

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

Departamento de Ciencia Animal



**ESTUDIO DE ACTIVIDADES DE ENZIMAS
METABÓLICOS Y ANTIOXIDANTES EN DOS
MÚSCULOS DE VACUNO DE LA RAZA
AVILEÑA-NEGRA IBÉRICA**

TESIS FINAL DE MÁSTER

Alumna:

Cristina Zomeño Segado

Directora Académica:

Dra. Pilar Hernández Pérez

Valencia, Diciembre 2007

ÍNDICE

1.- ANTECEDENTES	1
2.- INTRODUCCIÓN	3
2.1.- SECTOR DEL VACUNO DE CARNE. LA RAZA AVILEÑA-NEGRA IBÉRICA... 3	3
2.2.- MÚSCULOS ESQUELÉTICOS	4
2.2.1.- Tipos de fibras musculares. Métodos de clasificación..... 4	4
2.2.2.- Metabolismo muscular..... 6	6
2.3.- CALIDAD DE CARNE EN VACUNO	8
2.3.1.- Calidad organoléptica..... 8	8
2.3.2.- Influencia de la composición fibrilar en la calidad de la carne	10
3.- OBJETIVO.....	12
4.- MATERIAL Y MÉTODOS	13
4.1.- MATERIAL ANIMAL	13
4.2.- ENSAYOS ENZIMÁTICOS.....	13
4.2.1.- Ensayo de Lactato deshidrogenasa	13
4.2.2.- Ensayo de Isocitrato Deshidrogenasa y Aldolasa	14
4.2.3.- Ensayo de Superóxido dismutasa	16
4.3.- ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	17
5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
5.1.- ESTUDIO DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	18
5.2.- ESTUDIO DE LAS RELACIONES ENTRE CARACTERES	22
6.- CONCLUSIONES.....	26
7.- AGRADECIMIENTOS	26
8.- BIBLIOGRAFÍA	27
ANEXO.....	32

1.- ANTECEDENTES.

El trabajo desarrollado en esta Tesis final de Máster se enmarca dentro de la colaboración de la Universidad Politécnica de Valencia con el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) y la Universidad Complutense de Madrid. En dichas instituciones se ha desarrollado un Proyecto de Investigación que tiene como objeto profundizar en las bases genéticas y funcionales que determinan las diferencias de calidad existentes entre los músculos *Psoas major* y *Flexor digitorum* de la raza Avileña Negra-Ibérica, músculos que dan lugar a piezas con marcadas diferencias de calidad, el solomillo y el morcillo respectivamente.

Hasta el momento, se han realizado varios estudios que han descrito una variabilidad genética asociada a caracteres de calidad de carne y sus relaciones con otros caracteres en vacuno (Marshall *et al.*, 1999; Burrow *et al.*, 2001). Se ha estudiado la relación entre caracteres de calidad y de crecimiento en diferentes razas (Marshall *et al.*, 1999; Gil *et al.*, 2001; Altarriba *et al.*, 2005). También, se han descrito diferencias inmunohistoquímicas, histoquímicas e histológicas entre músculos bovinos (Gotoh, 2003) y una expresión génica diferencial entre músculos (Sudre *et al.*, 2003; 2005). Sin embargo, son pocos los estudios que profundicen en si existe una asociación genética entre caracteres de calidad de carne entre músculos y en las implicaciones que tendría esta asociación. Esta información podría ser de utilidad para establecer estrategias de selección apropiadas que mejoren la calidad de carne en su conjunto.

En la raza Avileña-Negra Ibérica, hasta ahora no se ha realizado selección por caracteres de calidad de carne. Estudios previos han detectado diferencias para diferentes caracteres de calidad de carne entre los músculos *Psoas major* y *Flexor digitorum* (Díaz *et al.*, 2006; Moreno-Sánchez *et al.*, 2006). Se han estimado parámetros genéticos de algunos caracteres de calidad en estos dos músculos y se han observado heredabilidades bajas y correlaciones genéticas entre los dos músculos que siguen diferentes patrones. Estos resultados sugieren la existencia de una expresión génica diferencial entre músculos, que varía en función del carácter estudiado, por lo que es previsible que existan distintos mecanismos metabólicos implicados en la expresión fenotípica del carácter (Díaz *et al.*, 2006).

En el proyecto desarrollado por el INIA se han caracterizado los músculos *Psoas major* y *Flexor digitorum* mediante técnicas inmunohistoquímicas, histoquímicas e histológicas, determinando la composición fibrilar de los mismos y evaluando la relación existente entre dicha composición y las propiedades contráctiles, metabólicas y celulares. Los resultados obtenidos en dicho estudio sugieren una coordinación entre las propiedades fisiológicas, bioquímicas y morfológicas. La composición fibrilar del músculo y las propiedades que derivan de ella pueden ser

responsables de parte de las diferencias de calidad entre ambos músculos, ya que el tipo de fibra muscular influye en características de calidad de carne.

Además, se ha llevado a cabo un estudio de la expresión génica diferencial entre ambos músculos mediante un experimento con microarrays de cDNA específicos de músculo y grasa bovino. Se detectaron 39 genes que presentaban expresión diferencial, 10 genes sobre-expresados en el músculo *Flexor digitorum* y 29 genes sobre-expresados en el músculo *Psoas major*. Estos genes están implicados en diferentes funciones biológicas aunque uno de los resultados más remarcables es el relacionado con los genes implicados en el metabolismo muscular, concretamente con la glicolisis. Estos resultados apoyan la hipótesis de que existan diferentes patrones de regulación para las rutas glicolíticas y para las rutas oxidativas, y además plantean algunas cuestiones sobre los músculos mixtos.

En el presente trabajo, se van a estudiar las actividades de determinadas enzimas relacionadas con el metabolismo muscular, tanto del metabolismo oxidativo como del metabolismo glicolítico. Se pretende evaluar la relación entre la composición fibrilar y las características metabólicas de los músculos, y comprobar si las diferencias encontradas a nivel de expresión de genes se corresponden con diferencias a nivel fenotípico. Para ello, se va a estudiar la actividad de las enzimas del metabolismo muscular, lactato deshidrogenasa, aldolasa, isocitrato deshidrogenasa, y enzimas antioxidantes del músculo, concretamente la superóxido dismutasa.

2.- INTRODUCCIÓN.

2.1.- SECTOR DEL VACUNO DE CARNE. LA RAZA AVILEÑA-NEGRA IBÉRICA.

El ganado bovino es un sector ganadero importante, que en España cuenta con un censo actual de unos 6.5 millones de animales y sitúa al país en tercer lugar dentro de la Unión Europea. Sin embargo, el consumo de la carne de vacuno en los países europeos sigue una tendencia a la baja. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación estimó este consumo en España en 7.83 kg por habitante en el año 2005, ocupando uno de los puestos más bajos en Europa.

Tradicionalmente, los objetivos de selección en vacuno de carne se orientaban fundamentalmente hacia los caracteres cárnicos como crecimiento, morfología y calidad de la canal, y los caracteres maternales como aptitud a la cría, fertilidad y facilidad al parto. Actualmente, ha habido una reorientación de estos objetivos de selección, por una parte hacia una mejora de la eficiencia de la producción que persigue reducir los costes de producción y por otra parte hacia la mejora de la calidad de los productos que de esta forma busca el incrementar el valor añadido de los productos.

La raza Avileña-Negra Ibérica es una raza autóctona que se cría en extensivo en zonas de orografía pronunciada como los sistemas montañosos del interior de la Península (Sistema Ibérico, Sierra Morena y Sierra de Cameros) y los sistemas adhesados del centro y suroeste (Castilla La Mancha, Extremadura, Castilla y León, Madrid y Andalucía). Esta raza basa su eficacia y rentabilidad en el equilibrio entre la rusticidad para el aprovechamiento de pastos en medios difíciles, con el objetivo de tener un ternero por vaca y año, y buenas producciones cárnicas en cuanto a calidad y rendimiento. Tradicionalmente, ha sido seleccionada por aptitud maternal y por peso final al sacrificio. Sin embargo, esta raza está actualmente ligada a una figura de calidad, la Indicación Geográfica Protegida Carne de Ávila, de modo que se ha producido una reorientación de los objetivos de selección hacia la búsqueda de un valor añadido que proporcione calidad al producto final. Al ser una raza autóctona, no ha sufrido tanta presión de selección como otras razas cárnicas, por lo que las características bioquímicas de sus músculos pueden ser distintas (Gil *et al.*, 2001).

Los consumidores están preocupados por la calidad de la carne y su salubridad, pero además en estos últimos años ha aumentado el interés por aspectos como el origen de los animales y cómo ha sido el proceso de cría y manejo de los mismos. Esto hace que un porcentaje apreciable de consumidores esté dispuesto a pagar más por carne de calidad certificada, abriendo un sector en el mercado que justifica la búsqueda de la calidad de carne mediante selección en el área de la producción animal. La Unión Europea ha apoyado esta tendencia con la creación de diversas

figuras de calidad como Denominación de origen protegida (DOP), Indicaciones Geográficas Protegidas (IGP), Marcas de Garantía, Ganadería ecológica, entre otras, que generalmente amparan a razas autóctonas las que cuentan con sistemas de producción específicos (Serra *et al.*, 2004).

2.2.- MÚSCULOS ESQUELÉTICOS.

El tejido muscular esquelético representa aproximadamente el 50% del peso de la canal del ganado vacuno, por lo que puede afirmarse que es uno de los tejidos de mayor importancia económica para la producción de carne. Está formado por haces de fibras musculares recubiertas de tejido conjuntivo. La fibra o célula muscular es la unidad contráctil del tejido muscular y en su interior se encuentran las miofibrillas. Éstas a su vez están constituidas por filamentos gruesos y delgados cuya organización estructural es la responsable de la apariencia estriada del músculo esquelético. Este tipo de músculos desempeñan una amplia variedad de funciones tales como locomoción, mantenimiento de la postura y respiración, entre otras.

2.2.1.- Tipos de fibras musculares. Métodos de clasificación.

