control de carga.

#### **Separación electroforética de los subproteomas sarcoplásmico y miofibrilar**

Los extractos sarcoplásmicos y miofibrilares del tejido muscular (15 g y 30 g de proteína por muestra, respectivamente) se desnaturalizaron con tampón de muestra (65,8 mM Tris/HCl pH 6,8, 2% SDS, 21% glicerol, 5% beta-mercaptoetanol y 0,026% azul de bromofenol) a 95 °C durante 5 min y se cargaron en geles verticales de 1 mm de grosor (Mini-protean, Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA). La composición del gel de resolución era 12% Acrilamida/Bisacrilamida (30%), 10% SDS, 15 M Tris/HCl pH 8,8; 10% Persulfato amónico y 0,1% TEMED, modificando en el gel de empaquetamiento al 4% la concentración de Acrilamida y a 0,5 M el tampón Tris/HCL pH

6,8. Los geles se corrieron en un Mini-PROTEAN® Tetra Cell de BioRad con tampón de corrida (25 mM Tris, 192 mM glicina y 0,1% SDS) y las muestras se separaron electroforéticamente durante aproximadamente 2 h a 150 V. En cada gel se cargó además un marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ All Blue Standards, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) para determinar los pesos moleculares de las bandas proteicas. Tras la separación electroforética, los geles se teñieron con una solución comercial (161-0803, QC Colloidal Coomassie Stain, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) y se destiñeron con agua destilada. Se hicieron triplicados de geles por muestra para su cuantificación mediante técnicas de análisis de imagen.

#### **Cuantificación e identificación del proteoma**

Los geles de electroforesis se escanearon, una vez teñidos, con un escáner comercial (ImageScanner UMAX, Amersham Biosciences Corp., Bath, Reino Unido). El análisis de densitometría y la cuantificación de las bandas se realizó mediante la herramienta de análisis de geles 1D del software ImageQuant TL, versión 7.0, (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). Para tener en cuenta las ligeras variaciones en la carga proteica, la densidad óptica de las bandas proteicas se expresó como abundancia relativa (volumen normalizado) expresada en unidades arbitrarias.

Las bandas de proteínas se cortaron manualmente y fueron digeridas y procesadas para un análisis posterior según lo indicado por Jami et al. (2010). Las muestras se analizaron con un espectrómetro (MALDI-TOF/TOF) de ionización por desorción láser asistida por matriz 4800 (ABSciex, MA, USA). Se usó el analizador proteómico 4700 (Cal Mix 5, ABSciex, MA, USA) 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 péptidos y los péptidos observados (hasta 65 péptidos por punto) se recogieron y se presentaron como una lista de pesos moleculares monoisotópicos con una relación señal a ruido (S/N) mayor que 20, utilizando el software 4000 Series Explorer versión 3.5.3 (ABSciex, MA, USA). 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  $\pm 7$  Da. La calibración predeterminada se optimizó para los espectros MS/MS.

Para la identificación de proteínas, se crearon archivos genéricos Mascot que combinan espectros MS y MS/MS y se consultó una base de datos de proteínas no redundantes utilizando una licencia local de Mascot versión 2.2 de Matrix Science a través de Global Protein Server versión 3.6 (AB Sciex). 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-prot 20180429; ii) taxonomía: todas las entradas (152462470 secuencias, 55858910152 residuos); iii) se consideraron modificaciones fijas y variables (cisteína como derivado de azufre carbamidometilo y metionina 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 se consideraron válidas cuando la puntuación global Mascot fue superior a 94, con un nivel de significación de  $P < 0,05$ .

### **Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS vs 22 (IBM Corp, Armonk, Nueva York, USA). Se revisaron los datos para la detección y eliminación de errores tipográficos, además se realizó un análisis exploratorio de la distribución de cada variable analizada mediante diagramas de caja (boxplot) eliminando los datos extremos y atípicos. La normalidad de las variables se comprobó mediante el test de Kolmogórov-Smirnov y posteriormente se analizó la existencia de diferencias significativas entre los dos grupos de muestras (CONTROL vs DFD) mediante test T para muestras independientes (para las variables normales) o mediante el test de Mann-Whitney (en el caso de las variables no normales), fijando 0,05 como nivel de significación aceptado.

## **Resultados y discusión**

### **pH**

En este estudio, las canales CONTROL mostraron valores de  $\text{pH}_{24}$  normales ( $5,64 \pm 0,04$ ) y significativamente ( $P < 0,001$ ) menores que las muestras DFD, cuyos valores de  $\text{pH}_{24}$  medios fueron de  $6,51 \pm 0,21$  (Tabla 1).

### **Estrés oxidativo**

La AAT, que proporciona información sobre la cantidad de sustancias antioxidantes que hay disueltas en los extractos celulares y es considerada como un indicador útil de la capacidad del sistema para impedir el daño causado por las EROs, mostró valores significativamente más elevados ( $P < 0,001$ ) en las muestras DFD que en las CONTROL (Tabla 1). Estos resultados coinciden con trabajos previos en

Tabla 1. Valores de pH y estrés oxidativo (media  $\pm$  desviación estándar) a las 24 horas *post-mortem* en carne de pH normal (CONTROL) y carne DFD.

