

El mecanismo de muerte celular programada y su importancia en el proceso de maduración de la carne bovina

Janeth Ortega Torres¹ / Manuel Fernando Ariza Botero²

Resumen

El objetivo de este artículo es presentar el mecanismo de muerte celular programada y las evidencias que apoyan su relación con el proceso de maduración de la carne bovina. La ternera de la carne bovina es quizá una de las características más importantes para los consumidores, pues hace de la carne un producto deseable en los mercados mundiales e influye en su precio y calidad. Estas características dependen de factores genéticos, nutricionales y ambientales. Aunque en Colombia aún no existe la cultura de la trazabilidad de los productos cárnicos en los supermercados, se prevé que en un futuro cercano aumente el número de consumidores en América Latina y que ellos tendrán también la posibilidad de exigir las mejores carnes. Descifrar los factores bioquímicos y moleculares que influyen en la maduración de la carne bovina es una tarea amplia que está en sus primeras etapas. Se han descifrado algunas vías implicadas, como la de la calpaína-calpastatina, la proteosómica y la de las catepsinas, proteínas que han sido reconocidas como de influencia positiva en el proceso de degradación de la fibra muscular durante su proceso de maduración. La conversión del músculo en carne es un proceso que comienza una vez el animal ha sido sacrificado y, por lo tanto, está asociado a los procesos de necrosis y muerte celular. En los últimos años muchos estudios se han orientado hacia la importancia y el aporte del mecanismo de muerte celular programada o apoptosis sobre la ternera de la carne.

Palabras clave: ternera, apoptosis, proteólisis, calpaína, calpastatina.

The Mechanism of Programmed Cell Death and its Importance in the Process of Beef Ripening

Abstract

The purpose of this paper is to present the mechanism of programmed cell death and the evidence supporting its relation to the ripening of beef. The tenderness of beef is perhaps one of the most important features for consumers, because it makes meat a desirable product in global markets and influences their price and quality. These features depend on genetic, nutritional and environmental factors. Although in Colombia there is still no culture of traceability of meat products in supermarkets, an increase in the number of consumers in Latin America is expected in the near future and they will also have the option of demanding the best meat. Deciphering the biochemical and molecular factors that influence the ripening of beef is a large task that is still in its early stages. Some pathways involved have been deciphered, such as the calpain-calpastatin, the proteasomal and that off cathepsins, proteins that

1 Bióloga. Magíster en Producción Animal. PhD en producción animal, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia.

✉ myriam.ortega@icbf.gov.co

2 Médico veterinario. PhD. Profesor Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia.

✉ mfarizab@unal.edu.co

have been recognized as a positive influence in the process of muscle fiber degradation during the ripening process. The conversion of muscle onto flesh is a process that begins once the animal has been sacrificed and, therefore, it is associated with the processes of cell death and necrosis. In recent years, many studies have focused on the importance and contribution of the programmed cell death mechanism or apoptosis on meat tenderness.

Keywords: Tenderness, apoptosis, proteolysis, calpain, calpastain.

O mecanismo de morte celular programada e sua importância no processo de maturação da carne bovina

Resumo

O objetivo deste artigo é apresentar o mecanismo de morte celular programada e as evidências que apoiam sua relação com o processo de maturação da carne bovina. A maciez da carne é talvez uma das características mais importantes para os consumidores, pois faz da carne um produto desejável nos mercados mundiais e influi no seu preço e qualidade. Estas características dependem de fatores genéticos, nutricionais e ambientais. Embora na Colômbia ainda não exista uma cultura da rastreabilidade dos produtos de carne nos supermercados, espera-se que no futuro próximo aumente o número de consumidores na América Latina e eles também terão também a possibilidade de exigir melhores carnes. Decifrar os fatores bioquímicos e moleculares que influem na maturação da carne bovina é uma tarefa ampla que está em seus estágios iniciais. Foram decifradas algumas vias envolvidas, tais como as da calpaína-calpastatina, a proteassômica e a das catepsinas, proteínas que foram reconhecidas como de influência positiva no processo de degradação da fibra muscular durante seu processo de maturação. A conversão do músculo em carne é um processo que começa quando o animal é sacrificado e, portanto, está associado com os processos de necrose e morte celular. Nestes últimos anos muitos estudos se concentraram na importância e na contribuição do mecanismo de morte celular programada ou apoptose sobre a maciez da carne.

Palavras chave: maciez, apoptose, proteólise, calpaína, calpastatina.

INTRODUCCIÓN

La ternera es uno de los principales atributos sensoriales de calidad de la carne. Aunque el término calidad es complejo (1), el concepto más extendido es el que la define como la “adecuación al uso”, es decir, la capacidad de un producto para satisfacer las expectativas de los consumidores (1).

Existen diferentes parámetros o atributos indicadores de calidad de la carne como son: el pH, el color, el contenido de pigmentos, la flora bacteriana, la capacidad de retención de agua, la composi-

ción química y energética, los niveles de oxidación lipídica, las propiedades de textura y los atributos sensoriales como olor, gusto y aromas percibidos durante la masticación (1), los cuales están relacionados entre sí, para en su conjunto proporcionar las características integrales de calidad de la carne.

Aunque existen criterios diferentes entre los consumidores en cuanto a algunos de los parámetros anteriores, la preferencia por una carne tierna es consistente en todos los ámbitos de producción y comercialización. No obstante la importancia comercial de la ternera, la inconsistencia en la predicción

de la misma constituye un problema relevante de la industria de la carne, e incluso se considera un rasgo altamente variable y complejo para tenerlo en cuenta dentro de los programas de mejoramiento genético (2).

