

Capítulo LXXV

Técnicas moleculares utilizadas en la industria cárnica: usos y potencialidades

Soján Uzcátegui Bracho, MSc
Nancy Jerez-Timaure, MSc, PhD

INTRODUCCIÓN

El acelerado crecimiento demográfico y el incremento de la renta están estimulando la producción y el consumo masivo de alimentos de origen animal (leche, carne, huevos). A nivel mundial, el sector agropecuario está creciendo vertiginosamente y se estima que para el año 2020 será el sector más importante en términos de valor agregado (FAO, 2007). La expansión de la demanda de alimentos de origen animal tiene impactos tecnológicos y estructurales significativos en el sector agropecuario. La producción animal en países en desarrollo necesitará ser aumentada, principalmente para satisfacer la demanda del consumidor, utilizando eficazmente todos los recursos que hasta la fecha resultan escasos. Aunado a esto, los consumidores, cada día son más exigentes en cuanto a los aspectos de calidad, procedencia e inocuidad de los alimentos.

Es por ello, que se considera que la aplicación de nuevas tecnologías moleculares ayudará a lograr un incremento en la producción y en la calidad de los productos, dotando de mayor capacidad competitiva a las explotaciones ganaderas, quienes proporcionarán respuestas rápidas y eficaces a la crisis alimentaria.

Estas nuevas tecnologías convergen en los siguientes aspectos: 1. Se basan en la determinación de la concentración completa y tipo específico de biomoléculas (ADN, ARNm, proteínas, metabolitos, por ejemplo). 2. Comparan el conjunto completo de biomoléculas específicas (transcriptoma, proteomas o metabolomas) bajo diferentes condiciones ambientales, y 3. El conjunto de datos generados son analizados e interpretados mediante bioinformática.

Esto ha resultado en varias tecnologías llamadas “omics” (en inglés) que incluyen la genómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica, nutrigenómica, fenómica (Evans, 2000), cada una con propósitos específicos. El presente capítulo preten-

de indagar sobre el uso y las potencialidades de nuevas tecnologías en la industria cárnica, en busca del mejoramiento de la calidad de la carne.

TÉCNICAS GENÓMICAS EN LA INDUSTRIA CÁRNICA

La carne es uno de los alimentos más nutritivos y apetecidos por el hombre, es una excelente fuente de proteínas de alta calidad (Biesalski, 2005), minerales y vitaminas del complejo B que no se encuentran presentes o están menos biodisponibles en otros alimentos. El ganado vacuno, a escala mundial, se ha convertido en el tercer abastecedor de proteínas, precedido por el cerdo y las aves (USDA, 2007).

El consumidor actual es cada día más exigente en cuanto a la calidad e inocuidad del producto que compra y se interesa por conocer el origen, tipo de alimentación y manejo de los animales de donde provienen los productos cárnicos. Los esfuerzos que se han realizado para predecir la calidad de la carne bovina no han arrojado hasta ahora métodos exactos que aseguren tales exigencias. Durante las pasadas décadas, los avances en genética molecular han llevado a la identificación de genes que están asociados con la calidad de la carne. En los sistemas de producción de bovinos de carne o doble propósito, los programas de selección no solo pretenden mejorar la productividad, sino aquellos caracteres que están directamente relacionados con la calidad de la canal y de sus carnes.

Sin embargo, las variables de calidad de la carne no se adecuan los esquemas de selección tradicional, ya que las evaluaciones de los fenotipos son complejas y costosas al igual que la evaluación en canal, despiece en cortes o medición de la blandura de la carne) y además se miden tarde en la vida del animal (Soria y Corva, 2004). Por ello es que recientemente se ha introducido una metodología más precisa para obtener el mérito genético de un animal, combinando la información fenotípica medida en el animal, con la información de los marcadores genéticos que estén relacionados con estos caracteres (Casas, 2005). Este método es conocido como Selección Asistida por Marcadores Genéticos.

La aplicación de la genómica puede beneficiar a la industria de la carne ya que, la identificación de genotipos particulares puede ser utilizada para predecir la calidad de la carne permitiendo tomar decisiones durante la cría de los animales ó antes que los mismos lleguen al sacrificio. Estos predictores pueden ser utilizados por la industria como herramientas para clasificar con exactitud a las canales de acuerdo a la calidad determinada por diferentes genotipos.