Table 1. Values of pH and oxidative stress (mean  $\pm$  standard deviation) at 24 hours *post-mortem* in meat of normal pH (CONTROL) and DFD meat.

| Variable                         | Control          | DFD              | Valor de P |
|----------------------------------|------------------|------------------|------------|
| pH                               | 5,64 $\pm$ 0,04  | 6,51 $\pm$ 0,21  | 0,000      |
| AAT (mg Trolox/mg prot)          | 6,89 $\pm$ 2,04  | 13,97 $\pm$ 1,88 | 0,000      |
| DP (nm prot carbonilada/mg prot) | 1,04 $\pm$ 0,19  | 1,88 $\pm$ 0,58  | 0,033      |
| LPO (nm MDA+4HNE/g prot)         | 3,93 $\pm$ 0,851 | 4,83 $\pm$ 1,099 | 0,704      |

AAT: Actividad antioxidante total; DP: Daño de Proteínas; LPO: Lipoperoxidación; MDA: Malonaldehído; HNE: Hidroxinonenal.

los que se encontraron incrementos en la defensa antioxidante, medida como AAT, del tejido muscular de cerdos como respuesta el estrés previo al sacrificio ocasionado por mezcla con animales extraños (Rubio-González *et al.*, 2015) o por mayor susceptibilidad individual al estrés (Potes *et al.*, 2017).

En ocasiones los sistemas antioxidantes no pueden contrarrestar el incremento masivo de EROs y el exceso de radicales libres puede generar importantes daños a nivel de macromoléculas celulares como proteínas y lípidos (Bekhit *et al.*, 2013). En este trabajo se observaron daños de proteínas significativamente mayores ( $P < 0,05$ ) en el tejido muscular *post-mortem* en las muestras DFD que en las CONTROL (Tabla 1) lo que indica un nivel más elevado de estrés oxidativo. También los valores de LPO fueron ligeramente superiores en las muestras DFD que en las CONTROL (Tabla 1), si bien esta diferencia no resultó significativa.

### Apoptosis y Autofagia

Estudios recientes han señalado el papel relevante que ciertos procesos de supervivencia y/o muerte celular que se desencadenan en el tejido muscular tras el sacrificio del animal

pueden tener sobre el proceso de conversión del músculo en carne, en respuesta a la situación de estrés oxidativo del tejido tras la muerte del animal (Sierra y Oliván, 2013). Entre ellos, el proceso más estudiado hasta la fecha ha sido la apoptosis o muerte celular programada tipo I (PCD I), cuya relación con la calidad de la carne fue propuesta por primera vez por el grupo de Ouali (Ouali *et al.*, 2006; Herrera-Mendez *et al.*, 2006).

Por otro lado, la autofagia es una respuesta celular al estrés oxidativo, que permite el recambio de orgánulos dañados en un intento de mantener la viabilidad celular. Sin embargo, cuando la autofagia no consigue revertir los daños o se convierte en un proceso masivo, puede disparar mecanismos de muerte celular programada dando lugar a la destrucción total de las células vía apoptosis (PCD I) o mediante la muerte celular autofágica (PCD II). Ambos procesos (autofagia y apoptosis) se han descrito en el tejido muscular *post-mortem* en situaciones de estrés animal (Zhang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2018; Díaz *et al.*, 2020), aunque hasta la fecha no se había estudiado en detalle su relación con la aparición de carnes DFD.

La Figura 1 muestra los resultados obtenidos para la expresión de los distintos biomarcadores celulares de estos procesos: Beclin-1 y

