



Universidad Nacional de General San Martín (UNSAM)

**Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS)
“Dr. Carlos G. Malbrán”**

“Asociación de niveles de vitaminas antioxidantes en músculo con la expresión de genes relacionados a la capacidad antioxidante en carne de novillo con alimentación de grano o pasto”

Trabajo de tesis para optar al título de Magister en Microbiología Molecular de la
Universidad Nacional de General San Martín

Autor: Alejandra M. C. Gasparovic

Director: Dra. Mariana Nanni

Área Bioquímica del Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA), INTA Castelar

2016

Este Trabajo de Tesis se ha podido concluir gracias al “Programa de Apoyo para la Finalización de la Formación de Postgrado para Docentes de la Universidad Nacional de Entre Ríos- Convocatoria 2016”, de acuerdo a la Resolución Rectoral 009/16 del 11 de febrero de 2016 y la Resolución “C.D.” N°059/16 del 1 de abril de 2016 de la Facultad de Bromatología.

Mi agradecimiento a la gestión de la UNER y de la Facultad de Bromatología por la oportunidad brindada.

RESUMEN

Asociación de niveles de vitaminas antioxidantes en músculo con la expresión de genes relacionados a la capacidad antioxidante en carne de novillo con alimentación de grano o pasto

El interés por definir y caracterizar la calidad de la carne bovina obtenida bajo diferentes condiciones de producción es creciente en los principales mercados internacionales debido a su repercusión sobre la salud humana.

Los sistemas de producción en la Argentina posibilitan lograr carnes de alta calidad, en especial, por la utilización de pasturas en la dieta de los animales.

La calidad de la carne está determinada por su composición química y por sus características organolépticas y, el sistema de producción y la oferta nutricional, entre otros factores, pueden modificar de forma considerable estas características.

Los sistemas pastoriles alteran la composición química de la carne que presenta mayores niveles de vitaminas antioxidantes y de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y menor contenido de grasa y colesterol que las carnes obtenidas con dietas de granos, lo que podría proporcionar un producto con mayor capacidad antioxidante, más estable frente al deterioro oxidativo y con propiedades nutraceuticas específicas.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el comportamiento prooxidante/ antioxidante en el músculo *Longissimus dorsi* (LD) y la expresión de genes relacionados con la incorporación concomitante de antioxidantes.

Dos grupos de novillos Angus (n=6 por grupo) fueron alimentados, uno con dieta de pasto (P): recría en pasturas de invierno y terminación en alfalfa o ensilado de maíz, y el otro, con terminación a corral y dieta de grano (G): 68% de ensilaje de maíz, 15% de harina de girasol, 5% de heno y 2% de núcleo vitamínico/mineral.

Los resultados obtenidos para ambas dietas, pasto y grano, mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) para α -tocoferol y para β -caroteno y fueron: $2,36 \pm 0,33$ versus $1,64 \pm 0,44$ y $0,15 \pm 0,06$ versus $0,06 \pm 0,02$ $\mu\text{g/g}$, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre las dietas para γ -tocoferol, retinol y luteína.

El efecto de la dieta sobre la capacidad antioxidante (CAO) de los antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos se evaluó utilizando la capacidad de reducción del ion férrico (FRAP). CAO mostró valores similares para ambos grupos. Además, los valores de CAO de los antioxidantes hidrofílicos fueron significativamente mayores que los valores de los lipofílicos.

La oxidación se determinó mediante TBARS en homogenatos frescos de músculo LD o después de la inducción con FeSO_4 y ácido ascórbico durante 30 min a 37°C . Los valores de TBARS fueron similares para los grupos P y G en muestras frescas. Sin embargo, luego de la inducción de la oxidación, las muestras P mostraron una mayor resistencia a la oxidación en comparación con las muestras G.

La expresión génica se determinó en el ARNm aislado a partir de tejido LD por RT-PCR. Los genes seleccionados correspondieron a: AOX2: proteína antioxidante 2 o similar a glutatión fosfolípido peroxidasa no dependiente de selenio; α -TAP: proteína asociada al α -tocopherol; α -TTP: proteína de transferencia de α -tocopherol y CRBP1: proteína celular 1 de unión al retinol.

Los ensayos de transcripción mostraron que las señales de α -TAP y α -TTP fueron menos significativas para P en comparación con las muestras G. Ni AOX2 ni CRBP1 evidenciaron expresión diferencial entre las dietas.

La alimentación con pasturas mejoró la resistencia a la oxidación y podría modular la expresión de genes relacionados con la incorporación de tocoferol en el músculo LD, pero son necesarios más estudios.

Palabras clave: carne argentina, tocoferol, expresión génica, capacidad antioxidante, alimentación a pasto o grano.

SUMMARY

Association between levels of antioxidant vitamins in muscle and genes expression related to the antioxidant capacity in steer beef of pasture or grain fed

There is growing interest in defining and characterizing the quality of beef obtained under different conditions of production in major international markets due to its impact on human health.

Argentinian production systems makes it possible to achieve high quality meats, especially due to the use of pastures in the animal's diets.

The meat quality is determined by its chemical composition and its organoleptic characteristics, and the production system and nutritional supply, among other factors, can change these characteristics significantly.

Pastoral systems alter the chemical composition of meat, which has higher levels of antioxidant vitamins and polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and less fat and cholesterol than meat obtained from grain diets, which could provide a product with greater antioxidant capacity, more stable to oxidative deterioration and with specific nutraceutical properties.

The objective of this work was to study the prooxidant/antioxidant behavior in *Longissimus dorsi* (LD) muscle and the concomitant gene expression related to the incorporation of antioxidants.

Two groups of Angus steers (n = 6 each group) were fed, one diet of grass (P): reared on winter pastures and finished on alfalfa or corn silage diet, and the other finished with grain diet in feedlot (G): 68% corn silage, 15% sunflower meal, hay 5% and 2% vitamin / mineral core.

Significant differences ($p < 0.05$) for α -tocopherol and β -carotene were 2.36 ± 0.33 vs. 1.64 ± 0.44 and, 0.15 ± 0.06 vs. 0.06 ± 0.02 $\mu\text{g/g}$ respectively for P vs. G samples. No differences were found for γ -tocopherol, retinol and, lutein between two diets.

The effect of diet on antioxidant capacity (AOC) of hydrophilic and lipophilic antioxidants was evaluated using the FRAP-ferric reducing ability. AOC showed similar values for both groups. In addition, AOC values of the hydrophilic antioxidants were significantly higher than lipophilic values.

Oxidation was determined by TBARS in fresh homogenates of LD muscle or after induction with FeSO_4 and ascorbic acid for 30 min at 37 °C. TBARS values were similar for P and G groups in fresh samples. However, after the induction of oxidation, P samples showed a higher resistance to oxidation compared with G samples.

Gene expression was determined in mRNA isolated from LD tissue by RT-PCR. Selected genes corresponded to: AOX2: antioxidant protein 2 or non-selenium glutathione phospholipid-peroxidase; α -TAP: α -tocopherol associated protein; α -TTP: α -tocopherol transfer protein and, CRBP1: cellular retinol binding-protein 1.

Transcription assays showed that signals for α -TAP and α -TTP were less significant for P compared to G samples. Neither AOX2P nor CRBP1 showed differential expression between diets.

Pasture feeding enhanced the resistance to oxidation and could modulate gene expression related to tocopherol incorporation into LD muscle, but more studies are needed.

Keywords: Argentine beef, tocopherol, gene expression, antioxidant capacity, pasture or grain feeding.

*“No te rindas que la vida es eso / continuar el viaje / perseguir tus sueños / destrabar el tiempo
/ correr los escombros / y destapar el cielo”*

Apócrifo de Mario Benedetti

*A mis hijos
Camilo, Valentín y Sebastián
A mi mamá*

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Adriana Descalzo y a la Dra. Mariana Nanni por haberme abierto generosamente las puertas de sus laboratorios permitiéndome entrar en sus vidas y haberme dado la posibilidad de aprender tantas cosas nuevas.

No hubiera sido posible desarrollar las cuestiones prácticas de esta tesis sin sus apoyos en todos los aspectos que supone un trabajo de este tipo. En especial, quiero agradecerle a la Dra. Nanni por haber asumido la dirección con motivo de la ausencia de la Dra. Descalzo, por la guía con las experiencias referidas a la expresión de genes, el asesoramiento en la redacción del trabajo y la paciencia demostrada, siempre.

¡Muchas gracias a ambas por toda la atención y el cariño recibidos, y por ser un ejemplo a seguir como personas y como profesionales!

Vaya mi agradecimiento:

A mi familia por el tiempo que no les dediqué.

A mi amiga Silvia por haberse embarcado conmigo en el posgrado y por tantas horas de estudio y viajes compartidos que quedarán para siempre en mi memoria.

A mis amigos, en especial a Argelia que me hizo el aguante.

A Daniel y Mercedes, también por el aguante.

A Carolina por la revisión del resumen en inglés.

A las personas del INTA que de distintas maneras colaboraron e hicieron que me sintiera a gusto: Ilda, Sergio, Luciana, Silvina, Lourdes, Adriana, Viviana

Y muy especialmente, a Elisa Naef por su ayuda desinteresada, por el conocimiento compartido, por las horas dedicadas, por el entusiasmo, por la preocupación, por el acompañamiento, por las sugerencias ... Gracias Eli.

¡Muchas gracias a todos!

ABREVIATURAS

A: Absorbancia

A₂₆₀: Absorbancia a 260 nm

A₂₈₀: Absorbancia a 280 nm

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico cadena complementaria

Agua Milli-Q®: Agua ultrapura por el sistema Milli-Q reference de Millipore

α -TAP: Proteína asociada al α -tocoferol

α -TTP: Proteína de transferencia del α -tocoferol

AOC: Capacidad antioxidante total

AOXP2: Proteína antioxidante 2 o similar a glutatión peroxidasa no dependiente de selenio

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

BHT: Butil-hidroxitolueno

(C): Dieta de terminación a corral de alto grano con suplemento vitamínico y mineral

CC: Concentración

CRBP1: Proteína celular 1 de unión al retinol

DNAsa-1: Enzima desoxirribonucleasa-1

dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato

E₂₉₂: Coeficiente de extinción molar a 292 nm

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

Fe²⁺-TPTZ: Complejo tripiridiltriazina-ferroso

Fe³⁺-TPTZ: Complejo tripiridiltriazina-férrico

Fluo: Detector de fluorescencia

FRAP: *Ferric Reducing Ability Power*

H₂O DEPC: Agua bidestilada estéril con 0,01% V/V de dietilpirocarbonato

H₂O_{dd}: Agua bidestilada

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

ITA: Instituto de Tecnología de Alimentos

LD: Músculo *Longissimus dorsi*

Libre de DNasa/RNasa: Libre en enzimas DNasa y RNasa

MDA: Malondialdehído

MOPS: Buffer 3-(N-morfolino) propan sulfónico

NCBI: Centro Nacional de Información Biotecnológica

DO: Densidad óptica

(P): Dieta de terminación en pasturas y ensilado de alfalfa o de maíz

p.a. : Para análisis

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PM: Peso Molecular

PNCAR 221: INTA, Programa Nacional de carnes. Proyecto específico: Calidad de carne bovina (2006-2009)

RNAsin: Proteína recombinante inhibidora de ribonucleasas eucariotas

RP-HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia de fase reversa

RT: Retro-transcripción

RT- PCR: Transcripción reversa asociada a la reacción en cadena de la polimerasa

Taq Polimerasa: Polimerasa de ADN dependiente de ADN aislada de *Thermus aquaticus*

TBA: Ácido 2-tiobarbitúrico

TBARS: Sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico

TCA: Ácido tricloroacético

TEP: 1,1,3,3-tetraetoxipropano

Tm: Temperatura de fusión

TPTZ: 2,4,4-Tri (2-piridil)-s-triazina

Tr: Tiempo de retención

Transcriptasa Reversa M-uLV: ARN polimerasa dependiente de ADN de Moloney Murine Leukemia Virus