La gran variación de la terneza de la carne bovina se debe a que esta característica está determinada en parte por la constitución genética del animal, en donde pueden estar involucrados múltiples genes y complejas interacciones entre ellos, más el influjo de las condiciones medioambientales durante la cría-engorde del animal, y particularmente el manejo pre y post mórtem.

El aporte al conocimiento de estas características es actualmente apoyado por las nuevas tecnologías en genómica, proteómica y metabolómica, las cuales pretenden incluir todos los componentes que faciliten el conocimiento de las características de calidad de la carne.

La terneza se puede definir como “la manifestación sensorial de textura del alimento y la forma de reaccionar de esta frente a la aplicación de fuerzas” (3, 4). Puede ser medida por diferentes métodos, uno de los más utilizados es el que utiliza el corte en una celda de Warner Bratzler, que mide la fuerza para cortar un trozo de carne con una cuchilla de borde romo. La terneza está determinada por múltiples fuentes de variación, las cuales pueden atribuirse a diferencias en raza, sexo, alimentación y peso, y a factores asociados al proceso de maduración, los cuales determinan tanto la integridad de la arquitectura de estructuras como los sarcómeros, la matriz extracelular y la grasa intramuscular, así como de la actividad de las enzimas proteolíticas sobre proteínas miofibrilares, que quizá pueden explicar la mayor parte de las variaciones de la calidad de la carne madura (4).

MECANISMOS BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES QUE PARTICIPAN EN LA TRANSFORMACIÓN DEL MÚSCULO EN CARNE

El proceso de conversión de músculo en carne se puede dividir en tres etapas: 1) Fase *prerigor*, durante la cual el músculo aparece todavía excitable (5); 2) Fase *rigor*, cuando los componentes energéticos de las células se agotan (ATP, fosfocreatinina y glucosa); 3) Fase *posrigor*, en donde ocurre una desorganización de la estructura muscular. Una vez el animal es sacrificado se produce un descenso rápido e inesperado de los nutrientes y oxígeno en todas las células del organismo, lo que lleva a que el músculo comience a procesar las reservas de glucógeno para sintetizar ATP, produciéndose un cambio del metabolismo aeróbico por metabolismo anaeróbico. A medida que se va reduciendo la producción de ATP, se genera fosfato inorgánico, lo que estimula la degradación de glucosa a piruvato. Esta ruta, en ausencia de oxígeno, continúa hasta la formación y acumulación de ácido láctico, lo que genera la caída del pH celular, este descenso gradual del pH es un activador de algunas de las proteínas que intervienen en la desarticulación de la estructura de las proteínas musculares o proteínas que participan en el proceso de muerte celular programada, y también de la inactivación de proteínas que intervienen en el mantenimiento y metabolismo de la fibra muscular (6).

Cuando se agotan definitivamente las reservas de nutrientes musculares, y no hay más producción de ATP, las bombas de Ca^{++} , Na^+ y K^+ , dependientes de ATP, ya no funcionan más y, por tanto, se produce una lenta y progresiva despolarización de las membranas celulares. Una vez liberado el calcio en el espacio miofibrilar, este reacciona con la troponina modificando su configuración, como consecuencia

se une al extremo de la cabeza de la actina, dando lugar a una unión irreversible entre ambas proteínas. De esta forma, los filamentos finos de la fibra muscular son trasladados sobre los gruesos, lo que produce un acortamiento del músculo. La formación de actina-miosina da lugar a una tensión y rigidez muscular que conduce a la instauración del *rigor mortis* (7). Es allí donde comienza la etapa de maduración de la carne por parte de las enzimas proteolíticas endógenas que actúan sobre la miofibrilla muscular.

PRINCIPALES SISTEMAS PROTEOLÍTICOS IMPLICADOS EN LA MADURACIÓN

Uno de los mecanismos mejor conocidos e implicados directamente en el proceso post mórtem de maduración de la carne es el mediado por enzimas proteolíticas. Aunque existe aún debate y controversia sobre la activación, función y diferentes tipos de polimorfismos de las proteínas que pueden participar en la maduración, se pueden reconocer cinco sistemas proteolíticos sobre los cuales se han centrado los estudios de maduración: 1) el sistema de las calpaínas; 2) el sistema de las catepsinas; 3) el sistema del proteosoma; 4) el sistema de las Caspasas; 5) el sistema de las metaloproteínas.

Sistema de calpaínas

Las calpaínas son proteínas heterodiméricas, dos de las cuales son ubícuotas (calpaína m y m) y otra con expresión exclusiva en las células musculares (calpaína 3 -p94). Son enzimas citosólicas, independientes de ATP, y producen *in vivo* los cambios observados en las miofibrillas, siendo capaces de alterar la densidad de la línea del disco Z. Las calpaínas m y m parecen ser las que están directamente implicadas en el inicio de la proteólisis de proteínas de las miofibrillas como la titina y la nebulina,

y también de la desmina, constituyente principal de los filamentos intermedios. Algunos autores (8) sugieren que son las responsables del 95% de degradación inicial de las proteínas, y que catalizan la ruptura de proteínas de los miofilamentos haciéndolos disponibles al proteosoma y las enzimas lisosomales que completarían su degradación. Aún no está muy claro el papel que juega la calpaína 3 en la maduración. Parr et ál. (9) no encuentran asociación entre la terneza y la expresión de calpaína 3 (9). Sin embargo, Ilan (10) encontraron correlaciones significativas entre el ARN mensajero y la expresión de calpaína 3 con la terneza de carne en ovinos (10). Las calpastatinas son los inactivadores endógenos de las calpaínas. Las calpastatinas son degradadas en el músculo post mórtem, existiendo evidencias de que esa degradación es llevada a cabo por las calpaínas (11).