Los músculos se componen de una mezcla heterogénea de fibras musculares que se diferencian en sus características estructurales, contráctiles y metabólicas (Sudre *et al.*, 2005). La variabilidad entre músculos en cuanto a función, metabolismo o calidad está relacionada con la proporción de los distintos tipos de fibras que los componen (Klont *et al.*, 1998).

Según los métodos histoquímicos, basados en el estudio de la actividad ATPasa miofibrilar, las fibras musculares se han clasificado en tres grupos: Fibras tipo I de contracción lenta y baja actividad ATPasa, Fibras tipo IIA de contracción rápida y elevada actividad ATPasa y un tercer grupo que contiene fibras tipo IIB y IIX de contracción muy rápida y actividad ATPasa muy elevada. En ocasiones, los tipos IIB y IIX se clasifican en un mismo grupo llamado IIB ya que son indistinguibles con estos métodos. Las características contráctiles de las fibras musculares están determinadas por la composición de las isoformas de la cadena de miosina pesada (MHC). El término "isoforma" indica proteínas que son similares pero no idénticas en su estructura y con propiedades funcionales diferentes. En los músculos esqueléticos se han identificado cuatro isoformas de la cadena pesada de la miosina, una isoforma MHC lenta o MHC-I y tres isoformas rápidas MHC-IIA, MHC-IIX y MHC-IIB, aunque en bovino y en la mayoría de grandes mamíferos sólo se expresan las isoformas I, IIA y IIX. Los métodos inmunohistoquímicos se basan en este criterio para clasificar las fibras musculares, utilizando anticuerpos mono y policlonales específicos contra las distintas isoformas de MHC. Como ventaja a los anteriores métodos de clasificación, este tipo de métodos permite detectar las fibras

híbridas, fibras contienen dos o más tipos de isoformas de miosina, que en muchos casos son un porcentaje apreciable y realizar así una correcta clasificación de las fibras musculares.

En la figura 1 se observan diferentes secciones transversales del músculo Psoas mayor de vacuno obtenidas en un estudio inmunohistoquímico, histoquímico e histológico (Moreno-Sánchez, 2007). Las secciones A:D muestran tinciones con anticuerpos monoclonales específicos para las cinco isoformas de MHC de la miosina. Con este método es posible detectar los cinco tipos de fibra presentes en el músculo en estudio, 3 de ellos son fibras puras (tipo I, IIA y IIB) y 2 de ellos son fibras híbridas (I+IIA y IIAX). Las secciones E-F se corresponden con la actividad ATPasa miofibrilar después de preincubación ácida (pH 4.42, E) y alcalina (pH 10.35, F). Las fibras se dividen en tres categorías correspondientes a las tres principales intensidades de tinción. Las fibras híbridas muestran intensidades intermedias siendo imposible diferenciarlas de las puras de forma objetiva.

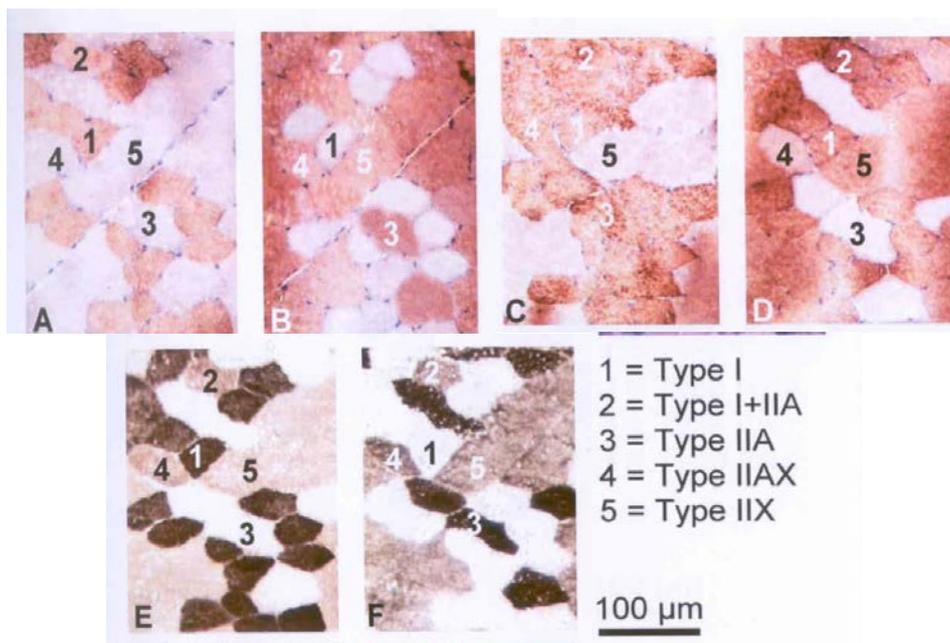


Figura 1: Secciones del músculo Psoas mayor de vacuno teñidas para inmunohistoquímica, histoquímica e histología. A-D: Secciones teñidas con una batería de anticuerpos monoclonales frente a isoformas específicas de MHC: BAF8 (A, anti MHC-I), SC71 (B, anti MHC-IIA), BF35 (C, anti MCH-I y -IIA) y S58H2 (D, anti MHC-I y -IIX); E-F: Actividad ATPasa después de preincubaciones ácidas (pH 4.42, E) y alcalinas (pH 10.35, F). (Moreno-Sánchez, 2007)

La mayoría de los estudios de clasificación de fibras realizados en bovino, se han desarrollado mediante técnicas histoquímicas (Gotoh, 2003; Kim *et al.*, 2000; Totland y Kryvi, 1991). Es por ello que sólo se han caracterizado los tres tipos principales: I, IIA y IIX. En esta especie son escasos los trabajos que utilizan técnicas como la inmunohistoquímica, Picard *et al.* (1998) publicaron el primer trabajo en el que se utilizaban anticuerpos monoclonales en esta especie. Estos autores demostraron la eficacia de esta técnica para determinar el tipo de fibra muscular y describieron la existencia de fibras híbridas en dos músculos, *Longissimus thoracis* y *Semitendinosus* de la raza Charolés. En estudios más recientes, se han combinado metodologías inmunohistoquímicas e histoquímicas con PCR cuantitativa a tiempo real para determinar la expresión génica de los cuatro genes que codifican las isoformas de la MHC en músculos bovinos (Maccatrozo *et al.*, 2004), con los que se confirma que la isoforma IIB no se expresa en los músculos del tronco ni de las extremidades, aunque sí en músculos oculares especializados.

Hay diversos factores que van a hacer que varíe la composición fibrilar del músculo. Se ha observado una composición fibrilar distinta entre diferentes razas en vacuno (Gil *et al.*, 2001) así como entre diferentes líneas en porcino (Gil *et al.*, 2003). El tipo de músculo afecta a la composición fibrilar, Gotoh (2003) en vacuno observó un mayor porcentaje de fibras tipo IIX en músculos de orientación glicolítica (*Longissimus thoracis* y *Semitendinosus*) y una mayor cantidad de fibras tipo I y IIA en músculos de orientación oxidativa (*Serratus ventralis*). La edad también tiene un efecto sobre dicha composición. El número de fibras musculares está determinado antes del nacimiento. Al nacimiento hay un predominio de fibras oxidativas pero después se ha observado una conversión hacia fibras glicolíticas (Lefaucher *et al.*, 1986). Por otra parte, la actividad física induce una transformación de las fibras de contracción rápida a lenta, siguiendo una secuencia de transformación: IIB → IIX → IIA → I.

2.2.2.- Metabolismo muscular.

Las propiedades metabólicas de los músculos están relacionadas con las propiedades estructurales y contráctiles, y todas ellas dependen a su vez de los distintos tipos de fibras que los componen.

Cada tipo de fibra utiliza un sustrato para la producción de ATP, que proporciona energía destinada al recambio proteico y a la contracción muscular. Las fibras tipo I se caracterizan por tener un metabolismo oxidativo, utilizan las grasas y los carbohidratos para la producción de energía mediante la vía aeróbica. Las fibras de contracción rápida (IIB y IIX) poseen un metabolismo glicolítico, utilizan los carbohidratos para la producción de energía mediante la glicólisis anaerobia. Las fibras intermedias (IIA) pueden utilizar tanto la ruta oxidativa como la glicolítica. Las

fibras musculares pueden favorecer o cambiar una ruta metabólica concreta incrementando la cantidad de enzimas características de una de las dos rutas.

Tradicionalmente se ha hablado de músculos rojos y blancos. Los músculos rojos presentan un alto porcentaje de fibras tipo I y se asocian a un metabolismo oxidativo. Esta estructura y metabolismo hace que sean músculos de contracción lenta y resistentes a la fatiga por lo que están capacitados para realizar actividades de larga duración como mantener la posición. Por el contrario, los músculos blancos se componen mayoritariamente de fibras tipo II (IIB y IIX) y se asocian a un metabolismo glicolítico. Estas características hacen que sean músculos de contracción rápida, capacitados para soportar demandas energéticas elevadas pero de manera transitoria ya que se fatigan enseguida (Campbell *et al.*, 2001). Por lo que son músculos que se relacionan con el movimiento.

El músculo *Psoas major* constituye la pieza cárnica conocida como solomillo. Forma parte del miembro pelviano y se origina en la superficie ventral de los cuerpos de las vértebras lumbares y apófisis transversas. Su función está relacionada con el movimiento y consiste en flexionar la cadera, rotar lateralmente la extremidad posterior y doblar la columna. El músculo *Flexor digitorum* es uno de los músculos que constituyen la pieza cárnica conocida como Morcillo, se localiza en el miembro torácico y se origina en el epicóndilo medial del húmero desde donde va a insertarse en las falanges. Su función está relacionada con el mantenimiento de la posición y consiste en flexionar el carpo y las falanges. En la figura 2 están representados ambos músculos en la canal.



Figura 2. Despiece de la canal bovina. Adaptada de Moreno-Sánchez (2007).