UV: Luz ultravioleta

VIS: Luz visible

Indice

1. Introducción	14
1.1. Producción y comercialización de la carne bovina en Argentina	14
1.2. Definición y composición de la carne vacuna.....	16
1.3. Calidad de la carne	18
1.4. Procesos de oxidación	23
1.4.1. Oxidación de lípidos.....	26
1.4.2. Oxidación en la carne.....	30
1.4.3. Evaluación de la oxidación lipídica.....	35
1.5. Capacidad antioxidante del tejido muscular.....	38
1.5.1. Evaluación de la capacidad antioxidante.....	40
1.5.2. Antioxidantes enzimáticos.....	44
1.5.3. Antioxidantes no enzimáticos: vitamina E	48
1.5.4. Antioxidantes no enzimáticos: carotenoides.....	52
1.6. Antioxidantes y dietas	65
1.6.1. Genes asociados a la calidad de la carne.....	71
1.7. Importancia del trabajo	76
2. Hipótesis	78
3. Objetivos.....	79
3.1. Objetivo general.....	79
3.2. Objetivos específicos	79
4. Materiales y Métodos.....	81
4.1. Muestras.....	81
4.1.1. Caracterización de las muestras.....	81
4.1.2. Procesamiento de las muestras.....	82
4.2. Análisis	82
4.2.1. Determinación del contenido de vitaminas antioxidantes.....	82
4.2.2. Determinación de la capacidad antioxidante.....	87
4.2.3. Medida de la oxidación lipídica.....	89
4.2.4. Análisis estadístico.....	90
4.2.5. Expresión de genes relacionados con la incorporación de vitaminas antioxidantes en el tejido muscular.....	91
5. Soluciones y Reactivos	102

6. Resultados	106
6.1. Vitaminas antioxidantes en LD por HPLC	106
6.1.1. Cromatogramas y curvas de calibración de estándares.....	106
6.1.2. Contenido de los antioxidantes.....	115
6.2. Capacidad antioxidante (CAO) determinada por el ensayo FRAP	119
6.3. Grado de oxidación determinado por TBARS	123
6.4. Expresión de genes relacionados con la incorporación de vitaminas antioxidantes en el tejido muscular.....	128
6.4.1. Puesta a punto del método.	130
6.4.2. Evaluación de las muestras.	132
7. Discusión.....	137
8. Conclusiones	168
9. Referencias.....	170
10. Anexo.....	186
10.1. Resultados	186
10.1.1. Contenido de vitaminas antioxidantes en LD por HPLC.....	186
10.1.2. Capacidad antioxidante (AOC) determinada por el ensayo FRAP.....	187
10.1.3. Expresión de genes relacionados con la incorporación de vitaminas antioxidantes en el tejido muscular.....	189
10.1.4. Análisis estadístico.....	190

1. Introducción

1.1. Producción y comercialización de la carne bovina en Argentina

El sector productor de carne en la Argentina ha desempeñado un papel decisivo en la economía del país que se ha situado históricamente entre los principales exportadores de carne bovina del mundo. En el año 2005, antes de que comenzaran a operar las restricciones estatales sobre las exportaciones de carne vacuna, el país representaba el 10% del mercado global del producto, decayendo en el 2013 a solo un 2% (Instituto Promotor de la Carne Vacuna Argentina, [IPCVA], 2014).

Las exportaciones totales del sector en el 2015 fueron de 133.100 toneladas peso producto representando un valor equivalente a 870 millones de dólares, 18,2% por debajo de los 1.063,8 millones registrados en el año 2014 (IPCVA, 2016).

En el primer trimestre del 2016, las ventas externas de cortes frescos bovinos fueron de 21.798 toneladas, una cifra 20% inferior a la registrada en el mismo período del año pasado, y por detrás de Brasil, Uruguay y Paraguay. Se estima que la recuperación de las exportaciones del sector llevará un período considerable de tiempo, ya que va de la mano con el restablecimiento del rodeo bovino nacional que se inició en el año 2011 (AgroFy News, Exportaciones argentinas de carne vacuna cayeron 20%, 25-4-2016; IPCVA, 2016).

Los principales productos comercializados, en volumen, al 30 de abril de 2016 fueron: carne congelada sin hueso 56,4% y carne enfriada sin hueso 40,6% (IPCVA, 2016). Dentro de éstos, la suma de los cortes de mayor valor unitario, los del *Rump & Loin* (lomo, bife angosto y cuadril, con sus variantes) vendidos a la Unión Europea y la *picanha* a Brasil, tuvieron una participación cercana al 22% del volumen exportado durante el mes de abril (14.363 toneladas

peso producto), representando el 10,6% de la producción de carne bovina en dicho mes (IPCVA, 2016).

El país actualmente posee un stock bovino de 52,6 millones de cabezas (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria [SENASA], 2016) lo que señala una mejora del 2% con respecto al año 2015, durante el cual, se faenaron 12,156 millones de cabezas y se produjeron algo más de 2,7 millones de toneladas de res con hueso (SENASA, 1990-2015).

En cuanto al consumo doméstico de carne vacuna, Argentina es el país que exhibe el índice más alto a nivel mundial (entre 65 y 70 Kg/habitante/año), aunque se observa una tendencia a la disminución (PricewaterhouseCoopers Argentina [PwC Argentina], 2012). En la última década, el año con mayor consumo fue el 2007 con 68,97 Kg/habitante/año (SENASA, 1990-2015), y en el 2011, se verificó una caída por debajo de los 60 Kg (PwC Argentina, 2012). En el año 2015 el consumo promedio anual fue de 59,44 Kg/hab/año (SENASA, 1990-2015), ubicándose entre 55 y 56 Kg/hab en los primeros tres meses del 2016 (SENASA, 2016).

La carne argentina se ha producido tradicionalmente sobre pasturas naturales e implantadas (Descalzo & Sancho, 2008). Los dos tercios de la carne que se produce en el país se siguen obteniendo en sistemas basados en pasturas, especialmente en las regiones templadas, aunque menos del 2% de los productores practican sistemas de pastoreo puros. La mayoría, utiliza sistemas mixtos combinando el cultivo de cereales con la ganadería (Pordomingo, 2009; Pighin, Pazos, Chamorro, Paschetta, Cunzolo, Godoy et al., 2016).

En los últimos veinte años, el aumento del precio de los granos provocó la expansión de los cultivos a suelos considerados, hasta hace poco, como típicamente ganaderos. Esto generó el desplazamiento de la producción ganadera hacia zonas menos favorecidas (Teira, Perolo, Bonato, & Tisocco, 2006; PwC Argentina, 2012). Como resultado, la cría y engorde de bovinos,

ha avanzado hacia un proceso de diversificación e intensificación de los sistemas de pastoreo (Pighin et al., 2016).

Los sistemas de pasturas se basan en cadenas de forrajes adecuadas a las condiciones climáticas y a la calidad de los suelos. Estas cadenas abarcan leguminosas forrajeras (principalmente alfalfa) y cultivos anuales de invierno (avena, centeno, *ryegrass* y triticale), en rotación con cultivos de cereales. La mayoría de los productores utiliza, de manera estratégica, cereales de grano (maíz y sorgo) como suplementos energéticos a la dieta de pasturas (Pighin et al., 2016).

La necesidad de liberar la superficie de pastoreo para la agricultura y de aumentar los niveles de productividad ganadera (número de cabezas/hectárea/año), ha llevado a los productores a introducir la alimentación del ganado en confinamiento (Teira et al, 2006; Pighin et al., 2016). Recientemente se ha visto favorecido el crecimiento del sistema de corrales con suplementación en verdeos o pasturas. Algunos agricultores recurren al confinamiento en la etapa final de engorde, posterior a los períodos de pastoreo o previo a los mismos (Pordomingo, 2013; Pighin et al., 2016).

1.2. Definición y composición de la carne vacuna

El Capítulo VI, artículo 247 del Código Alimentario Argentino (CAA) especifica la denominación genérica de carne como: “la parte comestible de los músculos de los bovinos, ovinos, porcinos y caprinos declarados aptos para la alimentación humana por la inspección veterinaria oficial antes y después de la faena. La carne será limpia, sana, debidamente preparada, y comprende a todos los tejidos blandos que rodean al esqueleto incluyendo su cobertura grasa, tendones, vasos, nervios, aponeurosis y todos aquellos tejidos no separados

durante la operación de la faena. Por extensión se considera carne al diafragma y los músculos de la lengua, no así los músculos de sostén del aparato hioideo, el corazón y el esófago”.

El músculo suele constituir la mayor parte del peso de la carne de las canales (aproximadamente el 50 %), sin embargo, para que el músculo de un animal sacrificado se transforme en carne, es preciso que éste sufra una serie de transformaciones *post mortem* como son la instauración del *rigor mortis* y la maduración. Por ello, el término "carne" no es sinónimo de músculo, aunque en su mayor parte esté constituida por este tejido (Loaysa Carrión, 2011).

La carne se compone de agua, proteínas y aminoácidos, lípidos y ácidos grasos, minerales, vitaminas y otros componentes bioactivos, así como pequeñas cantidades de carbohidratos (Instituto Nacional de Tecnología Industrial [INTI], 2005; Guerrero, Valero, Campo, & Sañudo, 2013). De acuerdo a los datos registrados en las tablas nacionales de composición de alimentos de la base de datos FAO/INFOODS (2010), 100 g de carne vacuna fresca aportan, en promedio para veinte regiones diferentes de la canal, 72 g de agua, 20,9 g de proteínas, 1,2 g de cenizas y 5,8 g de grasas, aunque los cortes magros de carne argentina, excepcionalmente, contienen más del 5% de grasa intramuscular (Schor, Cossu, Picallo, Martínez Ferrer, Grigera Naón, & Colombatto, 2008). Su composición en nutrientes presenta variaciones con la raza del animal, el tipo de alimentación, la estación del año y el corte de carne (Williams, 2007).

Desde el punto de vista nutricional, la importancia de la carne deriva de sus proteínas de alto valor biológico y digestibilidad (alrededor del 94%) que contienen todos los aminoácidos esenciales para cubrir las necesidades del organismo humano, así como de sus minerales (hierro, zinc, fósforo, cobre y selenio) y vitaminas de elevada biodisponibilidad (B₁₂, riboflavina, niacina, B₆, ácido pantoténico, α -tocoferol, β -caroteno y posiblemente vitamina D) (INTI, 2005; Williams, 2007; Daley, Abbot, Doyle, Nader, & Larson, 2010). Proporciona, también, cantidades

moderadas de colesterol y grasas saturadas e insaturadas, incluyendo ácidos grasos poliinsaturados (n-3 y n-6) y una variedad de antioxidantes endógenos y compuestos bioactivos como glutatión, carnosina, carnitina, taurina, anserina, ubiquinona y creatina (Williams, 2007; García, 2015).

La carne constituye la única fuente de hierro de fácil absorción, sin inhibidores, como no ocurre con el hierro aportado por vegetales, ya que entre el 50 y el 60% de éste se halla en forma de hierro hemínico cuyo porcentaje de absorción varía entre el 15 y el 25%, independientemente de la composición de la dieta. La vitamina B₁₂ se encuentra únicamente en alimentos de origen animal y es necesaria para la formación de glóbulos rojos funcionales (INTI, 2005).

1.3. Calidad de la carne

Los criterios que definen la calidad de la carne bovina, hacen referencia a varios aspectos representados por múltiples factores que interactúan entre sí y que pueden ser agrupados como intrínsecos y extrínsecos. Entre los primeros, se encuentran la raza, el genotipo, el género y la edad y peso del animal al momento de la faena. Los factores extrínsecos, previos al sacrificio, se refieren a las condiciones de producción de la carne e incluyen el sistema de gestión, el modo de destete, la alimentación, el manejo *ante mortem* y el método de sacrificio. La maduración, el tipo de conservación, las condiciones de transporte y almacenamiento, la comercialización y el consumo, la forma y tiempo de cocción, y los hábitos de los consumidores, conforman los factores *post mortem* (Andersen, Oksbjerg, Young, & Therkildsen, 2005; Guerrero et al., 2013). Todos tienen gran importancia para lograr el desarrollo de sistemas biológica y económicamente rentables en la producción de carne de calidad.

En un trabajo de revisión, Schor et al. (2008) citan diversos estudios sobre calidad de carne bovina argentina que indican que la raza, aunque es menos relevante que otros factores, tiene efecto sobre parámetros físicos, físico-químicos y aspectos nutricionales de la carne. La terneza, medida en valores de fuerza de cizallamiento y el contenido de grasa intramuscular, mostraron diferencias significativas solo cuando se compararon distintos tipos de razas puras (por ej. *Bos indicus* con una raza británica). Se observaron también, variaciones en el rendimiento de las canales, en el contenido de grasa subcutánea y en el perfil de ácidos grasos, según el caso.