En el Cuadro 1 se muestran los genes reportados que están relacionados con características de la calidad de la carne en bovinos. En los países industrializados, se están ofreciendo las pruebas diagnósticas de ADN para estos genes a los productores de manera que puedan ser usadas como una herramienta de fácil uso en la selección de toros, y en la determinación de animales superiores en las pruebas de progenie. Ofrece además la oportunidad de facilitar el manejo en la finca, a la hora de conformar lotes elites destinados para producir carne de superior calidad.

Existen además, varias tecnologías disponibles para el seguimiento o rastreo de los productos, que permiten detectar ciertas características o elementos presentes en alimentos derivados de tejido animal. Este proceso conocido como trazabilidad, invo-

lucra procedimientos preestablecidos que permiten conocer el histórico, la ubicación y la trayectoria de un producto o lote de productos a lo largo de la cadena de suministros en un momento dado, mediante el uso de determinadas herramientas. Con la aplicación de la trazabilidad a lo largo de la cadena de producción de carne es posible obtener y codificar información sobre la especie animal, origen, autenticidad, edad, composición y sistemas de producción, incluyendo el tipo de alimentación (Schwagele, 2005).

Cuadro 1
Genes candidatos reportados para características de calidad de la carne

Locus	Gen	Cromosoma	Caracteres afectados
CAPNI	μ -calpaína	29	Terneza
CAPN2	m-calpaína	16	Terneza
CAST	Calpastatina	7	Terneza
LOX	Lysil oxidasa	7	Textura de la carne
LEP	Leptina	4	Engrasamiento de la canal
TG	Tiroglobulina	14	Grasa intramuscular
MSTN	Miostatina	2	Desarrollo muscular, calidad de carne, eficiencia conversión de alimentos

Fuente: (Jerez-Timaure, 2006).

En este campo, se han implementado varias técnicas moleculares que han contribuido a facilitar el diagnóstico de estos parámetros. En primer lugar en base al ADN, con la aplicación de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR); en segundo lugar, detectando proteínas específicas utilizando métodos inmunológicos (Western Blott, Elisa) y en tercer lugar, cuantificando por cromatografía gaseosa, el perfil diferencial de ácidos grasos saturados, monoinsaturados, poliinsaturados presentes en diversas especies animales. De estas el seguimiento basado en el marcado genético resulta ser más fácil de usar, se puede usar en cualquier segmento de la cadena de producción y ofrece resultados confiables (Figura 1).

De esta manera, es posible detectar fraudes a comunidades religiosas que tienen prohibido el consumo de carne de cierto tipo de animales. En la Unión Europea, la trazabilidad se considera como un requisito de la legislación dirigido por operadores comerciales que garantizan el rastreo durante la producción primaria, procesamiento, distribución y venta al detal (Schwagele, 2005).

Por otra parte, las técnicas genómicas también son útiles en la detección, tanto en carne fresca como en productos cárnicos procesados de la presencia de microorganismos patógenos tales como *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* (O'Brien *et al.*, 2005). Estos microorganismos por encontrarse en la piel de los animales vivos o colonizando sus intestinos, pueden producir contaminación de la carne durante la faena de los mismos. La identificación de estos patógenos puede realizarse a través de la amplificación de secuencias aleatorias (RAPD), mediante la detección de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), Southern blot y secuencia de genes que codifican la producción de toxinas (Martin *et al.*, 2004). Además, se ha propuesto la identificación de estos micro-