El estudio de la actividad de determinadas enzimas y moléculas relacionadas con el metabolismo muscular permite identificar el tipo metabólico del músculo y relacionarlo la composición miofibrilar de éstos. Algunos ejemplos de estas enzimas son la lactato deshidrogenasa (LDH) y aldolasa, enzimas características del metabolismo glicolítico y la isocitrato deshidrogenasa (ICDH), característica del metabolismo oxidativo (Sudre et al., 2005). Otras dos medidas clásicas que se han utilizado en diversas especies como marcadores del tipo metabólico de la fibra son las actividades de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (GPDH) y la succinato deshidrogenasa (SDH) (Acevedo y Rivero, 2006; Argüello et al., 2001; Quiroz-Rothe y Rivero, 2004). La GDPH es una enzima clave del metabolismo glicolítico y la SDH, en cambio, es un marcador de la capacidad oxidativa del músculo.

2.3.- CALIDAD DE CARNE EN VACUNO.

El concepto de calidad es difícil de definir de una manera simple. La Norma ISO 9000-2000 la define como la totalidad de las propiedades y características de un producto o servicio, que le confiere su aptitud para satisfacer las necesidades establecidas o implícitas. La calidad de la carne es una propiedad multifactorial que engloba aspectos tan variados como las propiedades organolépticas (color, jugosidad, textura y flavor), el valor nutricional (contenido y composición de las grasas), los caracteres tecnológicos (pH, capacidad de retención de agua, estabilidad oxidativa), las propiedades higiénicas (ausencia de residuos como antibióticos o pesticidas) o aspectos de calidad social (bienestar animal o sistemas de producción alternativos).

Existe una gran variabilidad en la calidad de la carne intra y entre animales de la misma raza, sexo y ambiente (Lawrie, 1998). Esta variabilidad es probable que se deba a diferencias en factores genéticos y factores ambientales, que interaccionan y determinan el resultado de los procesos metabólicos del periodo *peri-* y *post-mortem*.

2.3.1.- Calidad organoléptica.

La calidad organoléptica o sensorial se refiere a las características de un alimento que son percibidas por los órganos de los sentidos. La calidad organoléptica o sensorial está determinada por el conjunto de características percibidas en el momento de la compra y del consumo, y que influyen en la satisfacción sensorial. Para la carne, las principales características de calidad sensorial son el color, la jugosidad, terneza, aroma y sabor. De estos atributos mencionados, la terneza y el color son dos de las características más apreciadas por el consumidor en el caso del vacuno (George *et al*, 1999; Issahou, 1991). Hay diversos factores que influyen en la terneza, entre ellos destacan la proteólisis

producida durante el periodo *post-mortem* por la acción de enzimas musculares como las calpaínas y su inhibidor específico calpastatinas, y el tejido conectivo presente en el músculo que, por una parte determina el tamaño de los haces de fibras y por otra el grado de entrecruzamiento de las fibras de colágeno influye sobre el grado de dureza.

En estudios previos realizados en vacuno (Díaz *et al.*, 2006; Moreno-Sánchez *et al.*, 2006) se detectaron diferencias para caracteres de calidad entre los músculos *Psoas major* (PM) y *Flexor digitorum* (FD) de la raza Avileña-Negra Ibérica. En la Tabla 1 se muestran las medias para caracteres de calidad determinados en dos músculos (FD y PM). Se observó que caracteres sensoriales como terneza, jugosidad, olor y sabor tenían una mayor apreciación en el *Psoas major*, así como un mayor contenido de grasa intramuscular en este mismo músculo. Por otra parte, se observó que el *Flexor digitorum* presentaba mayores valores de colesterol total y de fuerza de corte Warner-Blatzer.

Tabla 1. Medias para caracteres de calidad determinados en dos músculos (FD y PM).

Caracteres	FD		PM	
	N	Media \pm sd	N	Media \pm sd
Grasa Intramuscular (%)	393	1.1 \pm 0.8	396	2.7 \pm 1.3
Colesterol (mg/100gr)	378	53.3 \pm 15.0	380	40.7 \pm 10.6
WB	356	7.8 \pm 4.7	362	6.5 \pm 3.2
Terneza	398	3.5 \pm 1.4	398	5.7 \pm 1.2
Jugosidad	398	3.4 \pm 1.3	398	4.8 \pm 1.4
Flavor	398	4.0 \pm 1.2	398	5.3 \pm 1.0

Adaptada de Díaz *et al.* (2006) y Moreno-Sánchez *et al.* (2006)

Torrescano *et al.* (2003) compararon la terneza de catorce músculos bovinos, incluyendo el *Psoas major* (PM) y *Flexor digitorum* (FD). En este trabajo se determinó que el FD era uno de los músculos con mayor concentración de colágeno total, mientras que el PM presentó valores bajos. Se encontró además una elevada correlación positiva ($r=0.723$; $P<0.05$) entre el contenido en colágeno total y la fuerza de corte Warner-Blatzer.

Características como la composición fibrilar de los músculos, composición del tejido conectivo intramuscular o características lipídicas explican gran parte de las variaciones de calidad observadas en carne bovina, en cuanto a los caracteres organolépticos (Sudre *et al.*, 2005).

2.3.2.- Influencia de la composición fibrilar en la calidad de la carne.

Como anteriormente se ha comentado, la composición fibrilar de los músculos es un factor que influye en los procesos bioquímicos producidos antes y después del sacrificio y por ello influye en los caracteres de calidad de carne en todas las especies (Klont, Brocks y Eikelenboom, 1998).

El color de la carne está determinado por la mioglobina, concretamente por dos aspectos relacionados con ella como el contenido y el estado químico del pigmento. Las fibras tipo I y IIA presentan un mayor contenido en mioglobina (Essén-Gustavson *et al.*, 1992) que las fibras tipo IIB. Por lo que los músculos con un mayor contenido en fibras de orientación oxidativa (I y IIA) presentan un color más rojo y los músculos con un mayor contenido en fibras de orientación glicolítica (IIB) un color más blanco. Además, las fibras tipo I y IIA tienen una mayor concentración de mitocondrias comparadas con las fibras IIB. Las mitocondrias compiten con la mioglobina por el oxígeno, reduciendo el color rojo brillante de la superficie y la estabilidad del color. Así pues, el color de los músculos glicolíticos podría ser más estable que el de los músculos oxidativos.

La terneza es una propiedad multifactorial en la que el tipo metabólico podría tener un cierto efecto. De hecho, el proceso de maduración está influido por la composición fibrilar ya que se ha visto que la velocidad de maduración aumenta conforme mayor es la presencia de fibras rápidas (Klont *et al.*, 1998). Además los músculos oxidativos presentan un mayor nivel de calpastatinas lo que contribuye a un mayor grado de dureza. El diámetro de las fibras musculares también influye en la terneza. Se ha visto que una mayor proporción de fibras pequeñas, que generalmente son fibras oxidativas, está asociada con una mayor terneza (Tuma *et al.*, 1962; Crouse *et al.*, 1991). Uno de los factores que más afectan a la terneza es la cantidad de colágeno y su grado de entrecruzamiento. Por una parte, se ha visto que un mayor contenido en colágeno se relaciona con una mayor dureza (Torrescano *et al.*, 2003). Por otra parte, el grado de entrecruzamiento de las fibras de colágeno va a influir sobre su solubilidad, de forma que un mayor grado de entrecruzamiento se relaciona con una menor solubilidad y con una mayor dureza.

Las fibras de tipo I y IIA tienen un mayor contenido de lípidos lo que va a afectar a la jugosidad y al flavor. En general, se ha visto que los músculos oxidativos tienen un mayor contenido de lípidos, fosfolípidos y colesterol y una mayor actividad lipolítica (Hernández *et al.*, 1998).

Por último, en cuanto a la capacidad de retención de agua, es una característica relacionada con el potencial glicolítico y con el pH último del músculo. Las fibras glicolíticas presentan un pH último más bajo en el proceso de maduración que las fibras oxidativas y esta relación determina que los músculos glicolíticos tengan una menor capacidad de retención de agua. (Lawrie, 1998)

La composición fibrilar, tanto el tipo de fibra como su proporción, varía en función de cada músculo lo que puede explicar gran parte de las diferencias de calidad. La particular composición fibrilar que tiene cada músculo dotará a la carne de características específicas, y en conjunto, al individuo para una aptitud más o menos adecuada hacia el sistema de producción.

3.- OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo es estudiar las actividades de enzimas metabólicas y antioxidantes en dos músculos de vacuno, *Psoas major* y el *Flexor digitorum*, de la raza Avileña-Negra Ibérica. Los músculos objeto de estudio pertenecen a dos cortes comerciales de la canal de vacuno muy diferentes en términos anatómicos, funcionales, económicos y de calidad percibida por el consumidor.

Para ello, se van a medir actividades de enzimas del metabolismo glicolítico anaerobio, lactato deshidrogenasa y aldolasa, y del metabolismo oxidativo, isocitrato deshidrogenasa, así como enzimas antioxidantes, superóxido dismutasa.

4.- MATERIAL Y MÉTODOS.

4.1.- MATERIAL ANIMAL.

Se utilizaron treinta terneros de la raza Avileña Negra-Ibérica. Los animales fueron criados en las mismas condiciones de alimentación y localización geográfica. Se sacrificaron a los 425 días de edad, con un peso medio de 500 kg, y tras un periodo de engorde de 196 días de duración. Tras el sacrificio, se procedió a la toma de muestras en el matadero. Los músculos muestreados fueron el *Psoas major* y el *Flexor digitorum*.

Las muestras musculares se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su utilización para los análisis posteriores.

El proceso de obtención de las muestras fue realizado por el equipo de investigación del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) de Madrid, en colaboración con la “Asociación de Avileña Negra-Ibérica” y el “Consejo Regulador de Carne de Ávila”. Las muestras congeladas se transportaron hasta la Universidad Politécnica de Valencia en recipientes con nieve carbónica y se almacenaron a -80°C.

Para la realización de los ensayos enzimáticos se utilizaron 30 muestras musculares, 15 muestras pertenecientes al músculo *Psoas major* y 15 pertenecientes al *Flexor digitorum*.

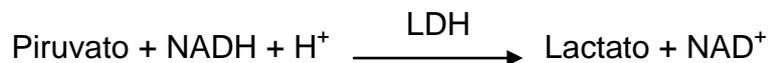
4.2.- ENSAYOS ENZIMÁTICOS.