Sistema de catepsinas y su inhibidor, las cistatinas

Las catepsinas son una familia de endo y exopeptidasas localizadas principalmente en los lisosomas, que se activan a pH ácidos (entre 3,5 y 6,5). En el músculo se encuentran las catepsinas de tipo: B, L, H, S F, K y D (12). Su principal papel dentro del proceso de maduración de la carne radica en que durante las primeras 24 horas post mórtem ocurre una ruptura lisosomal y liberación de todas las enzimas de su interior. Existen evidencias experimentales de que estas enzimas catalizan la proteólisis de proteínas como troponina T, I y C, nebulina, titina y tropomiosina, además de sus sustratos preferenciales actina y miosina (13).

Las cistatinas son un grupo de inhibidores de papainas y catepsinas. En condiciones *in vivo* están localizadas en el citoplasma, de modo que impiden la acción de las catepsinas fuera del lisosoma. En el músculo post mórtem, cuando el lisosoma

es destruido, el desbalance entre enzima-inhibidor será el que determine la acción de las catepsinas sobre la terneza de la carne (14).

El sistema del proteosoma

Es un complejo proteolítico multicatalítico (26S) que se encarga de destruir proteínas dañadas y de controlar la concentración de determinadas proteínas necesarias para los procesos celulares (15). Las proteínas que serán destruidas por el complejo del nucleosoma son previamente marcadas mediante la agregación de una cadena de ubiquitina, lo cual permite su reconocimiento. En el músculo post mórtem, una vez se acaba el ATP circundante, el proteosoma se disocia en dos fracciones: una de 20S y otra de 19S. La subunidad de 20S no requiere de ATP, ni de ubiquitina, por lo que apoya la hipótesis de que esta unidad puede participar en la degradación de las líneas Z y M de las miofibrillas (15).

Caspasas

Las caspasas son una familia de cisteína-proteasas que no requieren calcio y que se caracterizan por su capacidad para degradar proteínas a nivel de residuos específicos de ácido aspártico, luego de sufrir varias modificaciones postraduccionales. Participan como efectoras del proceso de muerte celular programada, en donde actúan sobre las proteínas de la membrana celular y del citoesqueleto tales como vimentina, desmina y espectrina disminuyendo su integridad, lo que produce un aumento en los niveles de calcio intracelular, degradación de la calpastatina y activación de la calpaína, promoviendo la degradación de proteínas de la miofibrilla (16).

Metaloproteinasas

Las metaproteínas de matriz (MMP) pertenecen a una familia de proteasas dependientes de Zn^{++} , que

están involucradas en el recambio de la matriz extracelular (17). La importancia dentro del proceso de conversión de músculo en carne radica en su capacidad para la degradación de la matriz de tejido conectivo, la degradación de diferentes tipos de colágenos y de proteínas que conectan el sarcolema con la matriz extracelular, los diotroglicanos asociados a la membrana y las placas musculares (18).

PROCESO DE MUERTE CELULAR PROGRAMADA

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso fisiológico que juega un papel importante en el desarrollo y el mantenimiento de la homeostasis tisular de los organismos. Fue inicialmente descrita por Kerr en el año 1972 (19), sin embargo, el primer reporte de que las células mueren naturalmente fue publicado por Carl Vogt hacia 1842 (20). La palabra apoptosis se refiere a la caída programada de las hojas de los árboles durante el otoño, en donde *apo* hace referencia a distancia y *ptosis* a caída (21).

La apoptosis es un proceso evolutivamente conservado, se presenta tanto en organismos unicelulares como multicelulares. Fue inicialmente clarificado en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, en donde se encontró que de 1090 células somáticas del nemátodo, 131 sufren muerte celular (22); además, utilizando el mismo modelo animal también se describió la función de las proteínas efectoras de dicho proceso (las caspasas). Este proceso se caracteriza por ser ordenado, secuencial y estrictamente regulado, su desregulación puede producir diferentes tipos de patologías como desórdenes neurológicos, autoinmunes y cáncer (23).

Durante la muerte celular programada se pueden evidenciar una serie de cambios de la morfología celular como: la condensación de la cromatina

nuclear, la reducción del tamaño celular y la aparición de protuberancias en la membrana plasmática, cambio conocido como *blebbing* (19, 24). De otra parte, se presentan una serie de procesos bioquímicos característicos como la degradación del ADN nuclear mediada por endonucleasas que producen fragmentos de tamaño entre 80 y 200 pb (24); cambios en la distribución de la fosfatidilserina (PS) (25), la cual normalmente se encuentra en la parte interna de la membrana plasmática pero durante el proceso apoptótico se expone en la superficie celular; liberación de la endonucleasa CAD (caspasa-activated DNAs) de su inhibidor iCAD debido a que este es degradado por las caspasas (26). Al final del proceso, el contenido celular se empaqueta en los llamados “cuerpos apoptóticos” (27) que envían señales químicas a las células vecinas y a los macrófagos para ser reconocidas y fagocitadas.