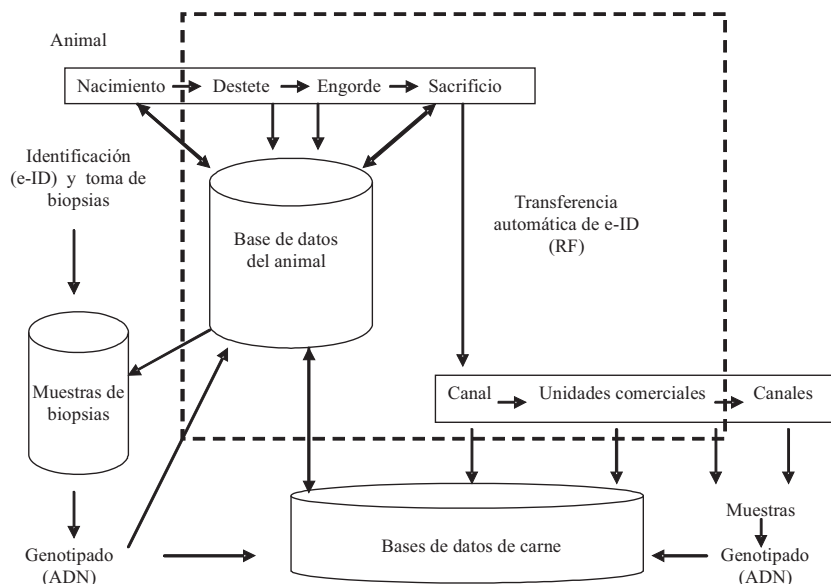


Figura 1. Trazabilidad en la cadena de producción de carne.

organismos a través de la metabolómica, que permite caracterizar los metabolitos que originan la producción de toxinas (Van der Werf *et al.*, 2001).

Recientemente, la genómica ha tenido una invaluable importancia en la industria de alimentos, conociendo esta rama como “nutrigenómica”, la cual es todavía incipiente. El interés primario ha sido el desarrollo de nuevos alimentos llamados funcionales, el cual se verá beneficiado por la disponibilidad de métodos de detección rápida de elementos bioactivos. Nuevos alimentos funcionales e ingredientes de los mismos han sido probados, en primera instancia para reforzar las funciones corporales y para la prevención de enfermedades crónicas (Van Der Werf *et al.*, 2001). Aunque existe un limitado número de estudios sobre la carne como alimento funcional, ya se conocen experiencias en el desarrollo de nuevos productos que incluyen la adición de ácido linoléico conjugado (CLA), L-carnitina, entre otros (Krajcovicova-Kudlackova *et al.*, 2000; Arihara, 2004), compuestos con propiedades bioactivas presentes en la carne, que proporcionan beneficios a la salud de los consumidores.

APLICACIÓN DE LA TRANSCRIPTÓMICA EN ESTUDIOS DE LA CARNE

Cada día, las investigaciones relacionadas con la biología y fisiología animal, consideran en mayor grado el estudio de la función de los genes y el control de la expresión de proteínas, así como el potencial de asociar los cambios específicos de la expresión de genes a un fenotipo de interés.

En los últimos 20 años, la evaluación de la expresión de genes ha progresado, debido al desarrollo de métodos de genes específicos. La identificación de la expresión diferencial de un gen ha sido posible mediante hibridación substractiva supresiva

(SSH) (Mohan *et al.*, 2004), visor diferencial (Davis *et al.*, 1996), análisis de secuencia de la expresión de un gen (Graff *et al.*, 2006), Northern Blott, entre otros, mientras que, mediante los microarreglos (microarrays, en inglés) es posible determinar simultáneamente la expresión diferencial de un gran número de genes (Rinaudo y Schultz, 2004).

La evaluación de la expresión de un gen utilizando tecnología de microarreglos fue originalmente descrita por Schena *et al.* (1995). En ese entonces, esta tecnología era en gran parte inaccesible para los científicos en el área de producción animal, debido a numerosas razones, la más importante era el escaso conocimiento sobre el genoma de animales domésticos. Además, el equipo especializado para producir y leer los arreglos (arrays, en inglés) era económicamente inasequible. Hoy día, la tecnología de arreglos ha sido ampliamente utilizada como herramienta exploratoria que proporciona información sobre la expresión diferencial de varios genes y mejora la interpretación de los caminos biológicos que explican la producción consistente de carne de calidad. La Figura 2 muestra un esquema de los pasos para la realización de microarreglos.

En el año 2002, sólo existía un microarreglo disponible comercialmente para bovinos, cerdos y pollos (Band *et al.*, 2002; <http://www.pyxisgenomics.com/>). Recientemente, se han desarrollado bancos de ADNc o EST de bovinos (secuencia pequeña de un gen expresado, típicamente identificado por purificación de mARNs y convertidos en ADNc), preparados a partir de ADN (Bernard *et al.*, 2005). Actualmente, existe un arreglo disponible a nivel comercial para bovinos (GeneChip_Bovine Genome Array, Affymetrix), basado en el Bovine Unigene Build 57, GenBank mRNAs y contiene un conjunto de 24,027 pruebas diseñadas para monitorear la expresión de la transcripción de 23,000 genes bovinos, aproximadamente (<http://www.affymetrix.com/products/arrays/specific/bovine.affx>).