Los caracteres metabólicos de los músculos fueron determinados mediante la medición de la actividad de las enzimas lactato deshidrogenasa (LDH) y aldolasa, enzimas características del metabolismo anaerobio glicolítico, e isocitrato deshidrogenasa (ICDH), enzima característica del metabolismo aerobio oxidativo. El carácter antioxidante de los músculos se determinó midiendo la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD).

4.2.1.- Ensayo de Lactato deshidrogenasa.

El ensayo de la enzima lactato deshidrogenasa LDH se determinó de acuerdo con el método descrito por Bergmeyer y Bernt (1974) con algunas modificaciones. La lactato deshidrogenasa cataliza la reducción del piruvato por NADH obteniéndose

lactato y NAD^+ . La actividad enzimática se determina a partir de la velocidad de desaparición del NADH, medido a 340 nm.



Para la preparación de los extractos musculares se utilizaron 200 mg de músculo congelado que se homogeneizaron en 10 ml de tampón fosfato a pH 7,5. El homogeneizado se centrifugó a 6000 g durante 15 minutos a 4°C y se filtró a través de lana de vidrio.

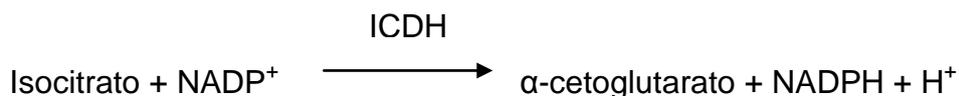
Para la medición de la actividad enzimática, se realizó previamente una dilución 1/100 con tampón fosfato de los extractos musculares obtenidos tanto del *Psoas major* como del *Flexor digitorum*. Se tomaron 105 μl del extracto diluido que se añadieron a 1225 μl del medio de reacción formado por: Tampón Trietanolamina (Trietanolamina (TEA) 52.73 mM + EDTA 5.11 mM), β -NADH sal disódica 0.255 mM y Piruvato sódico 2.71 mM

La reacción se ensayó por triplicado para cada músculo. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm, durante 8 minutos, a 30°C en el espectrofotómetro (Shimadzu UV-1601 spectrophotometer). La actividad enzimática se calculó a partir de la disminución de la densidad óptica del medio correspondiente a la desaparición del NADH y se expresó como micromoles de NADH transformados por minuto y gramo de músculo.

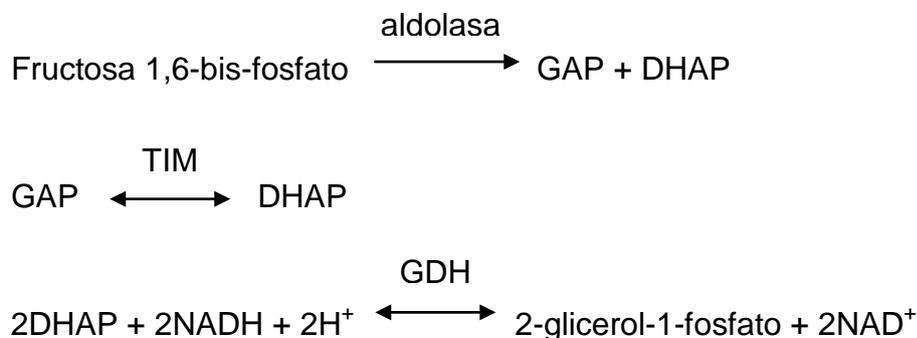
4.2.2.- Ensayo de Isocitrato Deshidrogenasa y Aldolasa.

El ensayo de las enzimas isocitrato deshidrogenasa (ICDH) y aldolasa se realizó de acuerdo con el método descrito por Ansay (1974).

La ICDH cataliza la deshidrogenación del isocitrato en oxalosuccinato que posteriormente es descarboxilado en α -cetoglutarato en presencia de NADP^+ . La actividad enzimática se determina a partir de la velocidad de aparición de NADPH, medido a 340 nm.



La aldolasa cataliza la escisión de la fructosa 1,6-bis-fosfato en gliceraldehido 3-fosfato (GAP) y dihidroxiacetona fosfato (DHAP). Los isómeros formados pueden interconvertirse por la triosa fosfato isomerasa (TIM). La dihidroxiacetona fosfato es reducida a 2 glicerol-1-fosfato por la glicerol fosfato deshidrogenasa en presencia de NADH. La actividad enzimática se determina a partir de la velocidad de desaparición del NADH, medido a 340 nm.



Los extractos musculares se prepararon a partir de 2 g de músculo congelado homogeneizados con 15 ml de tampón fosfato ajustado a pH 7.25. El homogeneizado se centrifugó a 15000 rpm durante 20 minutos a 5°C y el sobrenadante obtenido se filtró a través de lana de vidrio. El extracto se depositó en tubos eppendorfs que se almacenaron a -80°C hasta el momento del análisis durante un tiempo máximo de una semana.

Para el ensayo de la ICDH, se tomaron 50 µl del extracto muscular y se homogeneizaron con 2.6 ml del medio de reacción previamente atemperado a 37°C durante 10 minutos en el recinto termostatado del espectrofotómetro. El medio de reacción estaba formado por: HCl 1.25N, TEA 0.97M, NaCl 72.5 mM, DL- isocitrato 4.42 mM, Manganeso II Sulfato 1-hidrato 4.62 mM y NADP⁺ sal disódica 0.36 mM.

La reacción se ensayó por triplicado para cada músculo. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm, durante 10 minutos, a 37°C en el espectrofotómetro (Shimadzu UV-1601 spectrophotometer). La actividad enzimática se calculó a partir del aumento de la densidad óptica del medio de reacción correspondiente a la formación del NADPH y se expresó como micromoles de NADPH formados por minuto y gramo de músculo.

Para el ensayo de la aldolasa, se utilizó el kit ALD100 de BENsrl distribuido por Biotécnica 2000 Madrid. Previamente se realizó una dilución 1/3 de los extractos obtenidos de los dos tipos de músculos. A continuación se tomaron 5 µl del extracto diluido y se añadieron a 2.56 ml del medio de reacción previamente atemperado a 37°C durante 10 min en el recinto termostatado del espectrofotómetro.

La reacción se ensayó por triplicado para cada músculo. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm, durante 7 minutos, a 37°C en el espectrofotómetro (Shimadzu UV-1601 spectrophotometer). La actividad enzimática se calculó a partir de la disminución de la densidad óptica del medio de reacción correspondiente desaparición del NADH y se expresó como micromoles de NADH transformados por min y g de músculo.

4.2.3.- Ensayo de la superóxido dismutasa.

La medición de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) se realizó de acuerdo con el método descrito por Paoletti y Mocali (1990). El oxígeno molecular (O_2) es reducido a anión superóxido (O_2^-) en presencia de EDTA, cloruro de manganeso y mercaptoetanol. Los aniones superóxido favorecen la oxidación del NADH a NAD^+ . La SOD cataliza la conversión del anión superóxido en peróxido de hidrógeno. La actividad enzimática se determina a partir de velocidad de inhibición de la desaparición de NADH, medido a 340 nm.



Para este ensayo se utilizaron los mismos extractos musculares preparados para la medición de las actividades enzimáticas de la ICDH y Aldolasa que se mantuvieron congelados a -80°C durante un tiempo máximo de una semana.

Los extractos de de los dos tipos de músculo estudiados en esta experiencia se diluyeron 33.3 veces con tampón fosfato. Se tomaron 0.3 ml de los extractos diluidos y se añadieron a 2.895 ml del medio de reacción formado por: Tampón trietanolamina-dietanolamina-HCl (TDB) (TEA 8.3 mM + DEA 8.3 mM + HCl) ajustado a pH 7.4 + 120 μ l β -NADH sal disódica 0.31 mM + 75 μ l EDTA-MnCl₂ (2.6 mM/1.3 mM) y 0.3 ml de mercaptoethanol 1.03 mM. Se midió la absorbancia a 340 nm de longitud de onda durante 25 minutos en el espectrofotómetro (Shimadzu UV-1601 spectrophotometer). La reacción se ensayó por triplicado para cada músculo.

Se realizó un control antes de cada grupo ensayos enzimáticos con el mismo medio de reacción pero sin extracto (sin SOD).

Una unidad de SOD se define como la cantidad necesaria de extracto para inhibir la velocidad de oxidación del NADH del control al 50%. Se calculó el % de inhibición (% inhibición = velocidad de oxidación de la muestra / velocidad oxidación control x 100). Se realizó la conversión del % de inhibición en unidades de SOD.

4.3.- ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

Para el estudio de las actividades enzimáticas en ambos músculos se calcularon las medias por mínimos cuadrados utilizando un modelo en el que se incluyó el efecto músculo. Se realizó un análisis de correlaciones calculando los coeficientes de correlación y se realizó un análisis de componentes principales. Los análisis fueron realizados con el paquete estadístico SAS (SAS, 2000).

5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1.- ESTUDIO DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.

En la Tabla 2 se muestran las medias por mínimos cuadrados, errores estándar y coeficientes de variación de las actividades de las enzimas lactato deshidrogenasa (LDH), aldolasa (ALD), isocitrato deshidrogenasa (ICDH) y superóxido dismutasa (SOD), así como los ratios LDH/ICDH y ALD/ICDH en los músculos *Psoas major* (PM) y *Flexor digitorum* (FD).

Se han encontrado diferencias significativas ($P < 0.001$) entre los dos músculos en el metabolismo glicolítico. El músculo PM presentó una mayor actividad de LDH y ALD así como unos ratios LDH/ICDH y ALD/ICDH más elevados que el FD. En cuanto al metabolismo oxidativo, determinado por la actividad de la enzima ICDH, no se han encontrado diferencias significativas entre ambos músculos.

Tabla 2. Medias por mínimos cuadrados (LSM), errores estándar (S.E), coeficientes de variación (CV) de las actividades enzimáticas y ratios de los músculos *Psoas major* y *Flexor digitorum* y significación de las diferencias.