Vías apoptóticas

Existen dos vías principales por las cuales se puede disparar el mecanismo de muerte celular programada: 1) la generada por señales celulares dentro de la célula activada cuando se inducen daños oxidativos en la mitocondria (28), y 2) inducción de la apoptosis por medio de activadores de muerte celular que se unen a receptores específicos en la membrana celular.

En mamíferos existe un gran número de señales que inducen estas vías. Las vías extrínsecas se activan por estímulos apoptóticos externos a la célula y se inician por la unión de ligandos inductores de muerte a sus respectivos receptores localizados en la superficie de la célula.

La vía intrínseca es activada por señales al interior de la célula como daño en el ADN inducido por radiaciones o agentes químicos; escasez de factores

de crecimiento que actúan como señales de regulación de muchos genes, o estrés oxidativo. Estas señales al interior de la célula inician la muerte celular programada por la vía intrínseca, en donde la mitocondria juega un papel muy importante (29).

Las vías extrínsecas e intrínsecas son ejecutadas por una serie de proteínas conocidas como caspasas, que a su vez activan con otra serie de proteínas y nucleasas; luego de que la señalización ha sido reconocida se producen las alteraciones morfológicas y químicas mencionadas anteriormente y finalmente la muerte celular (19). Sin embargo, también existe la posibilidad de que se ejecute muerte celular sin mediación de las caspasas (30).

Moléculas de la apoptosis

Existen básicamente dos tipos de moléculas que regulan la apoptosis, codificadas por dos tipos de genes: genes que promueven la apoptosis: *bax*, *bcl-xs*, *caspasas* y *fas*, y genes que la regulan negativamente: *bcl-2* y *bcl-xl*, y la familia de proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP) (31).

Principales moléculas de la ruta de señalización de la apoptosis

Moléculas efectoras: las caspasas

Las caspasas son peptidasas ricas en cisteína con un sitio estricto de clivaje para un residuo de ácido aspártico (Asp o D). Las caspasas son sintetizadas como formas inactivas y sufren un proceso de regulación postraduccional que implica la modificación de una forma larga inactiva a una forma corta activa. Todas poseen un prodominio seguido de un dominio activo y otro inhibidor que, al cortarse por un proceso autocatalítico, convierte a la procaspasa en su forma activa. La forma activa es un tetrámero compuesto por dos subunidades grandes (20 kDa)

y dos subunidades pequeñas (10 kDa) (32). Se han identificado 14 caspasas en mamíferos y han sido clasificadas en tres clases dependiendo de su función (33):

Caspasas inflamatorias: este grupo incluye a las caspasas 1-4-5-11-12-13-y 14 que están implicadas en la inflamación, importantes para la maduración de las citoquinas proinflamatorias.

Caspasas apoptóticas iniciadoras: las caspasas 8 y 10 se caracterizan por poseer un largo prodominio en donde está localizado un dominio efector de muerte celular (*DED death effector domain*); mientras que las caspasas 2 y 9 poseen un dominio de reclutamiento y activación de caspasas (*CARD caspase activation and recruitment domain*), y permiten la interacción con moléculas adaptadoras. Estas caspasas iniciadoras procesan y activan a las proteasas efectoras.

Caspasas apoptóticas ejecutoras: en este grupo se encuentran las caspasas 3, 6 y 7 que tienen un prodominio corto y participan en la proteólisis de múltiples sustratos cuyas modificaciones ponen de manifiesto los diferentes cambios morfológicos y químicos característicos de la apoptosis.

Las caspasas son inhibidas por una serie de moléculas que bloquean su acción y por tanto la apoptosis. Muchas de las proteínas inhibidoras han sido reconocidas en virus, los cuales las utilizan como mecanismo para bloquear la muerte de células infectadas (34). La mayoría de los inhibidores son conocidos como IAP (*inhibitor of apoptosis protein*), los cuales se pueden unir tanto a las procaspasas como a las caspasas inhibiendo su acción. Algunas de las proteínas proapoptóticas liberadas por las mitocondrias derivadas de la activación de la vía intrínseca actúan sobre estos inhibidores para, de esta manera, permitir el proceso apoptótico.

Receptores de muerte celular: Familia TNF-R

Los receptores de muerte celular son un grupo de proteínas que participan activamente en recibir señales externas y que activan vías intrínsecas para permitir procesos como proliferación, supervivencia, diferenciación o muerte celular. Su función dentro del proceso de apoptosis se soporta en que estas proteínas tienen un dominio de muerte celular en el espacio intracelular que recluta otras proteínas inductoras del proceso apoptótico. Receptores como TNF-R o CD95 (*cytotoxicity-dependent protein 95*) se activan por ligandos estrechamente relacionados entre sí y que pertenecen a la familia de ligando TNF (*factor de necrosis tumoral*) que pueden activar genes como NF- κ B y Jun quinaza (35). En general pertenecen a la familia de TNF (factores de necrosis tumoral) y se pueden reunir en tres grandes grupos: Fas, TNF-R y TRAIL.

Proteínas adaptadoras

Estas moléculas permiten el contacto de los receptores de muerte celular con las caspasas y las proteínas de la familia Bcl-2, estas asociaciones son permitidas gracias a los dominios de muerte celular (DD), el dominio efector de muerte (DED) y el dominio de reclutamiento de caspasas (CARD) (36).