Extensas investigaciones se han realizado para expandir la base del conocimiento de la expresión de genes en ganado bovino; los resultados de estos estudios indican que el número de bancos de ADNc publicados en la base de datos, se ha duplicado



Figura 2. Comparación de expresión diferencial de genes asociadas con la terneza de la carne por medio de Microarreglos.

desde diciembre de 2001 hasta agosto 2004 (Hocquette, 2005). En el 2003, se desarrolló un microarreglo ADNc con 19,200 elementos que permitieron la realización del perfil de genes del tejido muscular y adiposo de bovinos (Reverter *et al.*, 2003). Un total de 9600 elementos fueron impresos por duplicado en slide de vidrio. En 9222 evaluaciones realizadas a canales bovinas, se detectaron 7291 cDNAs anónimos de músculo esquelético y adiposo bovino. Estos slide han sido utilizados en tres experimentos; en primer lugar, para comparar los perfiles de expresión de genes de músculos de novillos alimentados bajo regímenes de alimentación de calidad variable (Reverter *et al.*, 2003). En otro experimento, se comparó el perfil de la expresión entre dos razas de ganado en tres puntos de crecimiento (11, 15 y 20 meses de la edad) (Wang *et al.*, 2005). En tercer lugar, ayudaron al estudio de los mecanismos que explican la adipogénesis *in vitro* en cultivos celulares de fibroblastos (Reverter *et al.*, 2003).

Mediante el estudio de genes expresados en un momento determinado es posible determinar la expresión diferencial de genes, la formación de proteínas y los cambios en las rutas metabólicas que regulan los procesos en los tejidos, bajo diferentes condiciones.

PROTEÓMICA EN EL ESTUDIO DE LA CALIDAD DE LA CARNE

El propósito de la proteómica es obtener información acerca de la expresión de proteínas celulares, que revela la función de genes, y que explica cómo la herencia y el entorno interactúan en el control de las funciones celulares (Bendixen, 2005). La Proteómica puede abarcar el estudio de los problemas que no pueden ser detectados usando análisis de ADN. La abundante cantidad y diversidad de proteínas presentes en los tejidos de los mamíferos, hace complicada la interpretación de los datos generados mediante la proteómica. Sin embargo, esto favorece la utilización de un amplio número de tecnologías encargadas de preparar, separar y cuantificar los niveles de expresión de miles de proteínas en paralelo (Bendixen, 2005).

Dentro de las técnicas utilizadas para el análisis del proteoma se encuentran la electroforesis de dos dimensiones (2-DE), espectrometría de masa (MS) y los microarreglos. La 2-DE permite el análisis en paralelo de varias proteínas, separadas en base a características químicas de estas biomoléculas (Mullen *et al.*, 2006). Sin embargo, esta técnica se limita a un subconjunto del total de proteínas contenidas en la célula (Pedersen *et al.*, 2003). Pese a la alta efectividad de la 2-DE y MS, estas técnicas no permiten cuantificar bajos niveles de expresión de ciertas proteínas (Mullen *et al.*, 2006). Por lo tanto, para evitar este inconveniente, se están aplicando métodos de alta sensibilidad llamados microarreglos de proteínas específicas, cuya aplicación no se ha desarrollado como la del ADN, ya que en contraste, la diversidad de proteínas y de sus interacciones, dificulta su aplicación (Mullen *et al.*, 2006). Es necesario el desarrollo de una técnica equivalente de PCR para proteínas, debido a su bajo costo y a la elevada cantidad de proteínas que pueden ser evaluadas (Stoll *et al.*, 2004).