	<i>Psoas major</i> (PM)			<i>Flexor digitorum</i> (FD)			Significación
	Media	S.E	CVx100	Media	S.E.	CVx100	
LDH	774	26.6	12.9	273	20.6	29.5	***
ALDOLASA	311	8.85	10.6	82.3	2.79	13.1	***
ICDH	4.4	0.24	21.6	4.78	0.18	14.5	ns
LDH/ICDH	187	16.1	32.1	59.0	6.10	40.0	***
ALD/ICDH	74.2	5.38	27.1	17.7	1.11	24.2	***
SOD	585	20.7	13.7	566	16.6	11.4	ns

***: $P < 0.001$; ns: no significativo

LDH, lactato deshidrogenasa ($\mu\text{moles}/\text{min.g}$ músculo); ALDOLASA ($\mu\text{moles}/\text{min.g}$ músculo); ICDH, isocitrato deshidrogenasa ($\mu\text{moles}/\text{min.g}$ músculo); SOD, superóxido dismutasa (unidades SOD/ g músculo); LDH/ICDH, Ratio LDH/ICDH; ALD/ICDH, Ratio ALD/ICDH.

Hasta el momento no hemos encontrado datos en la literatura sobre las características metabólicas en los músculos *Psoas major* y *Flexor digitorum* en ganado vacuno. Sin embargo, se pueden encontrar estudios realizados en otros músculos en esta especie.

Gil *et al.* (2001) estudiaron la actividad de LDH, ICDH y el ratio LDH/ICDH en el músculo *Longissimus thoracis* (LT) de siete razas autóctonas españolas, Asturiana de la montaña (AM), Asturiana de los Valles (AV), Avileña-Negra Ibérica (A-NI), Bruna del Pirineus (BP), Morucha (MO), Pirenaica (PI) y Retinta (RE). Las actividades oxidativas más elevadas correspondieron a las razas RE, MO y A-NI mientras que las razas AV y PI presentaron los menores valores de ICDH. Las razas AM y RE presentaron menores actividades de LDH que las otras razas estudiadas. Considerando los valores del ratio LDH/ICDH, la raza RE resultó ser la más oxidativa, las AV y OI las más glicolíticas, siendo las razas AM, A-NI, BP y MO las que presentaron valores intermedios del ratio LDH/ICDH. Serra *et al.* (2004) también estudiaron estas actividades enzimáticas en el músculo LT de la raza Bruna de los Pirineos obteniendo valores similares a los del estudio de Gil *et al.* (2001).

Sudre *et al.* (2005) estudiaron actividades enzimáticas en los músculos *Rectus abdominis* (RA) y *Semitendinosus* (ST) de la raza Charolés. Estos autores encontraron diferencias entre ambos músculos para el metabolismo glicolítico y para el oxidativo. El ST presentó una mayor actividad LDH y menor actividad ICDH que el RA. Estos resultados están de acuerdo con el carácter oxidativo del músculo RA y con el carácter glicolítico del ST en vacuno (Talmant *et al.*, 1986). La actividad ICDH del músculo RA fue menor que la obtenida en nuestro trabajo para el músculo FD (1.39 Y 4.78 $\mu\text{moles}/\text{min.g}$ músculo para el RA y FD, respectivamente). Por otra parte, el músculo ST presentó una mayor actividad LDH que la obtenida en nuestro trabajo para el músculo PM, ambos músculos de orientación más glicolítica (933 y 774 $\mu\text{moles}/\text{min.g}$ músculo, para el ST y PM, respectivamente).

Jurie *et al.* (2005) estudiaron actividades enzimáticas en diferentes músculos de toros de cuatro razas francesas: Aubrac (AU), Charolais (CH), Limousin (LI) y Salers (SA). Se observaron diferencias significativas entre las actividades LDH e ICDH entre los músculos *Longissimus thoracis* (LT), *Semitendinosus* (ST) y *Triceps brachii* (TB) ($P < 0.001$). El LT fue el músculo más oxidativo (ICDH=1.92 $\mu\text{moles}/\text{min.g}$ músculo y LDH=892 $\mu\text{moles}/\text{min.g}$ músculo). El ST fue el más glicolítico (LDH=1060 $\mu\text{moles}/\text{min.g}$ músculo e ICDH=1.77 $\mu\text{moles}/\text{min.g}$ músculo). Los tres músculos presentaron actividades LDH más altas e ICDH más bajas que las obtenidas en los músculos PM y FD estudiados en el presente trabajo (Tabla 2).

Posteriormente, Jurie *et al.* (2007) estudiaron actividades enzimáticas en cuatro músculos, *Longissimus thoracis* (LT), *Semimembranosus* (SM), *Semitendinosus* (ST) y *Triceps brachii* (TB), de vacas de las razas Holstein (HO) y Salers (SA),

sacrificadas a los 6-7 años de edad. Se observaron diferencias para el metabolismo oxidativo y glicolítico entre los músculos estudiados. El TB fue el músculo más oxidativo, al contrario que en el trabajo anterior (Jurie *et al.*, 2005) donde el LT fue más oxidativo que el TB. Las diferencias entre estos estudios podrían ser debidas a las diferencias de raza, sexo y edad de los animales.

Se pueden encontrar en la literatura estudios sobre caracteres metabólicos del músculo *Psoas major* en otras especies, sin embargo no se han encontrado datos para el músculo *Flexor digitorum*. En conejo, Gondret *et al.* (2005) obtuvieron en el músculo PM actividades LDH más altas (1200-1500 $\mu\text{moles}/\text{min.g}$ músculo) e ICDH más bajas (2.5-3 $\mu\text{moles}/\text{min.g}$ músculo) a las obtenidas en nuestro trabajo para el PM de vacuno. En cerdo, Petersen *et al.* (1997) obtuvieron actividades LDH más altas (2500-2700 $\mu\text{moles}/\text{min.g}$ músculo) para el PM que las obtenidas en vacuno.

La composición fibrilar de los músculos utilizados en el presente trabajo ha sido previamente estudiada por Moreno-Sánchez (2007) mediante técnicas inmunohistoquímicas, histoquímicas e histológicas. Estos autores caracterizaron el músculo *Flexor digitorum* como un músculo rojo con la siguiente composición fibrilar: fibras tipo I (54%), tipo I+IIA (6.4%), tipo IIA (36.5%), tipo IIAX (3.1%) y tipo IIX (0.0%). El músculo *Psoas major* se caracterizó como un músculo mixto con la siguiente composición fibrilar: fibras tipo I (29%), tipo I+IIA (4.4 %), tipo IIA (20.7%), tipo IIAX (10.5%) y tipo IIX (35.4). Estos resultados están de acuerdo con las actividades enzimáticas obtenidas en el presente trabajo (Tabla 2). El FD presentó una actividad oxidativa elevada, actividad relacionada con el elevado porcentaje de fibras tipo I y tipo IIA y la ausencia de fibras tipo IIX. El PM presentó tanto actividades glicolíticas como oxidativas elevadas, resultados relacionados con el carácter mixto de este músculo en el que se expresaron los cinco tipos de fibras musculares.

No se dispone en la literatura de otros estudios que caractericen el *Flexor digitorum* de vacuno. Sin embargo, el *Psoas major* ha sido caracterizado en estudios previos. Totland y Kryvi (1991) caracterizaron el músculo *Psoas major* de la raza Norwegian Red mediante técnicas histoquímicas. El músculo estaba compuesto principalmente por fibras tipo I (43%) y por fibras tipo IIX y IIA (32% y 25%). En otro trabajo realizado en una raza nativa Coreana (Kim *et al.*, 2000) se estudió la composición fibrilar del *Psoas major* mediante técnicas histoquímicas. Se observó que el músculo se componía de un 50.2 % de fibras tipo I, 34.0% de fibras tipo IIA y 15.9% de tipo IIX. Gotoh (2003), también con métodos histoquímicos, clasificó este músculo en la raza Japanese Black con un 44.8% de fibras tipo I, 27.8% de tipo IIA y 27.3% de tipo IIX. Los resultados obtenidos en estos trabajos difieren de los obtenidos por Moreno-Sánchez (2007). Estas diferencias en la composición fibrilar pueden ser debidas a las técnicas de clasificación utilizadas en los distintos trabajos. La mayoría de estudios de caracterización fibrilar en vacuno (Gotoh, 2003; Kim *et*

al., 2000; Totland y Kryvi, 1991) se realizaron mediante técnicas histoquímicas, que no detectaban las fibras híbridas y clasificaban de forma incorrecta los tipos de fibras. De modo que se obviaban porcentajes de un 6.4% y un 14.9% en el *Flexor digitorum* y *Psoas major*, respectivamente. Parecen existir además diferencias en la composición del *Psoas major* entre razas. Estas diferencias pueden ser explicadas por la raza y la interacción raza-sistema de producción o por la localización de la muestra.

Las diferencias en el metabolismo muscular observadas el presente trabajo entre músculos (Tabla 2) se corresponden con las diferencias detectadas por Moreno-Sánchez (2007) a nivel de expresión génica entre estos mismos músculos, *Psoas major* y *Flexor digitorum*. En este estudio se detectó una clara expresión diferencial de genes que codifican para enzimas implicadas en el metabolismo glicolítico entre ambos músculos no detectándose una expresión diferencial tan clara para enzimas implicadas en el metabolismo oxidativo. Estos resultados están de acuerdo con las actividades enzimáticas obtenidas donde no se han encontrado diferencias en la actividad ICDH entre ambos músculos.

En cuanto a la actividad antioxidante del músculo, determinada por la actividad de la enzima superóxido dimutasa (SOD), no se han encontrado diferencias significativas entre los músculos estudiados (Tabla 2). El estudio de esta actividad enzimática se realizó porque había indicios de una sobreexpresión del gen que codifica para ella en el *Psoas major*. Finalmente no resultó haber una sobreexpresión en el músculo PM del gen que codifica para la SOD lo que estaría de acuerdo con la obtención de una actividad SOD similar en los músculos PM y FD (Tabla 2). Diversos estudios (Mei *et al.*, 1994; Nakano *et al.*, 1992; Aksnes y Njaa, 1981; Lin y Hultin, 1978) muestran que la actividad de la SOD es mayor en vacuno, que en pavo y porcino. Trabajos previos han puesto de manifiesto que podría haber una influencia del tipo metabólico muscular sobre la capacidad antioxidante del músculo. Varios autores han encontrado una mayor actividad antioxidante en músculos oxidativos comparados con músculos glicolíticos en diversas especies como en vacuno (Renerre *et al.*, 1996), en pavo (Renerre *et al.*, 1999), en pollo (Pradhan *et al.*, 2000) y en cerdo (Hernández *et al.*, 2002). No obstante, en nuestro trabajo no se han encontrado diferencias significativas entre los músculos estudiados para la actividad de SOD.