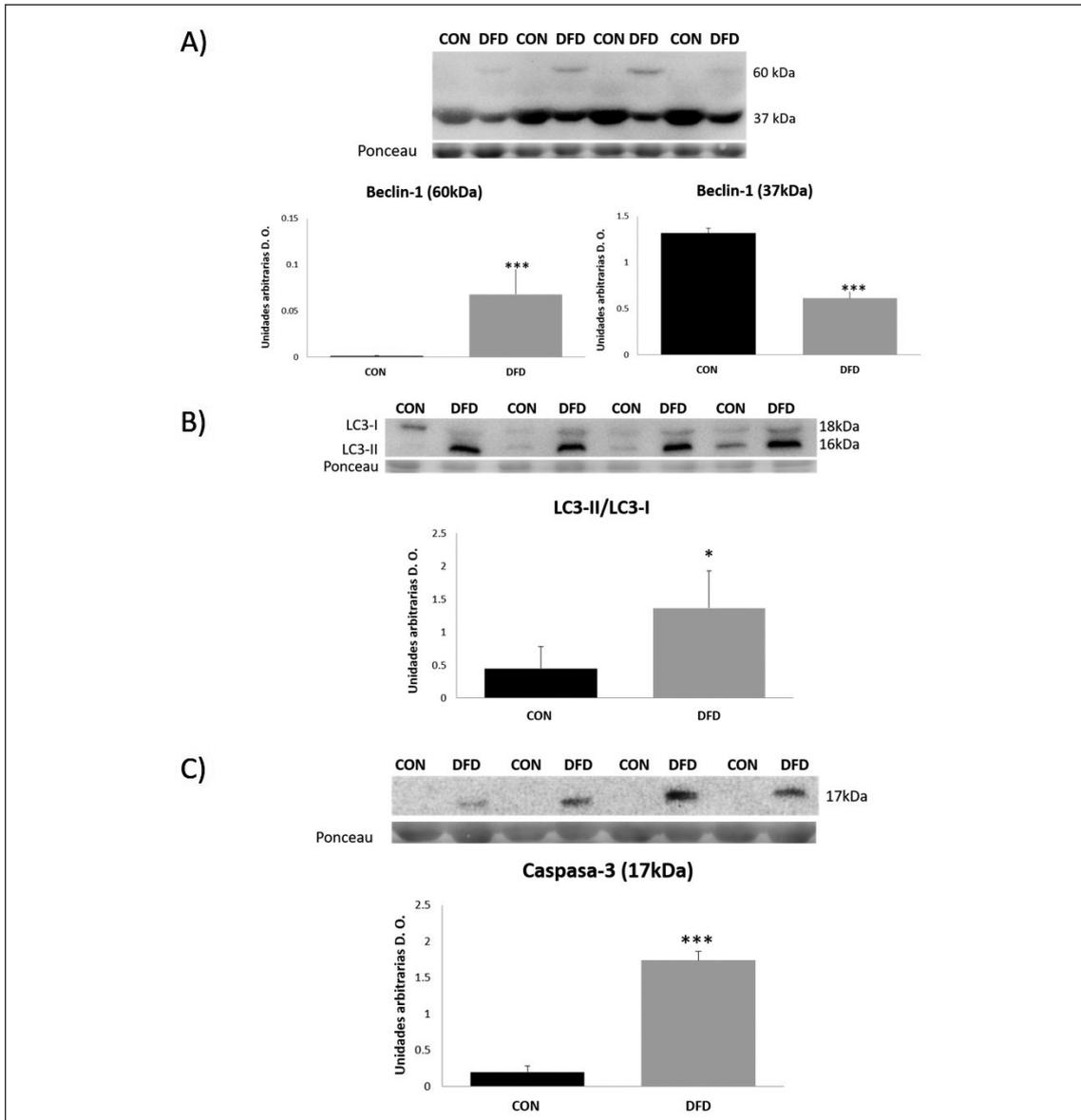


Figura 1. Análisis de biomarcadores de autofagia y apoptosis: imagen representativa de Western-blot y diagramas de barras de la semi-cuantificación (media ± desviación estándar) expresada como unidades arbitrarias de densidad óptica (D.O.) y normalizada frente al Ponceau. A) Beclin-1; B) LC3-II/ LC3-I y C) Caspasa-3.

CON: muestras control; DFD: muestras con  $pH_{24} > 6$ ; \*  $P < 0,05$ ; \*\*\*:  $P < 0,001$ .

Figure 1. Analysis of biomarkers of autophagy and apoptosis: representative Western-blot and bar charts of semi-quantitative optical density (O.D.) in arbitrary units (mean ± standard deviation) and Ponceau normalized. A) Beclin-1; B) LC3-II/LC3-I and C) Caspase-3.

CON: control samples; DFD: samples with  $pH_{24} > 6$ ; \*  $P < 0.05$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

LC3 para autofagia y caspasa-3 para apoptosis. En el caso de Beclin-1 se encontraron dos bandas, una de 60 kDa correspondiente a la proteína nativa y otra de 37 kDa correspondiente a un fragmento de degradación, observándose una expresión significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) de la banda nativa de 60 kDa en las carnes DFD, mientras que la expresión de la banda de 37 kDa fue significativamente menor ( $P < 0,001$ ) en las muestras DFD respecto a las muestras CONTROL (Figura 1A).

Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación en canales de vacuno de pH<sub>24</sub> normal de las razas Asturiana de los Valles y Asturiana de la Montaña, mostraron un descenso paulatino desde las 2 hasta las 24 horas *post-mortem* de la expresión de Beclin-1 (60 kDa) acorde con la disminución de ATP en la célula (García-Macía et al., 2014; Díaz et al., 2020). Esto, junto con los resultados aquí expuestos, parece indicar que la autofagia ocurre tanto en el músculo de canales DFD como en las canales CONTROL, aunque evoluciona a distinta velocidad, de modo que las muestras DFD presentan a las 24 horas *post-mortem* una respuesta autofágica de mayor intensidad o más prolongada en el tiempo (mayor expresión de Beclin-1 de 60 kDa a las 24 horas después del sacrificio) que el músculo de las canales CONTROL. Por el contrario, en las muestras CONTROL el proceso autofágico ha sido menos intenso o se ha interrumpido más rápidamente, con apenas expresión del fragmento de 60 kDa y una expresión significativamente mayor del fragmento de degradación de 37 kDa a las 24 horas *post-mortem*.