Las moléculas adaptadoras más conocidas son FADD/MORT 1 (*Fas-associated death domain protein/mediator of receptor-induced toxicity*), RIP (*receptor-interacting protein*), estas dos moléculas adaptadoras interaccionan con la superfamilia de receptores TNF-R y TRADD (*TNF-R1-associated death domain protein*) (37).

Proteínas de la familia Bcl-2

Corresponden a una familia de proteínas con cuatro dominios (BH) relativamente conservados.

Existen alrededor de 20 miembros de esta familia y pueden ser divididos en dos grupos: las proteínas antiapoptóticas, que incluyen Bcl-2, Bcl-xl, Bclw, A1, Mcl-1, Boo/Diva y NR13 y promueven la supervivencia celular, y las proteínas proapoptóticas, de las cuales se conocen dos grupos: en el primer grupo se encuentran las proteínas que comparten tres dominios BH con Bcl-2, dentro de este están las proteínas Bax, Bak y Bok; y otro grupo con proteínas que contienen solo un dominio BH (*BH-3 only* o *BID*), el cual parece fundamental para la inducción de la apoptosis, dentro de este grupo se encuentran las proteínas Bid, Bad y Bim. Estos dos grupos de proteínas son necesarios para inducir apoptosis por la vía intrínseca (38).

Activación por la vía extrínseca

La activación de la muerte celular programada por la vía extrínseca es un complejo proceso en donde interactúan aunada y ordenadamente todas las moléculas mencionadas. En respuesta a una señal extrínseca, los receptores de muerte interactúan a través de su dominio citoplasmático de muerte (DD) con el DD homólogo de las proteínas adaptadoras. Estas moléculas adaptadoras comunican los receptores de muerte con las caspasas y con algunos de los miembros de la familia BCL-2 a través de los dominios DD, DED y el dominio de reclutamiento de las caspasas. La señalización vía receptores FAS es una de las mejor descritas, una vez se han unido los dos DD —el del receptor y el de la proteína adaptadora— se forma el complejo FADD, el dominio DED interactúa con las procaspasa 8 (y en algunos casos 10) formando el complejo de señalización inductor de muerte DISC (*death-inducing signaling complex*). A partir de este punto, el proceso apoptótico puede seguir dos rutas alternativas: una implica la activación directa de otras caspasas (en células de tipo 1), mientras que en las otras células de tipo 2 se requiere la intervención

de la mitocondria, convergiendo con la vía intrínseca.

En las células de tipo 1, la activación de la caspasa 8 o 10 va seguida de la activación de las efectoras, incluyendo las caspasas 3, 6 y 7 que actúan como efectoras de la muerte celular. En las células de tipo 2 se da una interacción entre las vías apoptóticas extrínsecas e intrínsecas, mediada por la proteína *BH3 only* (36), esta proteína reside en el citosol como un precursor inactivo, pero después de la activación de la vía extrínseca es procesado por la caspasa 8 para producir un fragmento C-terminal de 15kDa, t Bid que se trasloca a la mitocondria y facilita la activación, inserción y oligomerización de Bax en la membrana mitocondrial externa formando un canal que algunos autores han denominado MAC (*mitochondrial apoptosis-inducing channel*) (39).

Activación por la vía intrínseca

Las vías extrínsecas se inician por diversos estímulos apoptóticos que provienen del interior de la célula y convergen en las mitocondrias (que participan como un regulador central de las apoptosis por vía intrínseca). Diversas modificaciones en la membrana mitocondrial permiten la liberación de diferentes moléculas que interactúan de forma ordenada y altamente precisa para llevar la apoptosis.

La permeabilización de su membrana externa (*MOMP, mitochondrial outer membrane*) es un evento determinante para esta vía (39) y está mediado y controlado por los miembros de la familia Bcl-2, durante este evento se liberan moléculas proapoptóticas del espacio intermembrana tales como: citocromo c, se considera como uno de los eventos más importantes para proseguir el proceso, una vez liberado el citocromo al citoplasma, la apoptosis no tiene reverso; un componente de la cadena de transporte electrónico, HtrA2/Omi, una serin pro-

teasa, Smac/Diablo (*second mitochondrial derived activator of caspase*), AIF (*apoptosis inducing factor*), Endonucleasa G. AIF se transloca al núcleo, donde desencadena cambios nucleares independientes de caspasas, causando condensación de la cromatina nuclear y fragmentación del ADN. La endonucleasa G induce fragmentación de ADN inter cromosomal, también de un modo independiente de la activación de las caspasas. Smac/Diablo activa apoptosis neutralizando la actividad de las proteínas inhibitoras de apoptosis (IAPs), HtrA 2/Omi también actúa uniéndose a las proteínas IAP inhibiendo su acción (39).

LA APOPTOSIS Y EL PROCESO DE MADURACIÓN DE LA CARNE BOVINA

Dos de los mecanismos de muerte celular reconocidos como relacionados con el proceso de maduración de la carne son: la apoptosis y la necrosis. Después del sacrificio hay una muerte generalizada del animal y se reconocen muchos de los aspectos que están asociados al proceso de maduración de la carne. Sin embargo, el efecto de la muerte celular sobre estos procesos y su rol aún no han sido bien entendidos.