Los atributos de la canal se ven más afectados por el género, lo que está principalmente relacionado con la cantidad y lugar de deposición de la grasa y la tasa de crecimiento y rendimiento de la canal. La carne de las hembras es más apreciada por su terneza y jugosidad, mientras que la edad del animal repercute en la textura de la carne. El dominio relacionado con las interacciones que establecen los animales entre ellos, origina estrés, contusiones y lesiones físicas. La terneza, y algunas puntuaciones del color y sabor de la carne, resultan alterados por la condición social animal (Guerrero et al., 2013).

Con respecto al efecto del sistema de producción sobre la calidad de la carne, existen numerosas investigaciones que han tratado el tema desde distintos puntos de vista, con diferentes resultados, debido a que puede ser considerado como un efecto de factores multicausales (Guerrero et al., 2013).

La estrategia de alimentación es el elemento que más se utiliza en la producción de carne como una herramienta de control de calidad en relación con la mejora del rendimiento, el bienestar animal, la seguridad alimentaria, la calidad nutricional y la calidad tecnológica, es

decir, la aptitud de la carne para su consumo, conservación en el tiempo o transformación en productos cárnicos (Andersen et al., 2005).

Los resultados de varias investigaciones en Argentina sobre diferentes sistemas de alimentación, presentaron una gran variabilidad acerca de aspectos físicos de la carne como la terneza, el sabor, el olor, el color muscular y de la grasa subcutánea, el marmoleo, pérdidas por evaporación y goteo y por cocción. En general, la carne de animales faenados con el mismo grado de acabado terminados en pasturas frente a los que recibieron suplementos, exhibió diferencias con respecto a la terneza y al color en músculo *Longissimus dorsi*, mientras que la grasa de animales de engorde intensivo era más blanca y la intensidad del sabor más baja, en tanto que el color, resultó ser mayor y más estable en los animales terminados en pasturas. Esto último ha sido relacionado con una mayor concentración de antioxidantes presente en los pastos (Schor et al., 2008).

Las características y la composición química de la dieta animal influyen de manera crucial sobre los aspectos nutricionales de la carne argentina (Schor et al., 2008). Las demandas nutricionales actuales son prioritarias en los sistemas de producción de carne. Estas demandas se relacionan con los lípidos dietarios y las enfermedades crónicas no transmisibles (enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cánceres), con los nutraceuticos y sustancias antioxidantes como vitamina E, β -caroteno e isómeros conjugados del ácido linoleico (CLA), entre otros, con la deficiencia de microelementos en la dieta actual (hierro, zinc, selenio) y con los compuestos bioactivos, mencionados anteriormente (García, 2015).

La carne vacuna que procede de animales terminados en pastos, en general, tiene un menor contenido de grasa y colesterol, y mayores concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) que la carne de animales terminados en *feedlot* (Yang, Lanari, Brewster,

& Tume, 2002a; Mercier, Gatellier, & Renerre, 2004; Gatellier, Mercier, Juin, & Renerre, 2005; Descalzo, Insani, Biolatto, Sancho, García, Pensel, & Josifovich, 2005) . La carne argentina de pasturas contiene más ácidos grasos omega-3 que se originan por la oxidación microbiana en el rumen a partir de ácido linolénico (C18:3) que es un importante componente de los lípidos del pasto (Descalzo et al., 2005; García, Pensel, Latimori, Kloster, Amigone, & Casal, 2005). De los isómeros conjugados del ácido linolénico (CLA), el isómero cis-9 trans-11, posee propiedades anticancerígenas y antiaterogénicas (Mercier et al., 2004; García et al., 2005; Gatellier et al., 2005). Además, la carne presenta una relación de ácidos grasos omega-6 y omega-3 mucho más cercana al valor óptimo para el consumidor (García, 2003; Descalzo & Sancho, 2008; Schor et al., 2008). En una dieta saludable la proporción de ácidos omega-6 debería ser, aproximadamente, dos a cuatro veces mayor que la de omega-3. En la alimentación típica de la población argentina, la cantidad de ácidos grasos omega-6 es superior a la recomendada en relación a la de omega-3, lo que facilita el aumento en la tasa de trastornos cardiovasculares (Guías alimentarias para la población argentina, 2016). Los antioxidantes naturales como la vitamina E y el β -caroteno también están presentes en las pasturas y se incorporan de manera eficiente en la carne (García, 2003; Descalzo & Sancho, 2008).

En suma, el sistema de producción permite incrementar en la carne el contenido los AGPI omega-3 y disminuir así la relación AGPI omega-6/omega-3, aumentar el aporte de antioxidantes naturales, vitaminas, minerales y compuestos bioactivos del tipo del ácido linoleico (CLA), pero no posibilita disminuir el contenido de grasa intramuscular por cuestiones de calidad sensorial, ya que valores bajos pueden afectar negativamente algunos atributos como jugosidad y sabor, ni modificar significativamente los niveles de colesterol (45-65 mg/100 g), aunque su incidencia en el colesterol circulante en el plasma humano es escasa (García, 2015).

En cuanto a las condiciones previas al sacrificio, éstas involucran varios hechos, de los que el tiempo de transporte, la estadía en centros de clasificación y la época, pueden considerarse los más importantes para la calidad de la carne. El lapso de tiempo entre el aturdimiento y el desangrado durante el sacrificio es otro aspecto a considerar, ya que si ha sido imperfecto, puede provocar manchas de sangre en la carne con poca aceptabilidad posterior (Guerrero et al., 2013).

El tiempo de maduración de la carne afecta intensamente los atributos relacionados con la ternera y el color (Guerrero et al., 2013). Los períodos de maduración cortos (7-12 días) disminuyen los valores de la fuerza de cizallamiento, independientemente de la raza y la edad. Tiempos más largos incrementan la ternera, pero en una magnitud tal, que no resulta económicamente justificable (Schor et al., 2008)

La forma de conservación de la carne se relaciona con la extensión de la vida útil del producto y es un aspecto relevante para la industria cárnica y los consumidores. Se han desarrollado diversas técnicas de envasado al vacío o en atmósfera modificada con el fin de prevenir la aparición de fenómenos de oxidación en componentes susceptibles de la carne como lípidos y proteínas, y así mantener óptimas las características del producto (Armenteros, Ventanas S., Morcuende, Estévez y Ventanas J., 2012; Guerrero et al., 2013).

La comercialización y el consumo se asocian a los hábitos de los consumidores, quienes evalúan la calidad de la carne fundamentalmente por sus atributos sensoriales, aunque en la actualidad, se ha sumado el interés por la constitución química de la carne, en particular el contenido y composición de la grasa, debido a su posible influencia en la salud humana. El sabor es uno de los principales atributos considerados por los consumidores, junto con el color y la ternera, y que constituyen una importante influencia sobre la decisión de compra del producto (Schor et al., 2008; Gaviraghi, Deriu, Soggiu, Greppi, Bonizzi, & Roncada, 2009).

Todos estos criterios de calidad deben responder, a su vez, al mercado internacional que requiere un alto nivel de aseguramiento de la calidad en lo referente a la diversidad y aspectos relacionados con principios éticos, como la contaminación ambiental, la sustentabilidad del suelo y los problemas de bienestar animal en la producción de carne (García, 2003; Andersen et al.; 2005).

Como se ha mencionado, la carne argentina producida en pasturas tiene un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) que pueden ser fácilmente oxidados comprometiendo la calidad sensorial y nutricional, pero a su vez, exhibe un alto contenido de antioxidantes que retardan los procesos oxidativos que tienen lugar. La estabilidad frente a la oxidación es muy importante porque prolonga la vida útil del producto. Luego de la faena, se pierden las defensas antioxidantes de las células *in vivo*, por lo cual, es necesario que se alcance un estado antioxidante considerable antes del sacrificio del animal a fin de maximizar la protección de los lípidos musculares contra la peroxidación (Descalzo et al., 2005; Schor et al., 2008).

1.4. Procesos de oxidación

La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante. Las especies Reactivas del Oxígeno (ROS) son los potenciadores más importantes de la oxidación. ROS, es el término que se aplica colectivamente a todas aquellas especies químicas, radicales y no radicales que son agentes oxidantes, y/o que son fácilmente convertidas en radicales. Todos los radicales del oxígeno son ROS, pero no todas las ROS son radicales del oxígeno (Halliwell, 2006).

Dentro de los radicales libres, los más relevantes y frecuentes en los sistemas biológicos son el radical hidroxilo (OH^{\bullet}), el radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) y los radicales de compuestos

orgánicos, alcoxilo (RO^\bullet) y peroxilo (ROO^\bullet). Entre las especies reactivas no radicales se hallan el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los hidroperóxidos (ROOH) y el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) (Morrissey, Sheehy, Galvin, Kerry, & Buckley, 1998; González-San José, Muñiz Rodríguez y Valls Bellés, 2001; Halliwell, 2006; Londoño, 2012).

Un radical libre es una molécula, átomo o ion, con capacidad de existencia independiente por un breve período y que posee en su orbital más externo uno o más electrones desapareados. El campo magnético creado por su rotación (spin), no se compensa por la rotación en sentido inverso de un electrón apareado. Por ello, los radicales libres son especies que presentan una reactividad mayor que las correspondientes no radicales, lo que les permite reaccionar con átomos y/o moléculas estables de su entorno con el fin de alcanzar una configuración electrónica estable (Halliwell, Murcia, Chivico, & Auroma, 1995; Morrissey et al., 1998; González-San José et al., 2001).

Los procesos oxidativos pueden producir radicales libres que inician reacciones en cadena que son favorecidas por la luz y el oxígeno (Insani, Eyherabide, Grigioni, Sancho, Pensel, & Descalzo, 2008). Estas reacciones son terminadas por los antioxidantes que actúan quitando intermediarios del radical libre e inhiben otras reacciones de oxidación oxidándose ellos mismos. Los radicales libres pueden interactuar con sustancias celulares como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos dando lugar a alteraciones en sus propiedades estructurales, y eventualmente funcionales, que conducen a la lesión de los tejidos y la muerte celular (Halliwell et al., 1995; Morrissey et al., 1998; González-San José et al., 2001).

Los procesos mediados por radicales libres afectan predominantemente a los ácidos grasos insaturados en los lípidos, los grupos hemo de pigmentos, los aminoácidos de las proteínas y los dobles enlaces conjugados de las vitaminas (Insani et al., 2008).

En el organismo animal, estos radicales libres, pueden tener un origen exógeno o endógeno. Los de origen endógeno, no pueden evitarse por completo pues se generan durante el metabolismo aeróbico normal. Su producción se localiza en la cadena respiratoria, en los peroxisomas, en el sistema enzimático citocromo P-450, en las células fagocíticas, en la autoxidación de compuestos de carbono reducidos como aminoácidos, proteínas, lípidos, glúcidos y ácidos nucleicos, y la activación de ciertas enzimas del metabolismo intermediario como la hipoxantina y xantina oxidasa, aldehído oxidasa, monoamino oxidasa, ciclooxigenasa o lipoxigenasa (González-San José et al., 2001).

En las mitocondrias, la cadena respiratoria consume oxígeno que es reducido de manera secuencial hasta producir agua. Durante este proceso se producen accidentalmente, anión radical superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo (Morrissey et al., 1998). Los peroxisomas, que contienen, entre otras, las enzimas acil CoA oxidasa, urato oxidasa y dopamina β -hidroxilasa, generan peróxido de hidrógeno. El sistema enzimático citocromo P-450 constituye una defensa primaria contra varios xenobióticos y compuestos endógenos que incrementan la producción de radicales libres (González-San José et al., 2001; Pérez Jiménez, 2007).

Las células fagocitarias (monocitos, neutrófilos y macrófagos), que utilizan el sistema de la NADPH oxidasa, generan en forma deliberada anión superóxido para inactivar bacterias, parásitos o virus. El ion superóxido por reacción con protones da lugar a peróxido de hidrógeno, un oxidante que reacciona con la mayoría de las moléculas, especialmente con las que contienen -SH o Fe-sulfuro. También reacciona con metales de transición dando lugar al radical hidroxilo (OH^\bullet), el oxidante más potente encontrado en los sistemas biológicos (Morrissey et al., 1998; Pérez Jiménez, 2007). Cuando el metal involucrado es el Fe^{2+} , la reacción se conoce como

reacción de Fenton. En los sistemas vivos, la reacción que genera radicales hidroxilos, además de la de Fenton, es la reacción de Haber-Weiss (Pérez Jiménez, 2007):

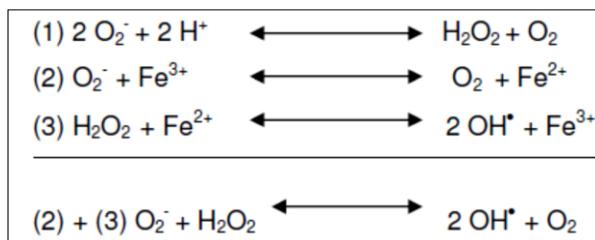


Figura 1. Esquema de formación de radicales hidroxilo (HO·) debido al efecto catalítico del hierro. (3): reacción de Fenton; (2)+(3): reacción de Haber-Weiss. Ref.: Pérez Jiménez, 2007.