Otro método de análisis de la autofagia es el estudio de la proteína de cadena ligera-3 asociada a microtúbulos (LC3). La conversión de LC3-I (forma soluble de 18kDa) a LC3-II (forma conjugada con fosfolípidos y unida a membrana de 16 kDa) se correlaciona con la formación de autofagosomas completos y autolisosomas, por lo que el análisis del flujo autofágico (relación LC3II/LC3I) es un bio-

marcador de actividad autofágica en las células (Kabeya et al., 2000). Los resultados de este estudio mostraron mayor nivel de expresión del flujo autofágico LC3-II/LC3-I a las 24 horas *post-mortem* en las carnes DFD que en las CONTROL ( $P < 0,05$ , Figura 1B), lo que concuerda con los resultados obtenidos para Beclin-1 (60 kDa).

Para completar el estudio, se analizó la ocurrencia de apoptosis mediante la determinación de la expresión de la Caspasa 3. Este enzima pertenece a una familia de cisteín-proteasas mediadoras esenciales en los procesos apoptóticos, que ha sido propuesto como el primer sistema proteolítico que participa en la proteólisis y el ablandamiento de la carne durante la maduración *post-mortem* (Sentandreu et al., 2002). Los resultados obtenidos mostraron mayor expresión ( $P < 0,001$ ) de la forma activa de caspasa 3 (17 kDa) en las carnes DFD, que en las CONTROL, en las que apenas se detecta expresión a las 24 h *post-mortem* (Figura 1C), lo que podría indicar que la apoptosis ha ocurrido de forma más temprana en los individuos CONTROL. Estudios previos en *Longissimus dorsi* en cerdo demostraron que en las carnes con pH<sub>24</sub> > 6 se producía una expresión significativamente mayor de la proteína de choque térmico de 90 kDa (HSP90), siendo ésta una proteína que ejerce un papel anti-apoptótico, inhibiendo la inversión de fosfolípidos de membrana asociada a la ocurrencia de apoptosis, y por tanto retardando el proceso de apoptosis y el descenso de pH (Zhang et al., 2014).

Además estos resultados concuerdan con los cambios observados en Beclin-1, ya que se ha descrito que durante la apoptosis las caspasas pueden inhibir la autofagia fragmentando Beclin-1 y dando lugar a un fragmento de 37 kDa (Wirawan et al., 2010), que es el fragmento que presentó mayor expresión en las carnes CONTROL a las 24 h *post-mortem*, indicando la ocurrencia de ambos procesos (autofagia y apoptosis) a tiempos *post-mortem* más tempranos en la carne de pH<sub>24</sub> normal.

Estos resultados nos permiten afirmar que los procesos de autofagia y apoptosis coexisten en el tejido muscular *post-mortem*, independientemente de la evolución del descenso de pH, aunque con diferencias significativas, en cuanto a su expresión, entre las carnes DFD y CONTROL. Así, los resultados parecen indicar que en las carnes DFD, generalmente relacionadas con situaciones de estrés animal, se produce una respuesta autofágica más intensa y/o de mayor duración junto con una defensa antioxidante más elevada. En las muestras DFD, ambos procesos, autofagia y apoptosis, permanecen aún activos a las 24 horas *post-mortem*, ya que se encontró mayor expresión de la banda de Beclin-1 de 60 kDa, del flujo autofágico LC3II/LC3I y de la forma activa de caspasa-3. En cambio, la autofagia es menos intensa o presenta menor duración en el tiempo en las carnes CONTROL en las que la escasa expresión de caspasa-3 y la mayor expresión del fragmento de Beclin-1 de 37 kDa a las 24 horas *post-mortem* parecen indicar que la apoptosis ocurre de forma más temprana y podría estar inhibiendo la autofagia.

### **Cambios en el proteoma muscular**

Las diferencias encontradas en intensidad y duración de los procesos celulares de apoptosis y autofagia llevan asociados una serie de cambios en el proteoma muscular. Mediante electroforesis 1D SDS-PAGE se separaron un total de 28 bandas en el subproteoma sarcoplásmico y de 26 bandas en el miofibrilar, de entre 200 kDa y 20 kDa. La Tabla 2 muestra las proteínas que mostraron cambios significativos de intensidad entre las muestras CONTROL y DFD a las 24 horas *post-mortem*, tanto a nivel del subproteoma sarcoplásmico, que contiene la mayor parte de las proteínas metabólicas, como en el miofibrilar, formado principalmente por proteínas estructurales y contráctiles.

Entre las proteínas sarcoplásmicas, hubo 7 que mostraron mayor intensidad ( $P > 0,05$ ) en las

muestras DFD que en las CONTROL y que fueron identificadas como Enzima desramificante de glucógeno (GDBE), Glucógeno fosforilasa muscular (PYGM), Aconitasa 2 mitocondrial (ACO2),  $\beta$ -Enolasa (ENO3), Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), Anhidrasa carbónica tipo III (CAIII) y una banda doble formada por dos proteínas: precursor de Seroalbúmina (ALB) y la Proteína de estrés térmico (Heat Shock Protein) de 70 kDa (HSP70). En cambio, se encontraron dos bandas identificadas como Fructosa bisfosfato aldolasa A (ALDOA) y Creatinina quinasa muscular (CKM29) que mostraron menor intensidad ( $P > 0,05$ ) en las muestras DFD.