Estos dos términos se refieren a muerte celular dentro de los contextos patológicos o fisiológicos. Necrosis es la muerte celular causada por un daño irreversible a la célula, acompañado por una reacción inflamatoria, en donde se liberan factores quimiotácticos que hacen que se muevan leucocitos al lugar de la lesión y las células son removidas por fagocitosis. En contraste, la apoptosis es un proceso ordenado, altamente regulado y dependiente de ATP.

Existen evidencias experimentales que apoyan de manera decisiva la hipótesis de que el proceso de apoptosis tiene lugar durante las primeras horas

post mórtem. Durante esta etapa tienen lugar en las células musculares algunos eventos tales como la reducción de la energía celular, la caída del pH y la temperatura, la acumulación de lactato y liberación de calcio, en donde cada uno de estos factores puede favorecer la activación de la muerte celular programada, por cualquiera de las vías. A continuación se relacionan algunos eventos llevados a cabo durante la maduración de la carne y cómo ellos podrían activar la apoptosis, como una manera de apoyar la hipótesis de que este proceso ocurre durante las primeras horas una vez sacrificado el animal y, por lo tanto, puede ser importante en el proceso de maduración de la carne.

Efecto de ATP sobre la apoptosis: el análisis de resultados sobre los requerimientos de ATP para los procesos de apoptosis y de necrosis, en diferentes modelos celulares, revelan que las células sufren uno u otro evento de muerte celular dependiendo de la disponibilidad de ATP. En condiciones de disponibilidad de ATP se da apoptosis, cuando los niveles de ATP decaen la células sufren necrosis. Además, la ausencia de glucosa induce un estrés oxidativo y dispara algunas vías de señalización asociadas a Bax que incluye la activación de señales de quinazas; la hipoxia regula la estabilización de p53 permitiendo un incremento en apoptosis asociada a p53 (40).

Efecto del pH sobre la apoptosis: Shrode et ál. (41) analizaron el rol del pH sobre la apoptosis y encontraron que los ambientes ácidos son necesarios para la activación de las DNAsas responsables para la fragmentación del ADN que ocurre durante el proceso de apoptosis (41). Evidencias que provienen del análisis de la modificación *in vitro* del pH en células cancerosas han demostrado que una caída del pH de entre 0,3 y 0,4 unidades induce la apoptosis (42). Los cambios intracelulares de pH en linfocitos del timo pueden actuar como

un marcador que diferencie las células que mueren por apoptosis (pH 7,2 a 6,87/90 min) y necrosis (pH 7,2 a 7,5/90 min) (43).

Efecto de iones de calcio sobre la apoptosis: la liberación de iones de calcio del retículo endoplasmático y su acumulación en la mitocondria juegan un papel muy importante dentro de la activación del proceso apoptótico. Existen varias vías de liberación de iones Ca^{++2} , siendo una de ellas a través de receptores 1, 4, 5 trifosfato inositol (IP3R) (44). Los iones de calcio actúan sobre la mitocondria y causan la liberación de citocromo C, lo cual activa la caspasa 3 permitiendo un punto de no retorno para el proceso de apoptosis. En las células musculares los iones de calcio son liberados del retículo sarcoplasmático desde diferentes canales de calcio denominados receptores de rianodina (44). De acuerdo con McConkey (44), los iones de calcio se incrementan entre 200 y 400 nmoles en las células apoptóticas, en comparación con las células necróticas en donde los niveles no se incrementan más de 1 mmol.

Efecto del estímulo eléctrico sobre la apoptosis: en la industria cárnica es bien conocido que los estímulos eléctricos sobre la carcasa aceleran la caída del pH, incrementan la liberación de iones de Ca^{++2} y, por lo tanto, la proteólisis del músculo permitiendo una maduración de la carne. Un pulso eléctrico con una intensidad de entre 200 y 250 V/cm puede disparar el proceso de apoptosis en células cancerosas (45) activando la liberación de calcio intracelular. Estudios realizados por Beebe et ál. (46) revelaron que pulsos eléctricos de 300 KV/cm por 10-300 nanosegundos causan apoptosis de células tumorales en cultivo, evidenciados por fragmentación del ADN y activación de la caspasas (46).

En general, se puede concluir que en circunstancias post mórtem las condiciones celulares se modifican. Se disminuye el pH celular y aumentan

los niveles de algunos iones, como los iones de calcio. En consecuencia, se produce activación directa o indirecta de una serie de proteínas proteolíticas, activación de proteínas que participan en el proceso de muerte celular como las caspasas, lo que contribuirá a una aceleración del proceso apoptótico.

GENES RELACIONADOS Y HEREDABILIDAD DE LA TERNEZA

La heredabilidad de las características de calidad en la carne tiene un valor moderado, tendiendo a aumentar cuando se utilizan mediciones bioquímicas, como por ejemplo la actividad de la calpaína. De acuerdo con Marshall (47), el contenido de grasa intramuscular tiene una heredabilidad de 0,54, la de la terneza es de 0,22, la resistencia al corte 0,25, la fragmentación de las miofibrillas 0,39 y la actividad de la calpastatina 0,43 (47).

Existen otros factores que afectan la fibra muscular, y por ende la terneza de la carne bovina, como la cantidad de miofibrillas para la cual se reporta una heredabilidad de 0,22, y el diámetro de la miofibrilla cuya heredabilidad estimada fue 0,74 en el músculo *longissimus dorsi* (48).