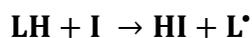
1.4.1. Oxidación de lípidos.

La oxidación lipídica no enzimática consiste en una reacción en cadena de radicales libres que consta de tres etapas: iniciación, propagación y terminación. Por este mecanismo, un radical libre puede inducir la oxidación de un número elevado de moléculas (Carreras Ferrer, 2004).

El proceso involucra la reacción con la forma más estable del oxígeno molecular, el oxígeno triplete (3O_2), que posee dos electrones desapareados con spin paralelos. Para poder reaccionar con otra molécula, según el principio de exclusión de Pauli, ésta debe poseer dos electrones desapareados con spin paralelos opuestos a los del oxígeno, lo que es poco probable. Por lo tanto, es necesaria la activación del oxígeno para que pueda participar en reacciones con moléculas orgánicas en estado singlete como los ácidos grasos (Kanner, 1994; Carreras Ferrer, 2004). Por esta causa, el proceso requiere la presencia de agentes iniciadores (I) que generen los primeros radicales libres lipídicos.

Iniciación: consiste en la sustracción de un átomo de hidrógeno (H) de un carbono metileno unido a un carbono flanqueado por dobles enlaces de un ácido graso poliinsaturado

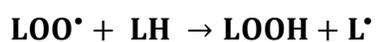
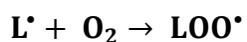
(LH) generando radicales libres lipídicos (L[•]), como se indica a continuación: (Morrissey et al., 1998; Céspedes Miranda y Castillo Herrera, 2008; Terrasa, 2012)



La susceptibilidad de los lípidos a la autooxidación depende del grado de insaturación de los ácidos grasos. El ácido linolénico (18:3 n-3) es 2,4 veces más reactivo que el ácido linoleico (18:2 n-6), el cual es, a su vez, 40 veces más reactivo que el ácido oleico (18:1 n-9). La oxidabilidad de los AGPI se relaciona con el número de grupos metileno presentes entre los dobles enlaces (Morrissey et al., 1998; Terrasa, 2012).

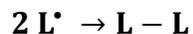
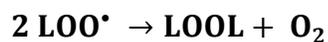
Los agentes iniciadores pueden ser la luz, el calor, el oxígeno molecular, otros ácidos grasos oxidados, metales de transición, sistemas enzimáticos o químicos productores de ROS, hierro asociado a ferritina, hierro “libre” (no proteico, no hemo) quelado a pequeñas moléculas, complejos Fe-O₂, como los iones ferrilos y perferrilos, que se originan por la reacción de proteínas hemo (hemoglobina y mioglobina) con el peróxido de hidrógeno (Kanner, 1994; Morrissey et al., 1998; Auqui Silvera, 2014).

Propagación: en esta fase tiene lugar una reacción en cadena con formación de más especies radicáticas y el daño a un número creciente de ácidos grasos. Los radicales alquílicos de los lípidos generados en la etapa de iniciación, reaccionan rápidamente con el oxígeno molecular para formar radicales peroxilo (LOO[•]) que pueden reaccionar posteriormente con otros ácidos grasos poliinsaturados adyacentes y originar un hidroperóxido o lipoperóxido (LOOH), que es el producto primario de la reacción, y un nuevo radical alquílico, de acuerdo a las siguientes ecuaciones (Céspedes Miranda y Castillo Herrera, 2008; Terrasa, 2012):



La primera reacción ocurre a mayor velocidad que la segunda, y debido a la estabilización por resonancia de los radicales alquílicos (L^{\bullet}), se generan diversos hidroperóxidos isómeros. La peroxidación del ácido araquidónico (20:4(5,8,11,14)) origina, además de hidroperóxidos, peróxidos cíclicos como los isoprostanoides. Algunos de ellos tienen efecto vasoconstrictor e inducen la mitosis en células musculares lisas (Céspedes Miranda y Castillo Herrera, 2008).

Terminación: en esta etapa, los distintos radicales que se formaron en las fases de iniciación y propagación reaccionan entre sí, en ausencia de oxígeno, para generar productos más estables, no radicales, como se representa en las reacciones siguientes (Terrasa, 2012):



En la Figura 2, se muestra un esquema que representa el mecanismo de peroxidación de los ácidos grasos polilinsaturados (AGPI) en presencia de radicales libres.

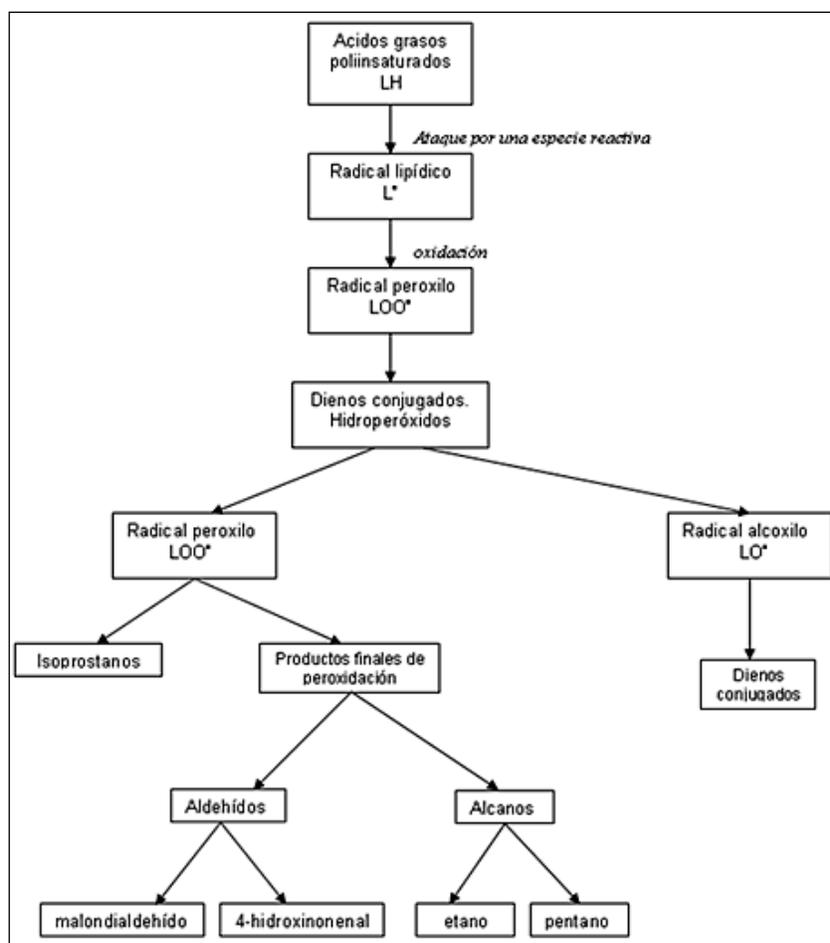
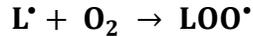
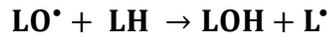
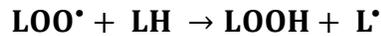
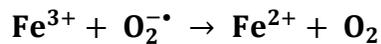


Figura 2. Esquema del mecanismo de peroxidación de los AGPI en presencia de radicales libres. Ref: Céspedes Miranda y Castillo Herrera, 2008.

Los hidroperóxidos (LOOH) formados en la fase de propagación son lábiles y se descomponen en presencia de iones metálicos, como hierro y cobre, para dar lugar a la formación de nuevos radicales libres y otros compuestos no radicales. Los radicales peroxilo (LOO^\bullet) y alcoxilo (LO^\bullet) que se originan, pueden provocar la sustracción de átomos de hidrógeno y formar, nuevamente, hidroperóxidos e hidróxidos (LOH) así como también radicales alquilo (L^\bullet), por lo tanto, la reacción en cadena no solo se propaga sino que se amplifica (Morrissey et al., 1998; Céspedes Miranda y Castillo Herrera, 2008; Terrasa, 2012). Las siguientes ecuaciones lo esquematizan:



A su vez, el ion metálico, puede ser reducido por reacción con el radical anión superóxido u otros reductores fuertes, como el ácido ascórbico, estableciendo un ciclo redox en el que el metal puede ser utilizado varias veces (Kanner, 1994; Morrissey et al., 1998).



Los compuestos no radicales que se producen, abarcan hidrocarburos, aldehídos, cetonas y alcoholes, muchos de los cuales son volátiles y generan olores desagradables. Los aldehídos, como el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal, pueden reaccionar con proteínas y ácidos nucleicos, lo que determina efectos citotóxicos y mutagénicos (Sasaki, Mitsumoto, & Kawabata, 2001). Todos los productos formados son potencialmente nocivos para la salud y pueden afectar negativamente el flavor, la textura y el valor nutricional, y en consecuencia, la calidad de los productos cárnicos (Armenteros et al., 2012).

1.4.2. Oxidación en la carne.

El daño oxidativo es el factor no microbiano más importante, responsable del deterioro de la calidad de los alimentos musculares (Descalzo et al., 2005).

Los procesos de oxidación que acontecen en la carne están determinados por la composición de sustancias pro-oxidantes (lípidos insaturados y mioglobina, entre otros) y de antioxidantes en el tejido muscular (vitamina E, pro-vitamina A, vitamina C, glutatión y enzimas antioxidantes), y se ven favorecidos por factores como la exposición al oxígeno, la luz, la temperatura y el crecimiento microbiano (Pensel, Insani, Descalzo y Rossetti, 2002; Cascone, 2005).

En estos procesos se ven afectados, en especial, las propiedades sensoriales de la carne (color, olor y sabor) que contribuyen significativamente, como ya se mencionó, a la percepción de su calidad y valor por parte del consumidor (Hur, Park, & Joo, 2007; Faustman, Sun, Mancini, & Suman, 2010).

Luego de la faena, y sin considerar aspectos fisiológicos que influyen sobre el balance de compuestos antioxidantes y pro-oxidantes *in vivo*, la calidad de la carne responde de manera directa a distintos procesos de deterioro resultantes de cambios bioquímicos *post mortem*, y fisico-químicos, por causa de diferentes prácticas de manejo, procesado y condiciones de almacenamiento (Hur et al., 2007; Faustman et al., 2010). En estos procesos se afectan principalmente los componentes lipídicos de la carne.

La estabilidad oxidativa del tejido muscular frente a la oxidación lipídica depende de varios factores. El más importante es el grado de insaturación de los lípidos, el tipo de músculo y el tiempo de maduración, a lo que hay que sumarle el genotipo, y el estado nutricional y sanitario del animal al momento del sacrificio (Renerre, Dumon, & Gatellier, 1996; Morrissey et al., 1998; Cifuni, Napolitano, Riviezzi, Braghieri, & Girolami, 2004; Braghieri, Cifuni, Girolami, Riviezzi, Marsico, & Napolitano, 2005).

La peroxidación autocatalítica, probablemente, comienza inmediatamente después del sacrificio (Buckley, Morrissey, & Gray, 1995). Los cambios bioquímicos durante la conversión del músculo en carne dan lugar a condiciones en las que la oxidación de los fosfolípidos insaturados de las membranas intracelulares, como las mitocondriales y microsomales, ya no es fuertemente controlada, y el equilibrio entre los factores pro-oxidantes y la capacidad antioxidante favorece la oxidación. Se producen cambios cuantitativos de varios metabolitos y de propiedades físicas que hacen que sea muy poco probable que los mecanismos de defensa disponibles en el animal vivo sigan actuando en el período posterior al sacrificio (Buckley et al., 1995; Morrissey et al., 1998).