La mayoría de estas proteínas son enzimas relacionados con los procesos del catabolismo de carbohidratos, implicadas en la glucogénesis (GDBE y PYGM), en la glicólisis (ENO3, GAPDH y ALDOA) o con efecto en el mantenimiento de la homeostasis muscular (CKM). Las diferencias encontradas en cuanto a su intensidad entre ambos grupos probablemente sean debidas a la mayor demanda energética producida a consecuencia del estrés previo al sacrificio en las carnes DFD respecto a las CONTROL (Díaz et al., 2020).

La interpretación de las diferencias en la banda doble ALB/HSP70, que mostró mayor intensidad ( $P < 0,05$ ) en las muestras DFD respecto a las CONTROL, resulta difícil al tratarse de una banda peptídica que contiene dos proteínas que no pudieron separarse en los geles 1D SDS-PAGE, siendo ésta una de las limitaciones inherentes a esta técnica analítica. Se sabe que la HSP70 ejerce una función protectora sobre las proteínas estructurales contribuyendo al mantenimiento de la integridad muscular, además se ha descrito que esta proteína puede tener un papel anti-apoptótico (Bjarnadóttir et al., 2010; Fuente-García et al., 2019). Por tanto, la mayor intensidad de esta banda detectada en las muestras DFD podría indicar un retraso en la señal apoptótica, lo que coincide con nuestros resultados que muestran un retardo de la apoptosis en las muestras DFD a las 24 horas *post-mortem*.

Tabla 2. Proteínas con expresión diferencial entre muestras CONTROL y DFD a las 24 horas *post-mortem* (media  $\pm$  desviación estándar, expresadas en unidades arbitrarias de densidad óptica).

Table 2. Proteins with differential expression between CONTROL and DFD samples at 24 hours *post-mortem*. (mean  $\pm$  standard error, expressed in optical density arbitrary units).

| Identificación                                    | PM (kDa) | Control            | DFD                | Valor de P |
|---|----------|--------------------|--------------------|------------|
| <i>Extracto sarcoplásmico</i>                     |          |                    |                    |            |
| Enzima desramificante de glucógeno (GDBE)         | 167,9    | 0,59 $\pm$ 0,08    | 1,33 $\pm$ 0,56    | 0,040      |
| Glucógeno fosforilasa muscular (PYGM)             | 95,1     | 3,54 $\pm$ 0,61    | 6,04 $\pm$ 0,33    | 0,000      |
| Aconitasa 2 mitocondrial (ACO2)                   | 86,9     | 0,47 $\pm$ 0,08    | 0,71 $\pm$ 0,09    | 0,015      |
| Precursor de seroalbúmina/HSP70 (ALB/HSP70)       | 68,1     | 4,23 $\pm$ 0,76    | 5,56 $\pm$ 0,59    | 0,034      |
| $\beta$ -Enolasa (ENO3)                           | 49,2     | 0,81 $\pm$ 0,06    | 1,01 $\pm$ 0,08    | 0,029      |
| Fructosa bisfosfato aldolasa A (ALDOA)            | 38,3     | 11,95 $\pm$ 0,69   | 8,07 $\pm$ 0,27    | 0,000      |
| Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH30) | 27,1     | 4,28 $\pm$ 0,69    | 5,74 $\pm$ 0,19    | 0,021      |
| Creatinina quinasa muscular (CKM29)               | 26,2     | 4,37 $\pm$ 0,09    | 3,56 $\pm$ 0,46    | 0,014      |
| Anhidrasa Carbonica-III (CAIII)                   | 25,0     | 4,60 $\pm$ 0,13    | 4,98 $\pm$ 0,25    | 0,034      |
| <i>Extracto miofibrilar</i>                       |          |                    |                    |            |
| $\alpha$ -actinina-3 (ACTN3)                      | 95,5     | 6,510 $\pm$ 0,430  | 5,76 $\pm$ 0,205   | 0,021      |
| $\alpha$ -actina muscular                         | 40       | 19,545 $\pm$ 0,963 | 17,929 $\pm$ 0,582 | 0,028      |
| Proteína 1 de cuatro dominios y medio LIM (FHL1)  | 28,7     | 3,827 $\pm$ 1,144  | 5,295 $\pm$ 0,159  | 0,044      |
| Troponin T isoforma 31 (TnT)                      | 26       | 0,849 $\pm$ 0,108  | 0,587 $\pm$ 0,122  | 0,018      |
| Miosina de cadena ligera 1/3 (myL1)               | 22,7     | 4,956 $\pm$ 0,286  | 5,597 $\pm$ 0,330  | 0,026      |

PM: Peso molecular experimental (kDa).

En el caso del subproteoma miofibrilar, solamente 5 bandas mostraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los grupos de muestras analizadas, posiblemente porque los cambios en proteínas estructurales implicadas en el ablandamiento de la carne requieren tiempos más largos de maduración. En las carnes DFD se encontró mayor intensidad de Proteína LIM de 4 dominios y medio (FHL1) y de Miosina de cadena ligera 1/3 (MYL1) y menor de proteínas como  $\alpha$ -actinina 3 (ACTN3),  $\alpha$ -Actina muscular y Troponina T isoforma 31 (TnT) que en las carnes CONTROL.