En cuanto a los genes que han sido reportado asociados con terneza, en un estudio de la expresión diferencial de genes en el músculo de ganado Charolais, mantenido bajo rigurosos controles experimentales, y cuyas características sensoriales fueron evaluadas por paneles de expertos altamente entrenados, se obtuvo que 215 genes fueron expresados diferencialmente en relación con características de tipo sensorial como la terneza, la jugosidad y el sabor. De estos, 29 genes muestran asociación con terneza específicamente. La mayoría de ellos estuvieron sobreexpresados en el músculo de los animales estudiados. Otros genes tales como DNAJA1,

HSPB1 y CRYAB se expresan muy poco en carnes de alta terneza. El gen DNAJA1 mostró correlación altamente significativa entre su baja expresión y terneza (49). Los autores postulan que los bajos niveles de expresión de proteína codificada por este gen son útiles como indicadores de terneza, lo cual fue patentado.

El gen DNAJA1 codifica para una proteína de choque térmico que interactúa con otra proteína de choque térmico denominada Hsp70, y juntas juegan un papel importante en el plegamiento de proteínas y el transporte de las mismas hacia la mitocondria. El complejo DNAJA1/Hsp70 inhibe la apoptosis debido a que previene el transporte hacia la mitocondria de la proteína proapoptótico Bax, de esta manera contribuiría a retardar la apoptosis y, por tanto, a retardar la muerte celular durante la conversión del músculo en carne (49).

De otra parte, el producto de expresión del gen HSPB1 corresponde a otra proteína de la familia de proteínas de choque térmico denominada Hsp27, la cual parece estar involucrada en la resistencia al estrés, y contribuye con la organización de las fibras de actina. Si existe una baja expresión de este gen, se produce poca proteína Hsp27 por lo que se favorecería la desorganización y degradación de la actina, lo que contribuiría con la terneza (49).

Finalmente, el gen CRYAB codifica para una proteína denominada cristalino, la cual comparte

homología con la proteína Hsp27. Esta proteína puede tener un rol importante en prevenir la formación de los filamentos intermedios, en cuyo mecanismo de formación participan otras proteínas tales como la desmina (49).

CONCLUSIONES

La industria de la carne necesita un producto de mejor calidad. La terneza es una de las características más deseadas por el consumidor y, por lo tanto, el realizar esfuerzos en investigación que conduzcan a obtener carnes de bovino más tiernas redundará en beneficios económicos importantes.

La apoptosis es un proceso de muerte celular altamente ordenada, estrictamente regulada y dependiente de ATP. Recientes evidencias experimentales demuestran que este proceso puede jugar un papel importante para la maduración de la carne dentro de las primeras 24 horas luego del sacrificio del animal. Al ser un proceso en donde intervienen diversos factores proteínicos se puede pensar en qué diferencias en la expresión y variantes de estos pueden hacer el proceso más eficiente y rápido. De tal manera que se hace necesario realizar estudios tendientes a determinar cuáles de estos factores son indispensables dentro del proceso post mórtem, y cómo las diversas variantes pueden afectar el proceso en general.

REFERENCIAS

1. Sierra V, Fernández-Suárez V, Castro P, Osoro K, Rodríguez-Colunga MJ, Vega-Naredo I, García-Macía M, Coto-Montes A, Oliván M. Tenderización post-mortem de la carne de los distintos biotipos amparados por la IGP ternera asturiana. Arch Zootec. 2011; 60 (231): 333-6.
2. Soria LA, Corva PM. Factores genéticos y ambientales que determinan la terneza de la carne bovina. Arch Latinoam Prod Anim 2004;12(2):73-88.
3. Szczenesiak AS. Objective measurements of food texture. Journal of Animal Science 1963;28:410.

4. Koohmaraie, M. The biological basis of meat tenderness and potential genetic approaches for its control and prediction. *Proc Annu Meat Conf* 1995;48:69.
5. Sentandreu MA, Coutis G, Ouali A. Role of muscle endopeptidases and their inhibitor in meat tenderness. *Trends in Food Science and Technology* 2002;13(12):400-421.
6. Ouali A. Proteolytic and physicochemical mechanisms involved in meat ovine skeletal muscle. *Biochimie* 1992;74:251-265.
7. Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2002;18:637.
8. Gregorio CC, Granzier H, Sorimachi H, Labeit S. Muscle assembly: a titanic achievement. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:18.
9. Parr T, Sensky PJ, Scothern GP, Bardsley RG, Buttery PJ, Wood JD et al. Relationship between skeletal muscle-specific calpain and tenderness of conditional porcine longissimus muscle. *Journal of Animal Science* 1999; 77:661-668.
10. Ilian MA, Morton JD, Kent MP, Le Couteur CE, Hickford J, Cowley R, Bickerstaffe R. Intermuscular variation in the tenderness: association with the ubiquitin and muscle specific calpains. *Journal of Animal Science* 2000;72:122-132.
11. Delgado EA, Greessink GH, Marchello JA, Goll DE, Koohmaraie M. The calpain system in three muscles of normal and callipyge sheep. *Journal of Animal science* 2001;79:398-414.
12. Turk B, Turk D, Turk V. Lysosomal cysteine proteosomas: more than scavengers. *Biochimica Biophysica Acta* 2000;1477:98-111.
13. Mikami K, Whiting AH, Taylor MAJ, Maciewicz RA, Etherrinton DJ. 1987. Degradation of miofibrils from rabbit, chicken and beef by cathepsin 1 and lysosomal lysotes. *Meat Science* 1987;21:81-97.
14. Schackelefor SD, Koohmaraie M, Wheeler TL, Cundiff LV, Dikeman ME. Effect of biological type of cattle on the incidence of the dark, firm and dry condition in the longissimus muscle. *Journal of Animal Science* 1994;72:337-343.
15. Taylor RG, Tassy C, Briand M, Robert N, Briand Y, Ouali A. Proteolytic activity of the proteasome on myofibrillar structure. *Molecular Biology Report* 1995;21:71-73.
16. Ouali A, Talmat A. Calpains and calpastatin distribution in bovine, porcine and ovine skeletal muscle. *Meat Science* 1990;28:331-348.
17. Yamada H, Saito F, Fukuta-Ohi H, Zhong D, Hase A, Okuyama A et al. Processing of beta-dystroglycan by matrix metalloproteinase disrupts the link between the extracellular matrix and cell membrane via the dystroglycan complex. *Human Molecular Genetics* 2001;10:1563-1569.
18. Frisdal E, Teiger E, Lefaucher JP, Adrial S, Planus E, Lafuma C, D'ortho MP. Increases expression of the gelatinases and alteration of basement membrane in rat soleus muscle following femoral artery ligation. *Neuropathology and applied Neurobiology* 2000;26:11-21.
19. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26(4):239-257.
20. Clarke PGH, Clarke S. Historic apoptosis. *Nature* 1995;378:230.
21. Ouli A, Herrera-Mendez CH, Coulis G, Becila S, Boudjellal A, Harhoura K et al. Meat tenderisation and muscle cell death, two highly relate events. *Technologija mesa* 2007;48(1-2):1-15.
22. Sulston JE, Horvitz HR. Post-embryonic cell lineages of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol.* 1997; 56:110-56.
23. Nicholson W. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* 2000;407:810-816.
24. Wyllie AH. Glucocorticoid-induce thymocyte apoptosis in associate with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980;284(5756):555-556.