Estos cambios involucran el cese de la circulación sanguínea, el descenso del pH debido al ácido láctico acumulado en los tejidos por acción del metabolismo anaeróbico, la inactivación del sistema enzimático antioxidante y de las proteínas de fase aguda que neutralizan hierro, la pérdida de la capacidad del retículo sarcoplasmático de acumular iones calcio, la ruptura de la estructura de las miofibrillas por acción de proteasas endógenas dependientes de calcio, la destrucción parcial de los compartimientos celulares, la liberación de hierro quelado lo que inicia reacciones en cadena catalizadas por este metal, y con ello, la oxidación de los lípidos de membrana (Morrissey et al. 1998; Ouali, Herrera-Mendez, Coulis, Becila, Boudjellal, Aubry, & Sentandreu, 2006).

La velocidad y el grado de oxidación en alimentos musculares están influidos por hechos previos a la faena como el estrés animal y por eventos posteriores a la misma, como la caída rápida del pH *post mortem*, la temperatura de la canal, el acortamiento por el frío y las técnicas para incrementar la terneza como la estimulación eléctrica. Durante la manipulación, procesamiento y almacenamiento de la carne fresca, acciones que comprometan la integridad de

las membranas, como el deshuesado mecánico o picado, liberan hierro a partir de fuentes de alto peso molecular (hierro hemo) que puede catalizar directamente la oxidación de lípidos. Además, este hierro hemo, queda disponible para unirse a compuestos de bajo peso molecular tales como nucleótidos (adenosina difosfato, ADP), pirofosfato o aminoácidos libres, para formar quelatos responsables de la catálisis de la oxidación lipídica en los tejidos (Buckley et al., 1995; Morrissey et al., 1998; Cascone, 2005; Descalzo et al., 2005).

La propagación de la peroxidación de lípidos en las membranas promueve la oxidación de la mioglobina a metamioglobina, lo que resulta en el deterioro del color (marrón oscuro), formación de olores rancios y otros sabores desagradables de las carnes frescas (Mercier et al., 2004; Descalzo et al., 2005; Faustman et al., 2010). El hecho de que se haya documentado el retraso simultáneo de la oxidación de lípidos y la decoloración de la carne por mediación antioxidante, ha proporcionado certeza de que existe un vínculo entre ambos procesos (Faustman et al., 2010).

Numerosas investigaciones han demostrado que los niveles de oxidación lipídica en la carne pueden verse influenciados por el tipo de alimentación del ganado. La carne de animales alimentados con pasturas, por lo general, muestra niveles más bajos de oxidación lipídica que la de animales alimentados con concentrados (Lynch, Kerry, Buckley, Faustman, & Morrissey, 1999; Realini, Duckett, Brito, Dalla Rizza, & De Mattos, 2004; Mercier et al., 2004; Gatellier et al., 2005; Descalzo et al., 2005; Insani et al., 2008). Esto puede explicarse porque la carne procedente de la alimentación a pasto se asocia con un mayor contenido de antioxidantes en forma de D- α -tocoferol, carotenoides y flavonoides, que estabilizan los ácidos grasos (Descalzo & Sancho, 2008).

Los radicales libres del oxígeno también están involucrados en la oxidación de proteínas. Existen diferentes formas de inducir la oxidación de proteínas y diversos tipos de modificación química oxidativa, dentro de los cuales, la formación de compuestos carbonílicos, es uno de los más importantes. Sin embargo, la relevancia de la carbonilación de proteínas de la carne aún es poco conocida (Estévez, 2011).

Las ROS, pueden desencadenar la oxidación de residuos de aminoácidos específicos de cadenas laterales y/o del esqueleto de las proteínas, lo que puede conducir a cambios en las propiedades físicas de éstas que resultan en la fragmentación, agregación, pérdida de solubilidad y funcionalidad, y disminución de la susceptibilidad a la proteólisis (Berlett & Stadtman, 1997; Mercier et al., 2004; Estévez, 2011).

Varias ROS tales como los radicales superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroperóxido (HO_2^{\bullet}) e hidroxilo (OH^{\bullet}) y otras especies no radicales como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) e hidroperóxidos (ROOH), son reconocidos como potenciales iniciadores de la oxidación de proteínas (Berlett & Stadtman, 1997).

Los componentes naturales del tejido muscular como los lípidos insaturados, los pigmentos hemo, los metales de transición y las enzimas oxidativas son precursores potenciales o catalizadores para la formación de ROS y, por lo tanto, desempeñan un papel relevante en la iniciación de la oxidación proteica de los músculos (Estévez, 2011).

Existen evidencias de que la oxidación catalizada por iones metálicos, como Fe^{3+} o Cu^{2+} , es capaz de promover la formación de carbonilos a través de una reacción mediada por ROS. Según este mecanismo, los metales de transición reducirían el peróxido de hidrógeno para formar radical hidroxilo por medio de la reacción de Fenton. La presencia de sitios específicos de unión a metal en las proteínas explica que, residuos de aminoácidos situados en estos lugares, sean

especialmente sensibles a la oxidación catalizada por metales (Cecarini, Gee, Fioretti, Amici, Angeletti, Eleuteri, & Keller, 2007).

Las modificaciones biológicas originadas por la oxidación, alteran propiedades funcionales de las proteínas del músculo como la capacidad de retención de agua, lo que incide luego en la formación de geles proteicos más lábiles o emulsiones menos estables, la terneza, el sabor y el valor nutritivo (Descalzo & Sancho, 2008; Insani y col., 2008; Estévez, 2011).

En cuanto a la influencia del tipo de dieta suministrada a los animales sobre la oxidación de las proteínas, Mercier et al. (2004) observaron que, aunque la dieta de pasturas redujo considerablemente la oxidación de lípidos, no hubo ningún efecto significativo sobre la oxidación de proteínas. Asimismo, Insani et al. (2008), demostraron que las diferencias dietarias en el ganado tuvieron poca repercusión sobre la oxidación de proteínas en la carne fresca. Sin embargo, la influencia de factores *in vivo*, como el sistema de cría y el régimen de alimentación en la ocurrencia de la oxidación de proteínas en los alimentos musculares, ha sido poco estudiada (Estevez, 2011).

1.4.3. Evaluación de la oxidación lipídica.

La medida de la extensión de la oxidación lipídica en carne y productos cárnicos puede realizarse por medio del monitoreo de los cambios en sus propiedades organolépticas, físicas o químicas. Aunque hay numerosos métodos de análisis, no existe uno que sea uniforme y estándar para la detección de todos los cambios oxidativos en todos los productos alimenticios. Los métodos disponibles para evaluar la oxidación de lípidos en los alimentos se pueden clasificar en cinco grupos en función de lo que miden: absorción de oxígeno, pérdida de sustratos iniciales, formación de radicales libres, y formación de productos de oxidación primarios (hidroperóxidos)

y secundarios (Shahidi & Zhong, 2005). Dentro de las técnicas analíticas para evaluar los cambios primarios de la oxidación se pueden citar, entre otras:

- Índice de peróxidos: titulación iodométrica que se basa en la oxidación del ion yoduro (I⁻) por acción de los hidroperóxidos (ROOH).
- Complejos del ion férrico: basados en la capacidad de los hidroperóxidos para oxidar el ion ferroso a férrico en medio ácido y formación de complejos coloreados que se detectan espectrofotométricamente.
- Dienos y trienos conjugados: método espectrofotométrico que determina estos compuestos por el aumento de absorción a 234 nm y 268 nm, respectivamente.

Las técnicas analíticas que evalúan cambios secundarios miden: compuestos carbonílicos, malondialdehído (MDA) por el ensayo del ácido 2-tiobarbitúrico (2-TBA), otros aldehídos (p-anisidina), ácidos orgánicos volátiles (mide cambios en la conductividad, automatizado), hidrocarburos (etano o pentano) y carbonilos volátiles (cromatografía gaseosa) (Shahidi & Zhong, 2005).

La determinación de productos secundarios, como índice de la oxidación lipídica, es más apropiada debido a que estos productos son los que están asociados a la generación de sabores y olores indeseables (Terrasa, 2012).

El método más utilizado para determinar el grado de oxidación de lípidos en alimentos y en particular en la carne, es el ensayo del ácido 2-tiobarbitúrico (2-TBA) que mide la cantidad de malondialdehído (MDA) que se produce como resultado de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y que generalmente presenta una alta correlación con la calidad sensorial (Cortinas, Barroeta, Villaverde, Galobart, Guardiola, & Baucells, 2005; Shahidi & Zhong, 2005; Auqui Silvera, 2014).

Sin embargo, sólo algunos productos de este proceso generan MDA, y éste, no es el único producto final de la formación de lipoperóxidos y de su descomposición, ni una sustancia generada exclusivamente a través de la peroxidación de lípidos (Grotto, Santa María, Valentini, Paniz, Schmitt, & García, S.C., 2009). Otros aldehídos (alquenoales y 2,4-alcadienoales) formados durante esta reacción pueden también reaccionar con el 2-TBA, por lo que es más adecuado utilizar la denominación “Sustancias Reactivas al Acido Tiobarbitúrico” (TBARS) (Shahidi & Zhong, 2005).

La prueba de TBARS es un instrumento válido para evaluar el estado oxidativo de los alimentos a pesar de sus limitaciones, como la falta de especificidad y sensibilidad, ya que se la considera una técnica sencilla y rápida para evaluar el estatus oxidativo de un sistema que puede verse afectado por el almacenamiento o el procesamiento, y con tal finalidad se la utiliza con frecuencia (Grau, Guardiola, Boatella, Barroeta, & Codony, 2000; Spuch y Judis, 2004; Cortinas et al., 2005; Shahidi & Zhong, 2005).

En esta técnica, una molécula de MDA se condensa con dos moléculas de ácido 2-tiobarbitúrico (4,6-dihidroxipirimidina-2-tiol), formando un complejo de color rosa fluorescente de MDA-TBA muy estable en condiciones de bajo pH y alta temperatura, que se puede cuantificar por fluorimetría o por espectrofotometría de absorción visible en su máximo de absorción (530-535 nm), siendo la intensidad del color directamente proporcional a la concentración de MDA (Shahidi & Zhong, 2005; Auqui Silvera, 2014).

Las concentraciones de MDA se obtienen a partir de una recta de calibrado previamente preparada con diferentes concentraciones de TEP (1,1,3,3-tetraetoxipropano), el cual sufre un proceso de hidrólisis y genera MDA (Auqui Silvera, 2014). El ensayo del 2-TBA puede realizarse sobre el extracto ácido, el destilado o el exudado desproteínizado del alimento. El

mejor método para estimar el contenido de MDA en muestras de carne es la extracción ácida acuosa con ácido tricloroacético (TCA) debido a que la carne no está expuesta a tratamiento térmico (Fernández, Pérez-Álvarez, & Fernández-López, 1997).

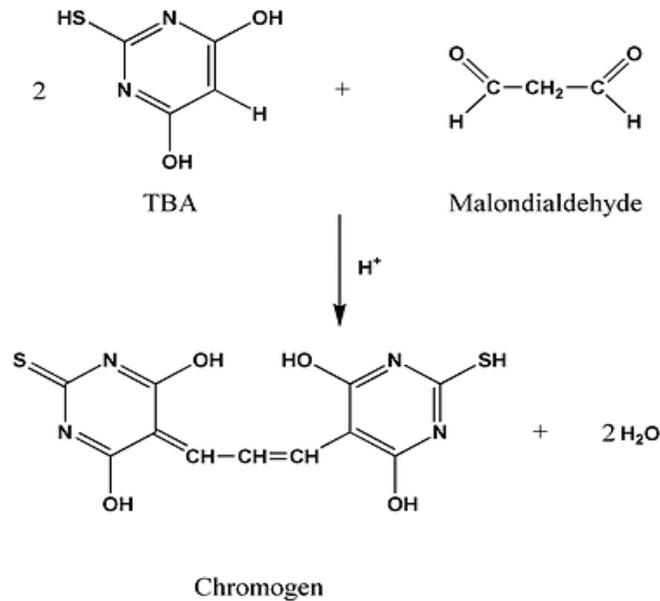


Figura 3. Reacción del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) con malondialdehído (MDA) para formar un complejo de color rosado. Ref: Antolovich, M., Prenzler, P., Patsalides, E., Mc Donald, S. & Robards K., 2002.

1.5. Capacidad antioxidante del tejido muscular

Frente a los procesos de oxidación que tienen lugar en el organismo animal, éste ha desarrollado varios mecanismos de defensa contra las ROS que incluyen: la remoción de éstas por acción de enzimas, el secuestro de metales pro-oxidantes por proteínas de transporte y almacenamiento, la atenuación del daño celular por medio de la expresión de proteínas del choque térmico (HSP) y la estabilización de radicales libres con donadores de protones o electrones (Morrissey et al., 1998; Londoño, 2012).