5.2.- ESTUDIO DE LAS RELACIONES ENTRE CARACTERES.

En la Figura 3 se presenta un análisis de componentes principales de las actividades enzimáticas y de los ratios para los músculos *Psoas major* y *Flexor digitorum*. La componente principal 1 explica el 68.27% de la variación total observada e incluye las variables relacionadas con el metabolismo muscular. En la parte derecha del eje de esta componente se encuentran las enzimas del metabolismo glicolítico (LDH y ALD) y sus ratios (ratio LDH/ICDH y ratio ALD/ICDH), variables muy relacionadas entre sí, y en la parte izquierda del eje la enzima del metabolismo oxidativo (ICDH), mostrando una relación negativa con las anteriores variables. La segunda componente principal explica el 17.06% de la variabilidad total observada e incluye la actividad antioxidante muscular (SOD). Esta variable no está relacionada con ninguna de las otras variables representadas.

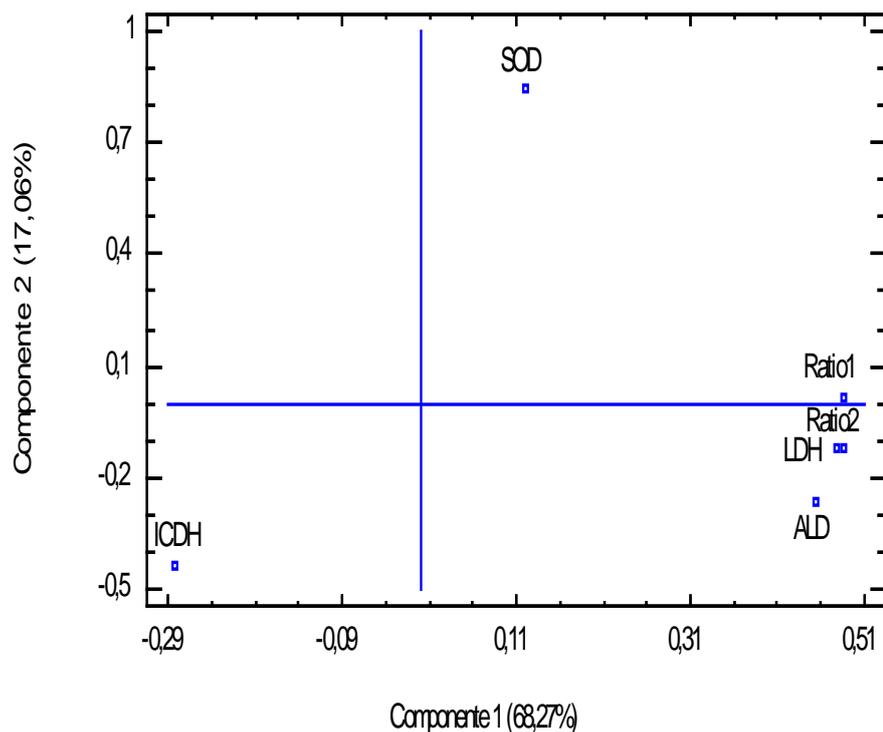


Figura 3. Análisis de componentes principales de actividades enzimáticas y ratios. LDH: Lactato deshidrogenasa; ICDH: Isocitrato deshidrogenasa; ALD: Aldolasa; SOD: Superóxido dismutasa; Ratio 1: Ratio LDH/ICDH; Ratio 2: Ratio ALD/ICDH.

En la Tabla 3 se muestran los coeficientes de correlación entre las actividades enzimáticas y los ratios para los dos músculos estudiados. Se observa una correlación positiva entre las enzimas LDH y Aldolasa, así como entre estas enzimas y sus ratios (LDH/ICDH y ALD/ICDH). Estos resultados son esperables ya que son variables implicadas en el metabolismo muscular glicolítico. Por ello, parece innecesario medir las actividades LDH y Aldolasa dado que describen prácticamente lo mismo, información a tener en cuenta en futuros trabajos.

La ICDH muestra una correlación negativa con los ratios LDH/ICDH y ALD/ICDH y en menor medida con las actividades LDH y Aldolasa ($r=-0.37$ y $r=-0.25$, respectivamente). Estos resultados pueden deberse a que son caracteres implicados en diferentes rutas metabólicas y están de acuerdo con los resultados obtenidos por Gil *et al.* (2001) en el músculo *Longissimus thoracis* (LT). Estos autores estudiaron la relación entre caracteres bioquímicos del músculo LT en la raza Avileña-Negra Ibérica y obtuvieron unos coeficientes de correlación similares ($r= -0.32$) entre LDH e ICDH.

Tabla 3. Coeficientes de correlación entre actividades enzimáticas y ratios de los músculos *Psoas major* y *Flexor digitorum*.

	LDH	ALDOLASA	ICDH	SOD	LDH/ICDH	ALD/ICDH
LDH	1.00	0.95*	-0.37	0.25	0.93*	0.94*
ALDOLASA		1.00	-0.25	0.10	0.85*	0.93*
ICDH			1.00	-0.20	-0.63*	-0.53*
SOD				1.00	0.23	0.12
LDH/ICDH					1.00	0.97*
ALD/ICDH						1.00

*: $P<0.05$

La Tabla 4 muestra los coeficientes de correlación entre los caracteres estudiados cuando se analizan para el músculo *Psoas major*. Se observan correlaciones positivas entre la enzima LDH y la enzima Aldolasa y entre LDH y los ratios, resultados similares a los obtenidos cuando se analizan todos los músculos. Destaca una correlación negativa más elevada entre la enzima ICDH y LDH ($r=-0.66$). Esta relación está de acuerdo con resultados de estudios previos (Jurie *et al.*, 1995) en los que se obtuvieron correlaciones negativas entre estas dos variables en el músculo *Longissimus thoracis* de la raza de vacuno Limousin.

Tabla 4. Coeficientes de correlación entre actividades enzimáticas y ratios del músculo *Psoas major*.

	LDH	ALDOLASA	ICDH	SOD	LDH/ICDH	ALD/ICDH
LDH	1.00	0.56*	-0.66*	0.38	0.86*	0.82*
ALDOLASA		1.00	-0.06	0.05	0.38	0.56*
ICDH			1.00	-0.13	-0.91*	-0.84*
SOD				1.00	0.14	0.06
LDH/ICDH					1.00	0.96*
ALD/ICDH						1.00

*: P<0.05

La Tabla 5 muestra los coeficientes de correlación entre los caracteres estudiados cuando se analizan para el músculo *Flexor digitorum*. Se observa una correlación positiva entre la actividad LDH y el ratio LDH/ICDH, así como entre la Aldolasa y el ratio ALD/ICDH. También se observa que la ICDH está correlacionada de forma negativa con ambos ratios. En este caso, destaca la ausencia de correlaciones positivas entre LDH y Aldolasa. Estos resultados están de acuerdo con el carácter oxidativo del músculo.

Tabla 5. Coeficientes de correlación entre actividades enzimáticas y ratios del músculo *Flexor digitorum*.

	LDH	ALDOLASA	ICDH	SOD	LDH/ICDH	ALD/ICDH
LDH	1.00	0.37	-0.21	0.35	0.90*	0.42
ALDOLASA		1.00	-0.38	0.09	0.47	0.81*
ICDH			1.00	-0.26	-0.58*	-0.82*
SOD				1.00	0.40	0.22
LDH/ICDH					1.00	0.72*
ALD/ICDH						1.00

*: P<0.05

En la Figura 4 se muestra la distribución de los dos tipos de músculos analizados en el espacio definido por la componente principal 1 y 2. Se observa que los dos tipos de músculos están separados por la componente principal 1. En lado derecho del eje de la componente 1 se agrupan los músculos *Psoas major* ya que este lado del eje recoge las variables relacionadas con el metabolismo muscular glicolítico y en lado izquierdo del eje se agrupan los músculos *Flexor digitorum* ya que este lado explica la actividad oxidativa muscular. Esta figura resumiría los resultados obtenidos en el presente trabajo, en el que se han detectado diferencias entre músculos para el metabolismo glicolítico muscular pero no para el metabolismo oxidativo por lo que los músculos están separados por su capacidad glicolítica.

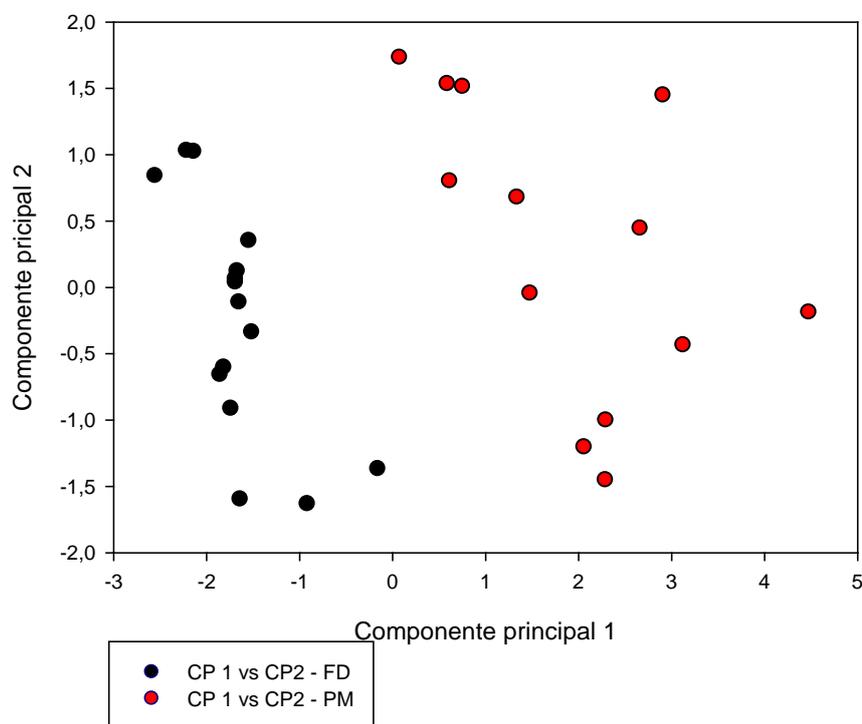


Figura 4. Distribución de los dos tipos de músculos analizados en el espacio definido por la componente principal 1 y 2.