25. Fadok V, Henson PM. Apoptosis: getting rid of the bodies. *Curr Biol* 1998;8(19):R693-695
26. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998;391(6662):43-50.
27. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of the cell death. *Nature* 2000; 407(6805):784-788.
28. Barisic K, Petrik J, Lada R. Biochemistry of apoptotic cell death. *Acta pharm* 2003; 53;151-164.
29. Green DR, Evan GI. A matter of the life death. *Cancer Cell* 2002;1(1):19-30.
30. Leist M, Jäättelä M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanism. *Nature Review- Molecular Cell Biology* 2001;2.
31. Goldsby RA, Kindt TD, Osborne BA, Kuby J. Immunology. 5th ed. New York: WH Freeman and Company; 2003.
32. Walker NP, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bump NJ, Ferenz CR, Franklin S, Ghayur T, Hackett MC, Hammill LD. Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell* 1994; 78(2): 343-352.
33. Nicholson DW, Thornberry NA. 1997. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 1997;22(8):299-30.
34. Irusta PM, Chen YB, Hardwick JM. Viral modulators of cell death provide new links to old pathways. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15(6): 700-705.
35. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997;88(3):355-365.
36. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998;281(5381):1305-1308.
37. Boldin MP, Varfolomeev EE, Panczer Z, Mett IL, Camonis JH, Wallach D. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* 1995; 270(14):7795-7798.
38. Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, McGregor GR, Thompson CB. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev* 2001;15(12):1481-1486.
39. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281(5381):1309-1312.
40. Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicoterra P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: A switching the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 1997;185:1481-1486.
41. Shrode LD, Tapper H and Grinstein S. Role of intracellular pH in proliferation, transformation, and apoptosis. *J. Bioenerg. Biomembr* 1997; 29, 393-399.
42. Goossens JF, Henichart JP, Dassonneville L, Facompre M, Bailly C. Relation between intracellular acidification and camptothecin-induced apoptosis in leukemia cells. *Eur J Pharm Sci* 2000;10:125-131.
43. Dukhanin AS, Patrashev DV, Ogurstov S. Intracellular pH in thymocytes at early stages of apoptosis and necrosis. *Bull Exp Biol Med* 1999;10:991-993.
44. Mcconkey DJ. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett* 1998;99:157-168.
45. Tang LL, Sun CX, Liu H, Mi Y, Yao CG and Li CX. Steep pulsed electric fields modulate cell apoptosis through the change of intracellular calcium concentration. *Colloids Surf.* 2007; B 57, 209-214.
46. Beebe SJ, Fox PM, Rec LJ, Somers K, Stark RH, Schoenbach KH. Nanosecond pulsed electric field (nsPEF) effects on cells and tissues: Apoptosis induction and tumor growth inhibition. *IEEE Trans Plasma Sci* 2002;30:286-292.
47. Marshall DM. Genetics of meat quality. En: Fries RF, Ruvinsky A, editores. *The genetics of cattle*. New York: CABI Publishing; 1999.
48. Larzul C, Lefaucheur L, Ecolan P, Gogue J, Talmant A, Sellier P and Monin G. Phenotypic and genetic parameters for Longissimus muscle fibre characteristics in relation to growth, carcass and

meat quality traits in Large White pigs. *Journal of Animal Science*. 1997; 75, 3126–3137.

49. Bernard C, Cassar MI, Le Cunff M, Dubroeuçg H, Renand G, Hocquette JF. New Indicators of Beef Quality Revealed by Expression of Specific Genes. *J Agric Food Chem* 2007;55:5229-5237.