El sistema que pone en marcha estos mecanismos está integrado por antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que actúan en forma conjunta para contrarrestar la acción de los pro-oxidantes en los músculos, pero el tejido muscular *post mortem* difiere del tejido vivo en que no puede restaurarse. Por lo tanto, la estabilidad oxidativa del músculo esquelético dependerá de la composición, concentración y reactividad de los sustratos susceptibles de oxidación, de los catalizadores de ésta y de los antioxidantes, es decir, del balance integral de sus componentes pro-oxidantes y antioxidantes. Cuando el equilibrio se pierde desaparece el control sobre los procesos oxidativos y los componentes celulares, como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, se ven afectados. La estabilidad oxidativa puede incrementarse mediante la protección de los antioxidantes endógenos, evitando su pérdida o su inactivación (Mercier et al., 2004; Gatellier, Mercier, & Renner, 2004; Carreras Ferrer, 2004).

Entre los antioxidantes enzimáticos se encuentran las enzimas superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT). Los antioxidantes no enzimáticos comprenden sustancias hidrosolubles y liposolubles como la vitamina E (α -tocoferol) y los carotenoides. La vitamina C, polifenoles, ubiquinoles y tioles celulares son antioxidantes hidrosolubles (Descalzo & Sancho, 2008). Además, pequeños péptidos como glutatión, carnosina y anserina forman parte de estos sistemas de protección endógenos (Gatellier et al., 2004). Las concentraciones de los antioxidantes endógenos dependen de la especie animal, del tipo de músculo y de la dieta (Insani et al., 2008).

Estos compuestos pueden actuar como antioxidantes primarios o como antioxidantes secundarios. Los antioxidantes primarios rompen la cadena de propagación reaccionando directamente con los radicales libres, en cuyo caso, suelen dar lugar a un nuevo radical menos reactivo que el radical libre original. Principalmente son compuestos fenólicos que pueden donar

un átomo de hidrógeno o un electrón al radical libre. Como consecuencia de esta reacción, el antioxidante se oxida formando un radical estable que no propaga la reacción. Los antioxidantes primarios pueden ser hidrosolubles como el glutatión, la vitamina C, la cisteína y el ácido úrico, o liposolubles como el α -tocoferol, el β -caroteno, la luteína y otros carotenoides (Morrissey et al., 1998; Carreras Ferrer, 2004; Armenteros et al., 2012).

Los antioxidantes secundarios o preventivos actúan inactivando especies activas y posibles precursores de radicales libres, evitando así la generación de éstos y, en consecuencia, reduciendo la tasa de iniciación de la peroxidación. Dentro de este grupo se incluyen las enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GPx) y las proteínas transportadoras y de almacenamiento (transferrina, ceruloplasmina, albúmina, haptoglobina, lactoferrina) y el dipéptido carnosina. Estos compuestos secuestran iones metálicos (hierro, cobre) formando complejos de coordinación estables de manera que los metales no puedan catalizar la conversión del anión radical superóxido y del peróxido de hidrógeno a radical hidroxilo, más perjudicial (Carreras Ferrer, 2004; Terrasa, 2012)

La vitamina E se considera como el principal compuesto antioxidante soluble en lípidos debido a su singular localización en las membranas celulares. Por el contrario, el glutatión (GSH) es el principal antioxidante endógeno soluble en agua que es crucial para el mantenimiento de enzimas, antioxidantes exógenos como las vitaminas E y C, y otros componentes celulares, en un estado reducido (Cecarini et al., 2007).

1.5.1. Evaluación de la capacidad antioxidante.

El potencial antioxidante en los sistemas biológicos está determinado por la composición en antioxidantes y las propiedades antioxidantes de sus constituyentes. La actividad antioxidante

(CAO) es la capacidad de un compuesto para inhibir la degradación oxidativa. En el contexto de la inhibición de procesos de reacción en cadena mediados por radicales libres, como la peroxidación lipídica, un antioxidante actúa gracias a su habilidad para reaccionar con estos radicales y, por lo tanto, recibe el nombre de antioxidante terminador de cadena (Descalzo & Sancho, 2008; Londoño, 2012).

Por otra parte, una alta actividad anti-radicalaria (en inglés: *scavenger*) no siempre correlaciona con una alta actividad antioxidante. La primera, está determinada por la reactividad de un antioxidante frente a los radicales libres y caracteriza la dinámica de partida de la antioxidación para una concentración establecida de un antioxidante o mezcla de antioxidantes, mientras que la actividad antioxidante, mide la capacidad para retardar la degradación oxidativa (Descalzo & Sancho, 2008).

En consecuencia, la capacidad antioxidante está determinada por la reactividad química y la aptitud para acceder al sitio de reacción del antioxidante, y por la estabilidad de los productos que se forman luego del proceso de estabilización de los radicales libres, es decir, que solo proporciona información acerca de la duración de la acción antioxidante (Londoño, 2012).

Hasta el momento no existen métodos unificados para medir capacidad antioxidante debido a la disparidad de condiciones en las cuales se desarrollan estas metodologías, además de la complejidad de los sistemas y de la diversidad de matrices que necesitan ser evaluadas. Cabe señalar que ningún método por sí solo puede reflejar la “capacidad antioxidante total” de una muestra, ya que esta medida debe expresar la actividad de los antioxidantes hidrofílicos y lípofílicos, distinguir los distintos mecanismos antioxidantes y evaluar la reactividad de los antioxidantes presentes en la muestra frente a diferentes especies reactivas (Prior, Wu, & Schaich, 2005; Huang, Ou, & Prior, 2005).

Los antioxidantes pueden estabilizar radicales libres siguiendo dos mecanismos, uno, llamado transferencia de átomos de hidrógeno (TAH) y, otro, denominado transferencia de electrones (TE), los cuales pueden ocurrir de forma paralela. Ambos dan como resultado la estabilización del radical libre, sin embargo, el mecanismo que domina un sistema está determinado por la estructura química del antioxidante, su solubilidad y coeficiente de partición, la energía de disociación de enlace (EDE), el potencial de ionización (PI) y las condiciones del medio de reacción, como el pH. Una manera de clasificar los métodos para evaluar actividad antioxidante, es en base a estos mecanismos (Prior, Wu, & Schaich, 2005; Huang, Ou, & Prior, 2005).

En este trabajo, la determinación de la capacidad antioxidante se efectuó con el método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), método que sigue un mecanismo TE, y que originalmente fue desarrollado para medir el poder reductor total de fluidos biológicos como el plasma, y se ha aplicado a bebidas, extractos de fruta, vegetales liofilizados y propóleos, entre otros (Ou, Huang, Hampsch-Woodill, Flanagan, & Deemer, 2002; Cottica, Sawaya, Eberlin, Franco, Zeoulae, & Visentainera, 2011).

La técnica se basa en una reacción redox en la que compuestos antioxidantes presentes en la muestra, tales como: α -tocoferol, vitamina C, un análogo hidrosoluble de la vitamina E denominado Trolox, ácido úrico, bilirrubina, compuestos fenólicos y flavonoides, ácidos grasos poliinsaturados, etc., pueden reducir el complejo 2,4,6-tripiridiltriazina-férrico (Fe^{3+} -TPTZ) de color naranja, que se emplea estequiométricamente en exceso, a ferroso (Fe^{2+} -TPTZ) de color azul. Cuanto más elevado sea el valor medido de FRAP, mayor será el contenido en compuestos antioxidantes de la muestra que podrían reducir el ion férrico a ion ferroso (Benzie & Strain,

1996; Benzie & Strain, 1999; Pulido, Bravo, y Saura-Calixto, 2000; Saura-Calixto & Goñi, 2006).

Se ha cuestionado que la capacidad para reducir el hierro tiene poca relación con la estabilización de radicales libres mediada por la mayoría de los antioxidantes, que ocurre por transferencia de hidrógeno. Sin embargo, la oxidación o reducción de radicales para formar iones puede detener la oxidación en cadena, por lo tanto, el poder reductor refleja la capacidad de los compuestos de regular el estado redox del plasma o tejidos (Prior et al., 2005; Huang et al., 2005).

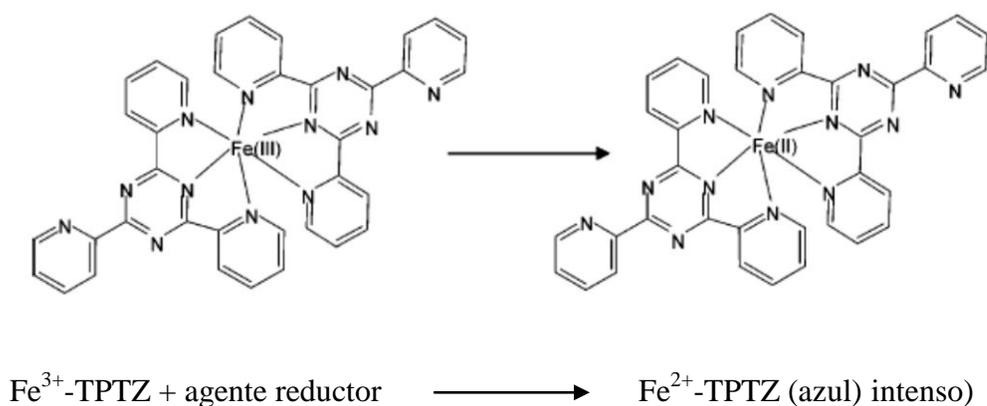


Figura 4. Reacción del ensayo FRAP. Ref: Prior, Wu & Schaich, 2005.

La reducción se lleva a cabo en medio ácido (pH 3,6) para mantener el hierro en forma soluble, y el complejo $\text{Fe}^{2+}\text{-TPTZ}$ que desarrolla un color azul intenso, presenta máxima absorción a 593 nm (Prior et al., 2005). La reacción detecta compuestos con potenciales redox < 0,7 V y se estima que el poder reductor está correlacionado con el grado de hidroxilación y conjugación en polifenoles. Sin embargo, FRAP no puede detectar compuestos que actúan por el mecanismo TAH, subestimando el potencial antioxidante de muestras que contengan, en particular, tioles y carotenoides (Prior et al., 2005; Magalhães, Segundo, Reis, & Lima, 2008).

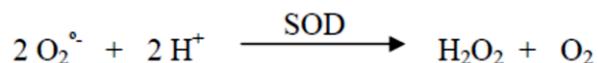
Esta técnica es sencilla y económica, pero como inicialmente fue diseñada para la determinación de antioxidantes hidrosolubles (Prior et al., 2005), se debió desarrollar una metodología para diferenciar la actividad antioxidante total en las fracciones hidrosolubles y liposolubles de la matriz carne (Mahecha, Dannenberger, Nuernberg, K., Nuernberg, G., Hagemann, & Martin, 2010).

1.5.2. Antioxidantes enzimáticos.

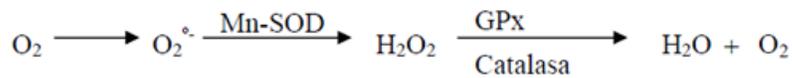
Las enzimas antioxidantes constituyen el principal mecanismo de defensa celular frente al daño oxidativo *in vivo*. En el músculo esquelético bovino, las enzimas más importantes y sobre las que se ha informado de su actividad son, la catalasa (CAT), la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GPX) (Gatellier et al., 2004; Descalzo, Rossetti, Grigioni, Irueta, Sancho, Carrete & Pensel, 2007; Insani et al., 2008; Descalzo & Sancho, 2008).

Luego del desangrado del animal, las células ingresan en un estado de carencia de oxígeno y nutrientes, y en esta condición, solo puede ser considerada la actividad enzimática remanente al inicio de la muerte celular (Descalzo & Sancho, 2008). Según Gatellier et al. (2004), estas enzimas antioxidantes son relativamente estables en la carne durante el almacenamiento refrigerado, en consecuencia, solo pueden ofrecer protección contra los radicales libres durante un breve tiempo *post mortem*. Por esa razón, la investigación sobre la actividad antioxidante de la carne muestra resultados diversos (Descalzo & Sancho, 2008).