Las variaciones genéticas causan diferentes genotipos que pueden ser estudiados mediante la proteómica. Taylor y Koohmaraie (1998) han contribuido en la interpretación de la relación entre el crecimiento muscular y las características de calidad de la carne. El estudio de la hipertrofia del tejido muscular bovino, se centró en la

comparación de patrones de proteínas musculares mutadas, cuya expresión producía niveles normales de miostatina inactiva (Bouley *et al.*, 2005). La hipertrofia muscular es causada por delección en el gen de la miostatina. De acuerdo a los resultados de la 2-DE de muestras del músculo *semitendinosus* (ST) de toros heterocigotos y homocigotos para el gen miostatina, los cambios en las proteínas contráctiles y enzimas metabólicas indican que la mutación de este gen, produce un cambio repentino del metabolismo glicolítico en el músculo.

Últimamente, la proteómica ha sido utilizada en el estudio de los cambios que ocurren en el músculo durante el almacenamiento *postmortem*, permitiendo ampliar el conocimiento de los mecanismos bioquímicos que determinan las características de calidad de la carne, como por ejemplo, la terneza. Numerosos estudios han descrito como se degradan las proteínas miofibrilares que se encuentran involucradas en el proceso de ablandamiento de la carne, y en particular los patrones de degradación de las proteínas contráctiles (Melody *et al.*, 2004).

También ha sido posible detectar los cambios que se establecen en la composición de proteínas antes y después de la faena de los animales; factores ambientales como el transporte, la exsanguinación y el aturdimiento modifican el proteoma del músculo *longissimus dorsi* debido a un incremento sustancial de un amplio rango de enzimas metabólicas después de la faena.

CONCLUSIONES

El advenimiento de nuevas tecnologías (la mayoría biotecnologías) ha facilitado el estudio integrado de la expresión de los genes a nivel molecular (ADN, ARNm, proteínas), accediendo al conocimiento de las funciones biológicas involucradas en la producción de la carne y mejoramiento de sus cualidades.

La aplicación de la genómica en la industria cárnica, contribuye en la identificación de genotipos específicos, de utilidad en la predicción de rasgos de calidad y rendimiento, a edad temprana, rastreo de origen y en la detección de patógenos. Mediante el conocimiento del transcriptoma bovino, es más factible el estudio de la expresión diferencial de genes en músculos de animales sometidos a distintos regímenes alimenticios, y entre razas a diferentes puntos de crecimiento. Mientras que, la proteómica ha contribuido en la interpretación de los cambios metabólicos que ocurren durante la conversión del músculo a carne y que determinan la calidad de la misma. La integración de estas tecnologías, constituirá las bases para que la industria cárnica utilice alternativas en la cría y ceba de animales con miras a mejorar la productividad, rendimiento y calidad de la carne vacuna.

LITERATURA CITADA

- Arihara K. 2004. Functional foods. In, Encyclopedia of meat science WK Jensen, C Devine, M Dikeman (Eds.). Oxford, Elsevier. 492-499pp.
- Band MR, Olmstead C, Everts RE, Liu ZL, Lewin HA. 2002. A 3800 gene microarray for cattle functional genomics: comparison of gene expression in spleen, placenta, and brain. *Anim. Biotech* 13(1):163-72.
- Bendixen E. 2005. The use of proteomics in meat science. *Meat Sci* 71:138-149.