Resulta especialmente relevante la mayor presencia del fragmento de 26 kDa de la TnT en las carnes CONTROL, dado que el perfil de degradación de esta proteína ha sido señalado en numerosos trabajos como indicador de proteólisis del tejido muscular (Sierra *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2015). Esto, junto con la mayor aparición de fragmentos de degradación de otras proteínas estructurales como son la ACTN3 y la  $\alpha$ -actina en las muestras CONTROL, parece indicar un mayor grado de proteólisis en la carne de pH<sub>24</sub> normal que en la carne DFD a las 24 horas *post-mortem*, es

decir, una ralentización de la proteólisis del tejido muscular en las canales DFD. Esto concuerda con estudios previos que también mostraron ralentización en la degradación de proteínas estructurales asociada con un retardo en los procesos apoptóticos en carnes de  $\text{pH}_{24} > 6$ , lo cual contribuye negativamente a la maduración, dando lugar a defectos o anomalías en la textura final de la carne (Franco et al., 2015; Poletti et al., 2018).

### Conclusiones

Este estudio ha permitido demostrar por primera vez la coexistencia e interrelación entre los procesos de autofagia y apoptosis en el tejido muscular y su papel relevante en la regulación del metabolismo *post-mortem* del músculo.

Las carnes DFD, normalmente asociadas a un mayor nivel de estrés animal pre-sacrificio, mostraron mayor estrés oxidativo, mayor activación de la respuesta antioxidante celular y mayor activación de mecanismos de supervivencia y de muerte celular programada (autofagia y apoptosis) a las 24 horas *post-mortem*. Esto parece indicar que en el tejido muscular de las canales DFD ocurre una respuesta celular al estrés oxidativo más intensa y prolongada durante las primeras 24 horas *post-mortem*, lo que parece producir una ralentización de la apoptosis y un retardo en los procesos proteolíticos. En cambio, en el tejido muscular de las canales CONTROL, con descenso de pH normal y menor estrés oxidativo, la apoptosis podría ocurrir de forma más temprana facilitando una proteólisis y un ablandamiento adecuado de la carne.

Estos resultados permiten entender los cambios relevantes en el metabolismo *post-mortem* muscular que afectan al proceso de conversión de músculo en carne e indican nuevos biomarcadores de los procesos relacionados con las carnes DFD, dado que el  $\text{pH}_{24}$  no siem-

pre resulta un indicador fiable de carnes de calidad anómala. No obstante, sería necesario ampliar este estudio con muestras de canales de distintos tipos raciales y monitorizar la evolución de un mayor número de biomarcadores para conocer con exactitud la sucesión temporal de los procesos estudiados.

### Agradecimientos

Agradecemos a la empresa FRIBIN su colaboración en el estudio. Este trabajo ha sido realizado gracias a la financiación obtenida en el proyecto RTA 2014-00034-C04-01 (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria y Fondo Europeo de Desarrollo Regional) y en el proyecto RTI2018-096162-R-C21 (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Agencia Estatal de Investigación y Fondo Europeo de Desarrollo Regional). Fernando Díaz agradece al Ministerio de Economía y Empresa la financiación para el contrato PEJ-2014-P-01094.

### Referencias bibliográficas

- Apple JK, Kegley EB, Galloway DL, Wistuba TJ, Rakes LK (2005). Duration of restraint and isolation stress as a model to study the dark-cutting condition in cattle. *Journal of Animal Science* 83: 1202-1214. <https://doi.org/10.2527/2005.8351202x>.
- Arnao MB, Cano A, Acosta M (2001). Analytical, nutritional and clinical methods section: The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry* 73: 239-244. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00324-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00324-1).
- Bekhit AEA, Hopkins DL, Fabri FT, Ponnampalam EN (2013). Oxidative processes in muscle systems and fresh meat: sources, markers, and remedies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12: 565-597. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12027>.