La superóxido dismutasa (SOD) cataliza la dismutación del anión superóxido, uno de los productos secundarios de la cadena respiratoria en las mitocondrias, en oxígeno y peróxido de hidrógeno (Cecarini, 2007), como se puede observar en la siguiente reacción:

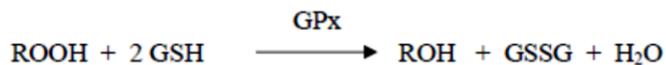


La familia de la SOD incluye tres enzimas distintas, Cu/Zn-SOD (SOD-1) que se expresa constitutivamente en todas las células de mamíferos y se localiza en el citosol y el núcleo, la Mn-SOD (SOD-2) mitocondrial y la SOD-3 extracelular. El producto final de cualquiera de las tres enzimas es el H₂O₂, que es convertido en agua y oxígeno molecular por la catalasa (CAT) presente en los peroxisomas y la glutatión peroxidasa (GPX), minimizando de este modo la producción de radical hidroxilo (Morrissey et al., 1998; Cekarini et al., 2007; Descalzo & Sancho, 2008), de acuerdo a las siguientes reacciones:



SOD y CAT son enzimas acopladas, pero mientras CAT descompone el peróxido de hidrógeno, GPX puede descomponer, además de éste, a los peróxidos lipídicos formados durante las reacciones de oxidación (Insani et al., 2008).

Las glutatión peroxidasas (GPX) son seleno-proteínas que catalizan la reducción de los hidroperóxidos utilizando como cofactor al glutatión reducido (GSH), según la siguiente reacción:



El glutatión oxidado (GSSG) se reduce, regenerando GSH, en una reacción catalizada por la glutatión reductasa (GR) que utiliza NADP reducido como cofactor. La forma reducida del glutatión (GSH) también puede ser oxidada directamente por peróxidos orgánicos o H₂O₂ (Descalzo & Sancho, 2008).

La familia de las GPX comprende cuatro enzimas caracterizadas por diferencias en su localización (citosólica, plasmática, gastrointestinal e hidroperóxido fosfolipídica) y estructuras moleculares. La glutatión peroxidasa citosólica (cGPX) se expresa de forma ubicua, funciona en

el citosol y la mitocondria y reacciona sólo con hidroperóxidos solubles como el H_2O_2 . La enzima no puede metabolizar los hidroperóxidos de ácidos grasos presentes en los fosfolípidos. Para poder actuar necesita de la actividad de la fosfolipasa A2 que libera ácidos grasos de los fosfolípidos. En cambio, la glutatión peroxidasa hidroperóxido fosfolipídica (GPX-PH) tiene capacidad para desactivar una amplia gama de hidroperóxidos de fosfolípidos integrados en las membranas celulares (Cecarini et al., 2007).

Varias investigaciones (Mercier et al., 2004; Gatellier et al, 2004; Descalzo et al., 2007; Insani et al., 2008; Mahecha, Nuernberg, K., Nuernberg, G., Martin, Hubbermann, Knoeller, ..., Dannenberger, 2011) han demostrado que la actividad de estas enzimas antioxidantes se modifica según el tipo de dieta (pastura o concentrado) suministrada a los bovinos.

Otra familia de peroxidases, las peroxirredoxinas (PRXs), contienen un residuo de cisteína (Cys47) conservado que se somete durante la catálisis a un ciclo de oxidación dependiente de peróxidos, y de reducción, tiol dependiente. Las células de mamíferos expresan seis isoformas de PRXs (1 a 6), que se clasifican en tres subgrupos (2-Cys, 2-Cys atípica y 1-Cys) en función del número y posición de los residuos de Cys que participan en la catálisis (Rhee, Chae, & Kim, 2005).

Dentro del grupo 1-Cys se halla la peroxirredoxina 6 (PRDX6) o proteína antioxidante 2 (AOXP2), que se localiza en el citosol y organelas ácidas de las células, y es la única de las PRXs que se expresa en todos los órganos de mamíferos con un nivel particularmente alto en el pulmón (Manevich & Fisher, 2005).

PRDX6 es una enzima bifuncional que presenta actividades de glutatión peroxidasa y de fosfolipasa A2. Utiliza GSH como donador de electrones para reducir el peróxido de hidrógeno y otros hidroperóxidos orgánicos, incluyendo hidroperóxidos de fosfolípidos. La oxidación de la

Cys47 a un ácido sulfónico durante la catálisis, requiere su reciclaje de nuevo a tiol, lo que sucede por la catálisis de pi-glutación S-transferasa (pi-GST) con GSH, que regenera la enzima activa. PRDX6 se diferencia del resto de las enzimas 1-Cys en el ciclo de regeneración, ya que estas últimas son reducidas por ácido ascórbico en vez de por GSH. Esta enzima, también expresa actividad de fosfolipasa A2 que es independiente de iones calcio y máxima a pH ácido (Manevich & Fisher, 2005; Schremmer, Manevich, Feinstein, & Fisher, 2007).

Algunos trabajos en los que se usaron modelos de expresión de la proteína PRDX6 alterada, tanto a nivel celular, de órganos, como de organismos animales completos, han demostrado que es una importante enzima antioxidante con niveles de protección que superan las atribuidas a GSH peroxidasa (GPx1) (Manevich & Fisher, 2005). Estos autores postularon que la función de defensa antioxidante de la proteína es desempeñada principalmente por medio de la reparación de las membranas celulares dañadas a través de la reducción de fosfolípidos peroxidados.

Asimismo, se ha observado que esta enzima es altamente inducible por el estrés oxidativo, sin embargo, el mecanismo de dicha regulación no ha sido totalmente esclarecido. Un estudio realizado en una línea de células epiteliales de pulmón humano (A549) y de células epiteliales alveolares de rata, determinó que hubo un aumento en la expresión de ARNm de PRDX6 de una forma dependiente de la exposición a concentraciones crecientes de H₂O₂ (entre 50 y 1000 µM durante 12 hs) (Schremmer et al., 2007; Chowdhury, Mo, Gao, Kazi, Fisher, & Feinstein, 2009).

1.5.3. Antioxidantes no enzimáticos: vitamina E

La vitamina E, un nutriente esencial para los vertebrados, es el término genérico utilizado para describir ocho compuestos liposolubles que se encuentran en todos los organismos fotosintetizadores, muy abundantes en los aceites vegetales. Cuatro de ellos se denominan tocoferoles (-forma RRR-, del α , β , γ y δ tocoferol), y los otros cuatro, tocotrienoles (-forma RRR-, del α , β , γ y δ tocotrienol). Estos compuestos son isómeros y se diferencian unos de otros por su estructura química, como se muestra en la Figura 5 (Zingg, 2007).

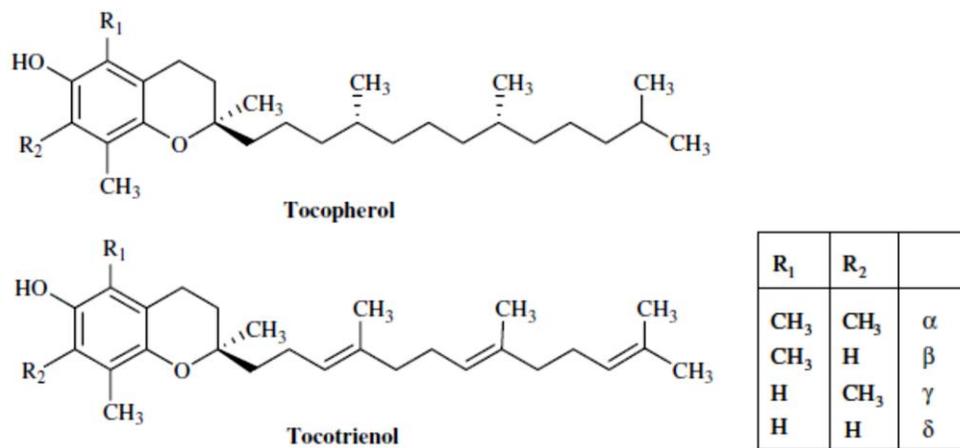


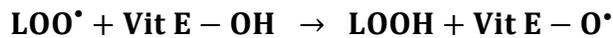
Figura 5. Estructura química de isómeros naturales de la vitamina E. Ref: Zingg, 2007.

La vitamina E posee un grupo hidroxilo fenólico responsable de su actividad estabilizadora de radicales libres y una cadena hidrocarbonada (fitil en los tocoferoles y prenil en los tocotrienoles) que favorece su inserción en la región no polar de las membranas. Su carácter hidrofóbico le confiere un alto potencial como antioxidante en sistemas lipídicos donde actúa como interruptor de cadena (*chain-breaking*), impidiendo la ulterior auto-oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) en las membranas o lipoproteínas (Traber, 2007; Londoño, 2012).

En la mayoría de los tejidos y el plasma de los organismos superiores, el isómero con más alta concentración es el RRR- α -tocoferol, con excepción de la piel y el músculo, donde el

contenido de γ -tocoferol también es elevado. Esto se debe a que existe una vía de captación selectiva del α -tocoferol mediada por la proteína de transferencia del α -tocoferol (α -TTP) que lo concentra en el plasma, mientras que los otros tocoferoles y tocotrienoles son metabolizados y excretados (Zingg, 2007).

La vitamina E desempeña su función antioxidante eliminando los radicales peroxilo (LOO^\bullet) formados por la oxidación de los hidroperóxidos de lípidos (LOOH), como podría ocurrir en presencia de metales libres tales como hierro y cobre. Los radicales peroxilo reaccionan más rápido con el α -tocoferol reducido (Vit E-OH) que con los AGPI, para formar la vitamina E radical. El radical tocoferilo (Vit E-O $^\bullet$) se estabiliza por resonancia y, como es poco reactivo como para reaccionar con los ácidos grasos poliinsaturados, actúa en la reacción de peroxidación lipídica como terminador de cadena (Traber, 2007; Londoño, 2012).



El radical tocoferilo reacciona con vitaminas, en particular con la vitamina C, u otros donantes de hidrógeno como los tioles, sobre todo con el glutatión, regenerando la vitamina E en su estado reducido como se representa en la Figura 6 (Traber, 2007; Descalzo & Sancho, 2008; Céspedes Miranda y Castillo Herrera, 2008)

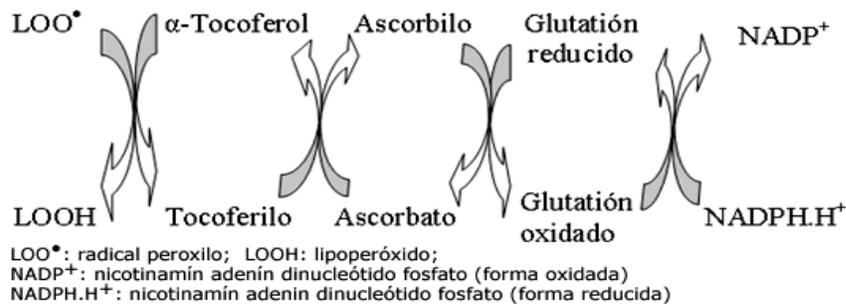
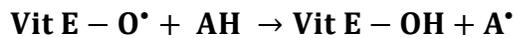


Figura 6. Acción del tocoferol sobre peróxidos lipídicos y su regeneración por ácido ascórbico y glutatión reducido. Ref: Céspedes Miranda y Castillo Herrera, 2008.

La concentración de α -tocoferol en los tejidos animales responde a la captación dietaria lo que depende, en última instancia, de los factores que controlan su transporte intra y extracelular. La absorción, transporte y distribución de vitamina E está ligada a la de los lípidos de la dieta y al metabolismo de las lipoproteínas (Döring, Rimbach, & Lodge, 2004).

La vitamina E se absorbe en el intestino y es incorporada junto a otros lípidos de la dieta en los quilomicrones (QM) sintetizados en los enterocitos, los cuales pasan a la circulación a través del sistema linfático. Durante la circulación, los triglicéridos de los QM son hidrolizados por la lipoproteína lipasa endotelial (LPL). Como resultado, se obtienen ácidos grasos libres y lipoproteínas de menor tamaño denominadas quilomicrones remanentes (QMr). En este punto, la vitamina E puede quedar en las lipoproteínas circulantes o transferirse a los tejidos periféricos. Los QMr adquieren apolipoproteína E (Apo E) y son recogidos por el hígado a través del receptor de Apo E (Döring et al., 2004; Traber, 2007).