6.- CONCLUSIONES.

Nuestros resultados muestran que el músculo *Flexor digitorum* es un músculo de carácter oxidativo de acuerdo a su alta actividad ICDH y baja actividad de ALD, LDH y ratio ALD/ICDH y LDH/ICDH mientras que el músculo *Psoas major* es un músculo de carácter mixto con una alta actividad glicolítica (ALD, LDH) y oxidativa (ICDH).

Las actividades enzimáticas metabólicas y antioxidantes obtenidas en los músculos *Psoas major* y *Flexor digitorum* se corresponden con los resultados de los estudios previos de caracterización fibrilar y de expresión génica realizados en el proyecto en el que se enmarca el presente trabajo.

El músculo *Flexor digitorum* presentó una actividad oxidativa elevada, actividad relacionada con su composición fibrilar en la que destaca el elevado porcentaje de fibras tipo I y tipo IIA y la ausencia de fibras tipo IIX. El músculo *Psoas Major* presentó tanto actividades glicolíticas como oxidativas elevadas, resultados relacionados con el carácter mixto de este músculo en cuya composición fibrilar están presentes los cinco tipos de fibras musculares.

Las diferencias detectadas a nivel fenotípico entre las actividades de enzimas del metabolismo glicolítico están de acuerdo con la detección de una sobreexpresión diferencial de genes que codifican para enzimas implicadas en este metabolismo entre ambos músculos. Por otro lado, no se ha detectado una expresión diferencial tan clara para enzimas implicadas en el metabolismo oxidativo lo que está de acuerdo con la ausencia de diferencias en la actividad de las enzimas de este metabolismo.

7.- AGRADECIMIENTOS.

A las Dras: Clara Díaz y Natalia Moreno del Instituto Nacional de investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria de Madrid por la cesión de las muestras de vacuno utilizadas en este trabajo.

8.- BIBLIOGRAFÍA.

- Acevedo L.M., Rivero J.L. (2006). New insights into skeletal muscle fibre types in the dog with particular focus towards hybrid myosin phenotypes. *Cell and tissue research*. 323: 283-303.
- Aksnes A., Njaa L.R. (1981). Catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase in different fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 49B, 893.
- Altarriba J., Varona L., Moreno C., Yagüe G., Sañudo C. (2005). *Livestock Production Science*. 95: 103-114.
- Ansay M. (1974). Individualité musculaire chez le bovin: étude de l'équipement enzymatique de quelques muscles. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*. 14: 471-486.
- Argüello A., López-Fernández J.L., Rivero J.L. (2001). Limb myosin heavy chain isoproteins and muscle fiber types in the adult goat (*Capra hircus*). *The Anatomical record*. 264: 284-293.
- Bergmeyer H.U, Bernt E. (1974). Lactate deshydrogenase: UV-essay with pyruvate and NADH. In: *Methods of enzymatic analysis*. 2: 574-579. Ed. By H.U. Bergmeyer. Acad.Press: New York.
- Briand M., Talmant A., Briand Y., Monin G., Durand R. (1981). Metabolic types of muscle in the sheep: I. Myosin ATPase, Glycolitic, and Mitochondrial enzyme activities. *European Journal Applied Physiology*. 46: 347-358.
- Burrow H.M., Moore S.S., Johnson D.J., Barendse W, Bindom B.M. (2001). Quantitative and molecular genetic influences on properties of beef: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 41: 893-919.
- Cambell W.G., Gordon S.E., Carlson C.J., Pattison J.S., Hamilton M.T., Booth F.W. (2001). Differential global gene expresión in red and white skeletal muscle. *American Journal of Physiology- Cell Physiology*. 280: C763-768.
- Crouse D., Koomaraie M., Seideman S.D. (1991). The relationship of muscle fibre size to tenderness of beef. *Meat Science*. 30: 295-302.
- Díaz C., Moreno-Sánchez N., et al. (2006) ¿Existe un componente genético de las diferencias de calidad de carne entre cortes comerciales? *II Congreso Nacional de Carne de Vacuno*. Gijón (Asturias), 198-204.

-
- Eggen A., Hocquette J.F. (2004). Genomic approaches to economic trait loci and tissue expression profiling: application to muscle biochemistry and beef quality. *Meat Science*. 66: 1-9.
 - Essen-Gustavson B., Kalström K., Lundström K. (1992). Muscle fibre characteristics and metabolic response at slaughter in pigs of different halothane genotypes and their relation to meat quality. *Meat Science*. 31: 1-11.
 - Geay Y., Bauchart D., Hocquette J.F., & Culioli J., (2001). Effect of nutritional factors on biochemical; structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants; consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. *Reproduction Nutrition Development*. 41, 1-26 Erratum, 41,377.
 - George M.H., Tatum J.D., Belk K., Smith G.C. (1999); An audit of retail beef loin steak tenderness conducted in eight U.S. cities. *Journal of Animal Science*, 77, 1735-1741.
 - Gil M., Serra X., et al. (2001). The effect of bred-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: 181-188.
 - Gil M., Oliver M.A., Gispert M., Diestre A., Sosnicki A., Jacoste A., Carrión D. (2003). The relationship between pig genetics, myosin heavy chain I, biochemical traits and quality of *M. longissimus thoracis*. *Meat Science*. 65: 1063-1070.
 - Gondret F., Combes S., Lefaucheur L., Lebel B. (2005). Effects of exercise during growth and alternative rearing systems on muscle fibers and collagen properties. *Reproduction Nutrition Development*. 45: 69-86.
 - Gotoh T. (2003). Histochemical properties of skeletal muscles in Japanese cattle and their meat production ability. *Animal Science Journal*, 74:339-354.
 - Hernández P., Navarro J.L. Toldrá F. (1998). Lipid composition and lipolytic enzyme activities in porcine skeletal muscles with different oxidative pattern. *Meat Science*. 49:1-10.
 - Hernández P., Zomeño L., Ariño B., Blasco A. (2002). Antioxidant, lipolytic and proteolytic enzyme activities in pork meat from different genotypes. In: *Proc. 48th ICoMST*, Rome 2002, vol 2, 568-569.
 - Issanchou S. (1991). Consumer expectations and perceptions of meat and meat products quality. *Meat Science*, 43(S), S5-S19.

-
- Jurie C., Robelin J., Picard B., Renand G., Geay Y. (1995) Inter-animal variation in biological characteristics of muscle tissue in male Limousin cattle. *Meat Science*. 39: 415-425.
 - Jurie C., Martin J.F., Listrat A., Jailler J., Culioli Picard B. (2005) Effects of age and breed of beef bulls on growth parameters, carcass and muscle characteristics. *Animal Science*. 80: 257-263.
 - Jurie C., Picard B., Hocquette J.F., Dransfield E., Micol D., Listrat A. (2007) Muscle and meat quality characteristics of Holstein and Salers cull cows. *Meat Science* (en prensa).
 - Kim K.H., Kim Y.S., Lee Y.K., Baik M.G. (2000). Postmortem muscle glycolysis and meat quality characteristics of intact males Korean native (Hanwoo) cattle. *Meat Science*. 55: 47-52.
 - Klont R., Brocks L., Eikelenboom G. (1998). Muscle fibre type and meat quality. *Meat Science*, 49(suppl.1), S219-S229.
 - Lawrie R.A. Ciencia de la carne. Ed. Acribia. Zaragoza. Tercera edición. 1998.
 - Lefaucher L., Vigneron P. (1986). Postnatal changes in some histochemical and enzymatic characteristics of three pig muscles. *Meat Science* 16: 199-216.
 - Lin T.S., Hultin H.O. (1978). Glutathione peroxidase of skeletal muscle. *Journal of Food Biochemistry*. 2:49.
 - Maccatrozo L., Patruno M., Toniolo L., Reggiani C., Mascarello F. (2004). Myosin heavy chain 2B isoform is expressed in specialised eye muscles but not in trunk and limb muscles of cattle. *European Journal of Histochemistry*. 48: 357-366.
 - Marshall D.R. (1999). Genetics of meat quality. The genetics of cattle. Ed: R.Fries and A.Ruvinsky. CABI Publishing. United Kingdom.
 - Moreno-Sánchez N., Moreno A., Carabaño M.J., Fernández M.T., García M., Díaz C. (2006). Genetics correlation for meat quality traits measured in two different muscles in the Avileña Negra Ibérica breed. *In Proceedings of the 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Belo Horizonte (Brasil). August 13-18. Paper 10-30.
 - Moreno-Sánchez N. (2007). Expresión génica diferencial y caracterización funcional de dos músculos, Psoas major y Flexor digitorum, en Avileña-Negra Ibérica. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Genética.