- Bjarnadóttir SG, Hollung K, Mosleth E, 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: 7408-7414. <https://doi.org/10.1021/jf100697h>.
- 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. [https://doi.org/doi:10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Chen L, Feng X, Zhang Y, Liu X, Zhang W, Li C, Ullah N, Xu X, Zhou G (2015). Effects of ultrasonic processing on caspase 3, calpain expression and myofibrillar structure of chicken during post mortem ageing. *Food Chemistry* 177: 280-287. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.064>.
- Coto-Montes A, Hardeland R (1999). Antioxidative effects of melatonin in *Drosophila melanogaster*: antagonization of damage induced by the inhibition of catalase. *Journal of Pineal Research* 27: 154-158. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.1999.tb00610.x>.
- de Gonzalo-Calvo D, Neitzert K, Fernández M, Vega-Naredo I, Caballero B, García-Macia M, Suárez FM, Rodríguez-Colunga MJ, Solano JJ, Coto-Montes A (2010). Differential inflammatory responses in aging and disease: TNF- $\alpha$  and IL-6 as possible biomarkers. *Free Radical Biology and Medicine* 49: 733-737. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.05.019>.
- Díaz F, Díaz-Luis A, Sierra V, Diñeiro Y, González P, García-Torres S, Tejerina D, Romero-Fernández MP, Cabeza de Vaca M, Coto-Montes A, Oliván M (2020). What functional proteomic and biochemical analysis tell us about animal stress in beef? *Journal of Proteomics* 218: 103722. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103722>.
- Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Waeg G, Puhl H, Tatzber F (1990). Endogenous antioxidants and lipoprotein oxidation. *Biochemical Society Transactions* 18: 1059-1061. <https://doi.org/10.1042/bst0181059>.
- Franco D, Mato A, Salgado FJ, López-Pedrouso M, Carrera M, Bravo S, Parrado-Casas M, Gallardo JM, Zapata C (2015). Tackling proteome changes in the *longissimus thoracis* bovine muscle in response to pre-slaughter stress. *Journal of Proteomics* 122: 73-85 <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.03.029>.
- Fuente-García C, Aldai N, Sentandreu E, Oliván M, García-Torres S, Franco-Ruiz D, Zapata C, Sentandreu MA (2019). Search for proteomic biomarkers related to bovine pre-slaughter stress using liquid isoelectric focusing (OFFGEL) and mass spectrometry. *Journal of Proteomics* 198: 59-65. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.10.013>.
- 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. <https://doi.org/10.4161/auto.26659>.
- García-Torres S, Cabeza de Vaca M, Tejerina D, Romero-Fernández MP, Ortiz A, Díaz F, Sierra V, González P, Franco D, Zapata C, Sentandreu MA, Oliván M (2019). ¿Es el pH un criterio suficiente para la clasificación de carne DFD en vacuno? I Congreso Iberoamericano de Marcas de Calidad de Carne y de Productos Cárnicos, 24 y 25 de octubre, Bragança, Portugal. pp. 73-77.
- Herrera-Mendez C, Becila S, Boudjellal A, Ouali A (2006). Meat ageing: Reconsideration of the current concept. *Trends in Food Science & Technology* 17: 394-405. <https://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2006.01.011>.
- Hughes J, Kearney G, Warner R (2014). Improving beef meat colour scores at carcass grading. *Animal Production Science* 54: 422-429. <https://doi.org/10.1071/AN13454>.
- Jami MS, Barreiro C, García-Estrada C, Martín JF (2010). Proteome analysis of the penicillin producer *Penicillium chrysogenum*. *Molecular and Cell Proteomics* 9: 1182-1198. <https://doi.org/10.1074/mcp.m900327-mcp200>.
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *The EMBO Journal* 19: 5720-5728. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/19.21.5720>.

- Kemp CM, Parr T (2012). Advances in apoptotic mediated proteolysis in meat tenderization. *Meat Science* 92: 252-259. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.03.013>.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* 186: 464-478. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86141-h](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86141-h).
- Li Q, Zhang M, Chen YJ, Wang YJ, Huang F, Liu J (2011). Oxidative damage and HSP70 expression in masseter muscle induced by psychological stress in rats. *Physiology & Behavior* 104: 365-372. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.04.012>.
- Mach N, Bach A, Velarde A, Devant M (2008). Association between animal, transportation, slaughterhouse practices, and meat pH in beef. *Meat Science* 78(3): 232-238. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.06.021>.
- Mounier L, Dubroeuq H, Andanson S, Veissier I (2006). Variations in meat pH of beef bulls in relation to conditions of transfer to slaughter and previous history of the animals. *Journal of Animal Science* 84: 1567-1576. <https://doi.org/10.2527/2006.8461567x>.
- Muchenje V, Dzama K, Chimonyo M, Strydom PE, Raats JG (2009). Relationship between pre-slaughter stress responsiveness and beef quality in three cattle breeds. *Meat Science* 81: 653-657. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.11.004>.
- Newton KG, Gill CO (1981). The microbiology of DFD fresh meats: a review. *Meat Science* 5: 223-232. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(81\)90005-X](https://doi.org/10.1016/0309-1740(81)90005-X).
- Ouali A, Herrera-Mendez HC, Coulis G, Becila S, Boudjellal A, Aubry L, Sentandreu MA (2006). Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Science* 74: 44-58. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.05.010>.
- Pearson AM, Young RB (1989) *Muscle and meat biochemistry*. Ed. Academic Press Inc., San Diego, California, USA.
- Picard B, Lebret B, Cassar-Malek I, Liaubet L, Berri C, Le Bihan-Duval E, Hocquette JF, Renand G (2015). Recent advances in omic technologies for meat quality management. *Meat Science* 109: 18-26. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.05.003>.
- Poleti M, Moncau C, Silva-Vignato B, Fernandes-Rosa A, Lobo A, Cataldi T, Negrão J, Silva S, Eler J, Balieiro J (2018). Label-free quantitative proteomic analysis reveals muscle contraction and metabolism proteins linked to ultimate pH in bovine skeletal muscle. *Meat Science* 145: 209-219. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.06.041>.
- Ponnampalam EN, Hopkins DL, Bruce H, Li D, Baldi G, Bekhit AE (2017). Causes and contributing factors to "Dark Cutting" meat: current trends and future directions: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 16: 400-430. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12258>.
- Potes Y, Oliván M, Rubio-González A, de Luxán-Delgado B, Díaz F, Sierra V, Arroyo L, Peña R, Bassols A, González J, Carreras R, Velarde A, Muñoz-Torres M, Coto-Montes A (2017). Pig cognitive bias affects the conversion of muscle into meat by antioxidant and autophagy mechanisms. *Animal* 11: 2027-2035. <https://doi.org/10.1017/S1751731117000714>.
- Pulford DJ, Dobbie P, Fraga Vazquez S, Fraser-Smith E, Frost DA, Morris CA (2009). Variation in bull beef quality due to ultimate muscle pH is correlated to endopeptidase and small heat shock protein levels. *Meat Science* 83: 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.11.008>.
- Rubio-González A, Potes Y, Illán-Rodríguez D, Vega-Naredo I, Sierra V, Caballero B, Fàbrega E, Velarde A, Dalmau A, Oliván M, Coto-Montes A (2015). Effect of animal mixing as a stressor on biomarkers of autophagy and oxidative stress during pig muscle maturation. *Animal* 9: 1188-1194. <https://doi.org/10.1017/S1751731115000518>.
- Schilling MW, Suman SP, Zhang X, Nair MN, Desai MA, Kezhou C, Ciaramella MA, Allen PJ (2017). Proteomic approach to characterize biochemistry of meat quality defects. *Meat Science* 132: 131-138. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.04.018>.
- Sentandreu MA, Coulis G, Ouali A (2002). Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends in Food Science and Technology* 13: 400-421. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00188-7](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00188-7).