- Bernard C, Degrelle S, Ollier S, Champion E, Cassar-Malek I, Charpigny G. 2005. A cDNA macro-array resource for gene expression profiling in ruminant tissues involved in reproduction and production (milk and beef) traits. *J. Physiol. Pharma* 56 (Suppl. 3):215-224.
- Biesalski HK. 2005. Meat as a component of a healthy diet - are there any risks or benefits if meat is avoided in the diet?. *Meat Sci* 70:509-524.
- Bouley J, Meunier B, Chambon C, De Smet S, Hocquette J H, Picard B. 2005. Proteomic analysis of bovine skeletal muscle hypertrophy. *Proteomics* 5:450-490.
- Casas E. 2005. Aplicación de la genómica para identificar genes que influyen sobre características económicamente importantes en animales. *BIOTAN Serie especial*. 51-59.
- Davis W Jr, De Sousa PA, Schultz RM. 1996. Transient expression of translation initiation factor eIF-4C during the 2-cell stage of the preimplantation mouse embryo: identification by mRNA differential display and the role of DNA replication in zygotic gene activation. *Develop Biol* 174:190-201.
- Evans GA. 2000. Designer science and the “omics” revolution. *Nat Biotech* 18:127.
- Food and agriculture organization of the united nations (FAO). 2000. The appropriateness, significance and application of biotechnology options in the animal agriculture of developing countries. En: *Electronic forum on biotechnology in food and agriculture*. June 12-August 25.
- Graff JC, Behnke M, Radke J, White M, Jutila, MA. 2006. A comprehensive SAGE database for the analysis of $\{\gamma\}\{\delta\}$ T cells. *Intern Immun* 18, 613-626.
- Hocquette JF. 2005. Where are we in genomics? *J PhysiolPharm* 56(Suppl. 3):37-70.
- Krajcovicova-Kudlackova M, Simoncic R, Bederova A, Babinska K, Bender I. 2000. Correlation of carnitine levels to methionine and lysine intake. *Physiol Res* 49:399-402.
- Jerez-Timaure N. 2006. Aplicación de Técnicas Moleculares en la mejora de Caracteres de Interés Económico en el Ganado de Carne. En, XLIII Reunión GIRARZ. Alcances y perspectivas en la mejora genética de la ganadería doble propósito. Maracaibo 24 y 25 de marzo.
- Martin MC, Fueyo JM, González-Hevia MA, Mendoza MC. 2004. Genetic procedures for identification of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* from three food poisoning outbreaks. *J Food Microb* 94:279-286.
- Melody JL, Lonergan SM, Rowe LJ, Huiat TW, Mayes MS, Huff-Lonergan E. 2004. Early postmortem biochemical factors influence tenderness and water-holding capacity of three porcine muscles. *J Anim Sci* 82: 1195-1205.
- Mohan M, Hurst AG, Malayer JR. 2004. Global gene expression analysis comparing bovine blastocysts flushed on day 7 or produced in vitro. *Mol Reprod Dev* 68:288-298.
- Mullen AM, Stapleton PC, Corcoran D, Hamill RM, White A. 2006. Understanding meat quality through the application of genomic and proteomic approaches. *Meat Sci* 74:3-16.
- O’Brrien SB, Duffyn G, Carney E, Sheridan JJ, McDowell DA, Blair IS. 2005. Prevalence and numbers of *Escherichia coli* O157 on bovine hide at a beef slaughter plant. *J Food Prot* 68:660-665.
- Pedersen S.K., Harry J.L., Sebastian L., Baker J., Traini M.D., McCarthy J.T. 2003. Unseen proteome: mining below the tip of the iceberg to find low abundance and membrane proteins. *J. Protein Res.* 2:311-313.

- Reverter A, Byrne KA, Bruce HL, Wang YH, Dalrymple BP, Lehnert SA. 2003. A mixture model-based cluster analysis of cDNA microarray gene expression data on Brahman and Brahman composite steers fed high, medium and low quality diets. *J Anim Sci* 81, 1900-1910.
- Rinaudo P, Schultz RM. 2004. Effects of embryo culture on global pattern of gene expression in preimplantation mouse embryos. *Reproduction* 128, 301-311.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467-470.
- Schwagele F. 2005. Traceability from a European perspective. *Meat Sci.* 71:164-173.
- Soria LA, Corva P.M. 2004. Factores genéticos y ambientales que determinan la terneza de la carne. *Arch Latinoam Prod Anim* 12(2):73-88.
- Stoll D, Bachmann J, Templin MF, Joos TO. 2004. Microarray technology: an increasing variety of screening tools for proteomic research. *DDT targets.* 3(1):24-31.
- Taylor RG, Koohmaraie M. 1998. Effects of postmortem storage on the ultrastructure of the endomysium and myofibrils in normal and callipyge longissimus. *J Anim Sci* 76:2811-2817.
- United States Department of Agriculture (USDA). 2007. Livestock and poultry: World Markets and trade. Circular Series DL&P 2-07.
- Van Der Werf M.J, Schuren FHJ, Bijlsma S, Tas AC, Van Ommen B. 2001. Nutrigenomics: Application of genomics technologies in nutritional sciences and food technology. *J Food Sci* 66(6): 772-780.
- Wang YH, Byrne K, Reverter A, Harper G, Taniguchi M, McWilliam S. 2005. Transcriptional profiling of skeletal muscle tissue from two breeds of cattle. *Mamm Genome* 15:201-210.