-
- Mei L., Crum A.D., Decker E.A. (1994). Role in antioxidant enzymes in the development of warmed-over flavour in pork. *Journal of Food Lipids*. 1: 273.
 - Nakano T., Sato M., Takeuchi M. (1992). Glutathione peroxidase of fish. *Journal of Food Science*. 57:5.
 - Paoletti, F., Mocali, A. (1990). Determination of superoxide dismutase activity by a purely chemical system based on NAD(P)H oxidation. *Methods in enzymology*, 186, 209-219.
 - Petersen J.S., Henckel P., Maribo H., Oksbjerg N., Sorensen M.T. (1997). Muscle metabolic traits, post mortem-pH-decline and meat quality in pigs subjected to regular physical training and spontaneous activity. *Meat Science*. 46:259-275.
 - Picard B., Duris M., Jurie C. (1998). Classification of bovine muscle fibres by different histochemical techniques. *The Histochemical Journal*. 30: 415-431.
 - Pradhan A.A., Rhee K.S., Hernández P. (2000). Stability of catalase and its potential role in lipid oxidation in meat. *Meat Science*. 54: 385-390.
 - Quiroz-Rothe E., Rivero J.L. (2004). Coordinated expression of myosin heavy chains, metabolic enzymes, and morphological features of porcine skeletal muscle fibre types. *Microscopy Research and Technique*. 65: 43-61.
 - SAS., 2000. *SAS/STAT user's guide*. Release 8.1. Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
 - Serra X., Gil M., *et al.* (2004). Characterisation of young bulls of the Bruna dels Pirineus cattle breed (selected from old Brown Swiss) in relation to carcass, meat quality and biochemical traits. *Meat Science*. 66: 425-436.
 - Sudre K., Leroux C., *et al.* (2003). Transcriptomic analysis of two Bovine Muscles during Ontogenesis. *Journal Biochemical*. 133: 745-756.
 - Sudre K, Cassar-Malek I, *et al.* (2005) Biochemical and transcriptomic analyses of two bovine skeletal muscles in Charoleis bulls divergently selected for muscle growth. *Meat Science*. 70: 267-277.
 - Talmant A., Monin G., Briand M., Dadet M., Briand Y. (1986) Activities of metabolic and contractile enzymes in 18 bovine muscles. *Meat Science*. 18: 23-40.

- Torrescoano G., Sánchez-Escalante A., Giménez B., Roncalés P., Beltrán J.A. (2003). Shear values of raw samples of 14 bovine muscles and their relation to muscle collagen characteristics. *Meat Science*. 64: 85-91.
- Totland G.K., Kryvi H. (1991). Distribution patterns of muscle fibre types in major muscles of the bull (*Bos taurus*). *Anatomy and Embriology*. 184: 441-450.
- Tuma H.J., Venable J.H., Wulthier P.R., Henrickson R.L. (1962) Relation of fibre diameter to tenderness and meatiness as influenced by bovine age. *Journal of Animal Science*. 21: 33-38

ANEXO

PUESTA A PUNTO DE LA METODOLOGÍA PARA LA MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LACTATO DESHIDROGENASA

Uno de los primeros pasos a realizar en el presente trabajo, fue poner a punto la metodología para la medición de la enzima lactato deshidrogenasa que, hasta el momento, no se había realizado en el laboratorio de carne de la Universidad Politécnica de Valencia.

Se compararon dos metodologías, una de ellas de acuerdo con el método descrito por Ansay (1974), y otra de acuerdo con el método descrito por Bergmeyer y Bernt (1974). Ambas están basadas en el mismo fundamento y las diferencias entre ellas radican en la preparación del extracto, concentración de la muestra, temperatura de reacción y concentraciones en el medio de reacción.

Los músculos en los que se midieron las actividades fueron:

- *Psoas major* (PM) de vacuno, procedencia de un supermercado
- PM de la raza Avileña-Negra Ibérica (A-NI), procedencia del INIA,
- *Flexor digitorum* (FD) de vacuno, procedencia de un supermercado,
- FD de la raza A-NI, procedencia del INIA,
- *Longissimus dorsi* (LD) de porcino, procedencia de un supermercado,
- PM de conejo obtenido en la UPV a 15 minutos *post-mortem*,
- LD de conejo obtenido en la UPV a 15 minutos *post-mortem*

En la Tabla 6 se exponen los resultados de la metodología de acuerdo con el método descrito por Ansay (1974).

Tabla 6. Actividades enzimáticas medidas de acuerdo con el método descrito por Ansay (1974).

Músculo	Especie	Fecha	Dilución	Actividad LDH (μ moles NADH/min.g músculo)	
PM (supermercado)	Vacuno	10-7-07	1:60	209,83	
			1:30	192,10	
			Sin diluir	Se satura la reacción	
PM (INIA)		10-7-07	1:60	150,07	
		11-7-07	1:60	682,08	
		12-7-07	1:60	507,45	
FD (supermercado)	Vacuno	10-7-07	1:60	100,48	
			1:30	99,685	
FD (INIA)		10-7-07	Sin diluir	Se satura la reacción	
		10-7-07	1:60	89,056	
LD (supermercado)		Porcino	17-7-07	1:60	1371,3
				1:80	1235,9
LD (UPV)	Conejo	16-7-07	1:60	426,07	
		17-7-07	1:60	838,26	
PM (UPV)		16-7-07	1:60	445,67	

Con esta metodología se observó que no había repetibilidad en las medidas y los datos obtenidos de actividad LDH no se ajustaban a los resultados de la bibliografía. Gil *et al.*, (2003) obtuvieron valores más elevados en LD de cerdo (3200-3400 μ moles NADH/min.g músculo) así como Gondret *et al.* (2005) en PM de conejo (1200-1600 μ moles NADH/min.g músculo).

En la Tabla 7 se exponen los resultados de la metodología de acuerdo con el método descrito por Bergmeyer y Bernt (1974).

Tabla 7. Actividades enzimáticas medidas de acuerdo con el método descrito por Bergmeyer y Bernt (1974)

Músculo	Especie	Fecha	Dilución	Actividad LDH(μ moles NADH/min.g músculo)
LD (supermercado)	Porcino	18-7-07	1:60	La reacción se satura
			1:200	1602,00
			1:200	1592,49
LD (UPV)	Conejo	18-7-07	1:100	1270,73
PM (INIA)	Vacuno	18-7-07	1:200	Indicios de poco enzima en el extracto
			1:100	809,485
PM (INIA)		23-7-07	1:100	858,699
FD (INIA)		23-7-07	1:100	208,395
		24-7-07	1:100	238,942

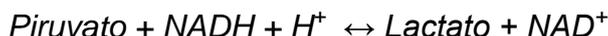
Con esta metodología sí hubo repetibilidad entre las medidas y los resultados están de acuerdo con los valores de la bibliografía.

Así pues, se utilizó la metodología descrita por Bergmeyer y Bernt (1974), la que se describe a continuación.

LACTATO DESHIDROGENASA

FUNDAMENTO

La enzima lactato deshidrogenasa cataliza la reducción del piruvato por NADH obteniéndose lactato y NAD^+ . La actividad enzimática se determina a partir de la velocidad de desaparición del NADH, medido a 340 nm.



MATERIAL

- Balanza de precisión
- Tubos de centrifuga
- Homogeneizador (Polytron) con eje delgado
- Centrífuga
- Espectrofotómetro (Shimadzu UV-1601 spectrophotometer) (30°C, 340nm)
- Cubetas para espectrofotómetro de poliestireno cristal de 1,5 ml
- Micropipetas

REACTIVOS

- | | |
|---|--------------------|
| - Na_2HPO_4 | PRS Panreac 141679 |
| - $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | MERK K91147745 938 |
| - Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA) | Panreac 131026 |
| - Trietanolamina (TEA) | SIGMA T1377 |
| - NADH (β -Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced disodium salt) | SIGMA N8129 |
| - Piruvato (Sodium pyruvate) | SigmaUltra/P8574 |

TAMPONES Y SOLUCIONES

♦ Tampón de extracción:

Solución 1 (cantidades para 500 ml):

Na_2HPO_4	0,1 M	7,099 g
EDTA	2 mM	0,372 g

Solución 2 (cantidades para 500 ml):

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1 M	7,8 g
EDTA	2 Mm	0,372 g

Tampón de extracción: Solución 1 + Xml de Solución 2 para ajustar el pH a 7

♦ Tampón de Cinética:

(Cantidades para 250 ml)

TEA	54,28 mM	2,022 g
EDTA	5,26 mM	0,489g

Ajustar el pH a 7,5 con HCl

♦ Soluciones a preparar el mismo día de la medición:**♦ Solución a:**

12,66 mg de NADH en 2ml de H₂O

♦ Solución b:

2ml de solución a en 48 ml de tampón cinético

♦ Solución c:

15,7 mg de Piruvato de sodio 9,5 mM en 15 ml de tampón cinético

PROCEDIMIENTO**Preparación del extracto muscular:**

1. Pesar 200 mg de tejido en tubos de centrifuga pequeños previamente numerados.
2. Añadir 5ml de tampón de extracción.
3. Homogeneizar la muestra en el Polytron. Lavar el tubo con 4 ml más de tampón de forma que se deposite en el interior del tubo.
4. Ajustar el volumen de tampón necesario hasta tener una dilución 50 del extracto (mg de muestra x 49 = volumen total de tampón; Volumen total = 9ml= ml necesarios)
5. Centrifugar a 6000 g durante 15 min a 4°C.
6. Tomar 5 ml del sobrenadante con pipeta Pasteur y filtrar a través de una capa fina de lana de vidrio.

Mantener el extracto en un recipiente con hielo picado durante todo el proceso.

Medición de la Actividad enzimática

Dilución del extracto muscular con tampón de extracción:

1:100 para el *Psoas major* y *Flexor digitorum* de Vacuno

1:200 para el *Longissimus dorsi* de Porcino y Conejo

Encender el espectrofotómetro y termostato un rato antes para que las lecturas se puedan realizar a 30°C

Poner dentro de cubetas pequeñas (1,5ml), por triplicado:

- 875 µl de Solución b

- 105 µl de Extracto

Introducir las cubetas en el carro del espectrofotómetro y añadir:

- 350 µl de Solución c

Lectura a 340 nm durante 8 minutos a T^a de 30°C (absorción decreciente de NADH)

Cálculo de la actividad enzimática

Actividad Enzimática = $\Delta DO/min \times 1,330 \times (1/0,105) \times 50 \times (1/6,22) \times$ factor de dilución de la muestra = Unidades enzimáticas en $\mu moles$ de NADH transformados por min y gr de músculo.

1,330 = volumen total de reacción dentro de la cubeta

0,105 = volumen de extracto

50 = dilución del extracto (ml tampón/g músculo)

Segunda dilución del extracto = 100 para *Psoas major* y *Flexor digitorum* de Vacuno y 200 para *Longissimus dorsi* de Porcino y Conejo