- Sierra V, Fernández-Suárez V, Castro P, Osoro K, Vega-Naredo I, García-Macia M, Rodríguez-Colunga P, 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. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5701>.
- Sierra V, Oliván M (2013). Role of mitochondria on muscle cell death and meat tenderization. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery* 7(2): 120-129. <http://doi.org/10.2174/1872214811307020005>.
- Silva JA, Patarata L, Martins C (1999). Influence of ultimate pH on bovine meat tenderness during ageing. *Meat Science* 52(5): 453-459. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(99\)00029-7](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(99)00029-7).
- Terlouw EMC, Arnould C, Auperin B, Berri C, Le Bihan-Duval E, Deiss V, Lefèvre F, Lensink BJ, Mounier L (2008). Pre-slaughter conditions, animal stress and welfare: current status and possible future research. *Animal* 2: 1501-1517. <https://doi.org/10.1017/S1751731108002723>.
- Viljoen HF, de Kock HL, Webb EC (2002). Consumer acceptability of dark, firm and dry DFD and normal pH beef steaks. *Meat Science* 61: 181-185. [https://doi.org/10.1016/s0309-1740\(01\)00183-8](https://doi.org/10.1016/s0309-1740(01)00183-8).
- Wang L, Ma G, Zhang Y, Shi X, Han L, Yu Q, Zhao S, Ma J (2018). Effect of mitochondrial cytochrome c release and its redox state on the mitochondrial-dependent apoptotic cascade reaction and tenderization of yak meat during postmortem aging. *Food Research International* 111: 488-497. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.049>.
- Warriss PD (2000). *Meat science: An introductory text*, 2<sup>nd</sup> Ed. CAB-International, Wallingford, England.
- Wirawan E, Vande Walle L, Kersse K, Cornelis S, Claerhout S, Vanoverberghe I, Roelandt R, De Rycke R, Verspurten J, Declercq W, et al. (2010). Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell death & disease* 1, e18. <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2009.16>.
- Wu W, Fu Y, Therkildsen M, Li X-M, Dai R-T (2015). Molecular Understanding of Meat Quality Through Application of Proteomics. *Food Reviews International* 31, 13-28, <https://doi.org/10.1080/87559129.2014.961073>
- Wulf DM, Emmett RS, Leheska JM, Moeller SJ (2002). Relationships among glycolytic potential, dark cutting (dark, firm and dry) beef, and cooked beef palatability. *Journal of Animal Science* 80: 1895-1903. <https://doi.org/10.2527/2002.8071895x>.
- Xing T, Gao F, Tume RK, Zhou G, Xinglian X (2018). Stress Effects on Meat Quality: A Mechanistic Perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 18: 380-401. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12417>.
- Zhang SX, Farouk MM, Young OA, Wieliczko KJ, Podmore C (2005). Functional stability of frozen normal and high pH beef. *Meat Science* 69: 765-72. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.11.009>.
- Zhang M, Wang D, Geng Z, Bian H, Liu F, Zhu Y, Xu W (2014). The level of heat shock protein 90 in pig Longissimus dorsi muscle and its relationship with meat pH and quality. *Food Chemistry*, 165: 337-341. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.111>.

(Aceptado para publicación el 8 de abril de 2020)