Una vez internalizada, la vitamina E tiene distintos destinos potenciales. La proteína de transferencia de α -tocoferol (α -TTP), una proteína citosólica hepática, une selectivamente al RRR- α -tocoferol para ser secretado, a continuación, en las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Las VLDL enriquecidas en α -tocoferol ingresan en la circulación y son hidrolizadas nuevamente por LPL, proceso durante el cual se transforman en lipoproteínas de baja densidad (LDL), liberando α -tocoferol en los tejidos periféricos. Los tejidos también reciben α -tocoferol por medio de la internalización de las LDL a través de la vía del receptor de LDL que reconoce la apoproteína B (Apo B). Por lo tanto, la función de α -TTP es regular los niveles de α -tocoferol en la circulación y en los tejidos periféricos (Azzi, Gysin, Kempná, Munteanu, Negis, Villacorta, Visarius, & Zingg, 2004; Döring et al., 2004; Koh, Takitani, Miyazaki, Yamaoka, & Tamai, 2013). Se ha observado que en el hígado, α -TTP se reduce por deficiencia de α -tocoferol,

mientras que α y δ -tocoferol inducen su expresión, aunque los factores de transcripción implicados todavía no se han identificado (Azzi et al., 2004). Posteriormente, se han descrito funciones de la vitamina E no relacionadas con su actividad antioxidante y que la involucran con la regulación de varios genes (citocromo P450 (CYP3A), CD36, tropomiosina, colágeno (α 1), factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF), etc), incluyendo a α -TTP (Azzi, Meydani, S.N., Meydani, M., & Zingg, 2016).

Luego de que el α -tocoferol ingresa en las células de los tejidos periféricos, es unido selectivamente por la proteína asociada al α -tocoferol (α -TAP), al menos en aquellos tejidos que no expresan α -TTP. Esta proteína citosólica se expresa de manera ubicua y presenta homología estructural con α -TTP, mostrando igual que ésta, una alta afinidad por el α -tocoferol por sobre los otros isómeros de la vitamina. La función de la proteína α -TAP en el transporte intracelular de α -tocoferol aun no está totalmente esclarecida, pero varios estudios la implican en la transferencia de α -tocoferol al núcleo para la regulación de la expresión génica (Azzi et al., 2004; Döring et al., 2004). Yamauchi et al. (2001), utilizando un sistema de expresión de la proteína de fusión TAP-GFP (green fluorescent protein), constataron que α -TAP se transloca desde el citosol al núcleo de una forma dependiente del α -tocoferol y que α -TAP activa la transcripción del gen reportero, también, de manera dependiente del α -tocoferol. Los resultados sugieren que la función biológica del α -tocoferol no es solo la de antioxidante, sino que actuaría como un regulador transcripcional de la expresión génica a través de una asociación con el factor de transcripción α -TAP.

Las otras isoformas de la vitamina E no reconocidas por proteínas de unión como las mencionadas, son metabolizadas por el sistema del citocromo P450 a carboxietilhidroxicromanos

(CEHCs) como productos finales, los que han sido detectados tanto en el plasma como en la orina (Döring et al., 2004; Traber, 2007).

1.5.4. Antioxidantes no enzimáticos: carotenoides

Los carotenoides son pigmentos naturales liposolubles que se sintetizan *de novo* en plantas y otros organismos como algas, bacterias y mohos (Stahl & Sies, 2003; Rodríguez-Amaya, Kimura, Godoy, & Amaya-Farfán, 2008). Su principal función es actuar como pigmentos accesorios en la fotosíntesis cubriendo las longitudes de onda de la luz que no son absorbidas por las clorofilas, pero también desempeñan funciones frente al daño foto-oxidativo, siendo antioxidantes eficientes en la eliminación del oxígeno molecular singlete ($^1\text{O}_2$) y radicales peroxilo. Los animales y el ser humano no son capaces de sintetizarlos y los incorporan al organismo a través de la dieta (Carreras Ferrer, 2004; Stahl & Sies, 2005).

La mayoría de los carotenoides derivan de una estructura básica constituida por ocho unidades de isopreno o tetraterpeno (40 átomos de carbono), que puede estar ciclada en uno o los dos extremos de la molécula. Los carotenoides que son hidrocarburos reciben el nombre de carotenos, y sus derivados oxigenados, se conocen como xantofilas (Stahl & Sies, 2003).

Los carotenos más destacados son el β -caroteno, el α -caroteno y el licopeno, mientras que zeaxantina, luteína, β -criptoxantina, cantaxantina y astaxantina, son importantes xantofilas (Stahl & Sies, 2005).

Las características químicas más evidentes de estos compuestos son la presencia de numerosos dobles enlaces conjugados, responsables de sus propiedades de absorción de la luz y que influyen en su actividad antioxidante, y de varias ramificaciones de grupos metilo situadas en posiciones constantes. Se han caracterizado más de 600 carotenoides pero no todos tienen

valor como provitamina A, siendo el β -caroteno el más importante cuantitativamente en la dieta occidental (Stahl & Seis, 2005).

La condición fundamental para que tengan actividad vitamínica es que, al menos uno de los anillos de los extremos de la estructura, esté cerrado y sin oxidar. En consecuencia, varios de los carotenoides más comunes como el licopeno, la zeaxantina y la luteína, no contribuyen al aporte dietario de vitamina A, aunque son muy importantes como pigmentos y pueden tener también actividad como antioxidantes (Carreras Ferrer, 2004).

1.5.4.1. β -caroteno.

El β -caroteno no posee la estructura característica de los antioxidantes capaces de romper la cadena de oxidación lipídica. Los numerosos dobles enlaces conjugados le otorgan un carácter pro-oxidante y la hacen una molécula muy susceptible al ataque de radicales peroxilo (ROO^\bullet).

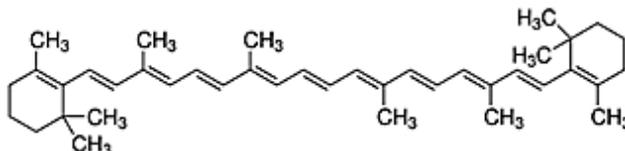
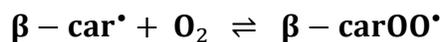


Figura 7. Estructura del β -caroteno.

En la reacción del β -caroteno con estos radicales, se genera un radical β -caroteno ($\beta\text{-car}^\bullet$) que reacciona en forma rápida y reversible con el oxígeno molecular dando lugar a un nuevo radical peroxilo ($\beta\text{-carOO}^\bullet$), como puede observarse en las siguientes ecuaciones:



La tasa de oxidación es dependiente de la presión parcial de oxígeno; si es baja, la reacción se desplaza hacia la izquierda disminuyendo la concentración de radicales y en

consecuencia la oxidación del sistema. El β - caroteno puede manifestar actividad antioxidante debido a dos características. La primera de ellas es su reactividad que le otorga capacidad para competir por los radicales libres, aun a bajas concentraciones. La segunda es la estabilidad del radical β -car \cdot . A presiones parciales de oxígeno bajas, como se hallan en la mayoría de los tejidos en condiciones fisiológicas, este radical predomina frente al radical peroxilo y puede ser eliminado del sistema a través de la reacción con otro radical peroxilo dando lugar a un producto inactivo. Por el contrario, a altas presiones parciales de oxígeno, el β -caroteno pierde su capacidad antioxidante y muestra un efecto pro-oxidante autocatalítico, formando un producto de copolimerización con el oxígeno y cantidades menores de varios compuestos norisoprenoides, de los que se está investigando su actividad inmunológica (Burton & Ingold, 1984; Burton, 1989; Burton, Daroszewski, Nickerson, Johnston, Mogg, & Nikiforov, 2014). El β -caroteno puede complementar el rol antioxidante de la vitamina E, ya que esta última es efectiva a presiones parciales de oxígeno superiores (Carreras Ferrer, 2004; Descalzo & Sancho, 2008), como puede observarse en la Figura 8.

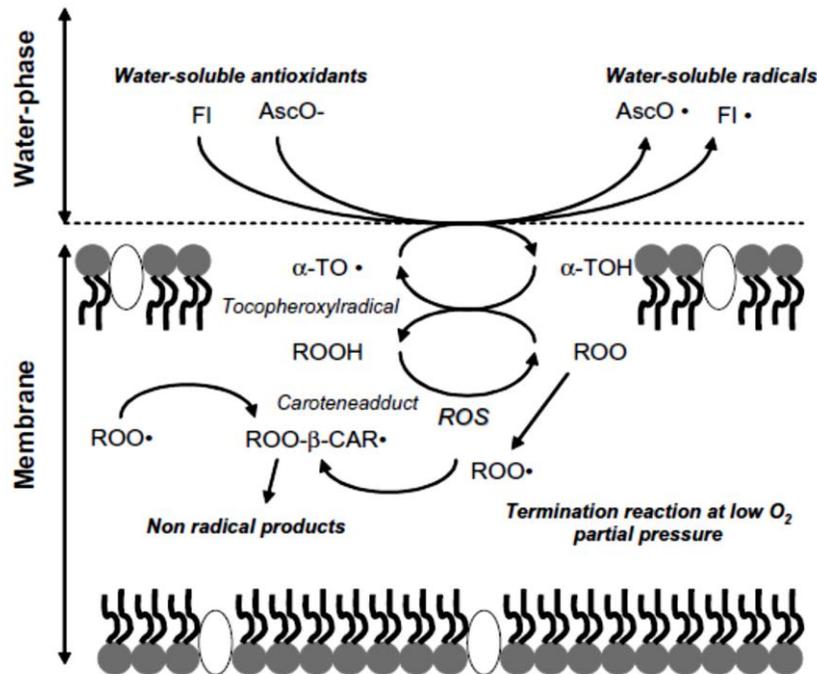


Figura 8. Mecanismo potencial de reciclado entre el α -tocoferol (α -TOH), ascorbato (AscO⁻) y flavonoides (FI) y la acción del β -caroteno (β -CAR) en los sistemas de membrana durante la oxidación lipídica (ROO[•]) a través de especies reactivas del oxígeno (ROS). Ref: Descalzo & Sancho, 2008.

1.5.4.2. Vitamina A.

El término vitamina A se asocia a un grupo de compuestos denominados retinoides que consisten en cuatro unidades isoprenoides con cinco dobles enlaces carbono-carbono. La vitamina A está representada principalmente por el todo-*trans* retinol el cual tiene un anillo β -ionona y una cadena lateral metilada que posee cuatro enlaces dobles conjugados y puede presentarse en formas isoméricas diferentes con actividades biológicas distintas cada una (Stipanuk, 2000; Villamor & Fawze, 2005).

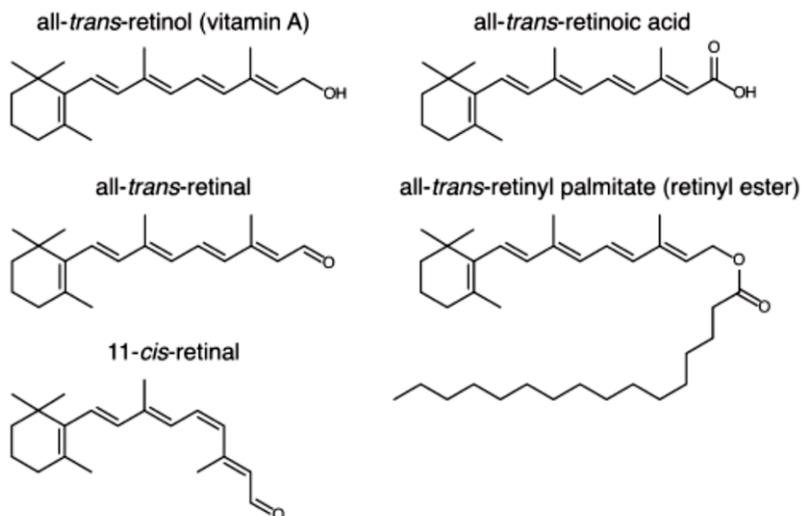


Figura 9. Estructuras de la vitamina A y sus derivados. Ref: Kono & Arai, 2015.

Los vertebrados no son capaces de sintetizar compuestos con actividad de vitamina A ni sus precursores los carotenoides, sintetizados por plantas y microorganismos, como ya se mencionó. Por lo tanto, la vitamina o sus precursores que pueden ser convertidos en retinol en el organismo de los mamíferos, deben ser aportados por la dieta (Stipanuk, 2000). Los carotenoides precursores de la vitamina A son β -criptoxantina y α y β -carotenos, siendo la forma nutricionalmente más importante esta última (Villamor & Fawze, 2005; Reboul, 2013).

En los bovinos, numerosos estudios indican que en el rumen se modifica la mayor parte de las vitaminas liposolubles ingeridas; una cantidad apreciable de vitamina A y de β -caroteno se degradan en el rumen por acción de deshidrogenasas bacterianas, estimándose que la desaparición de la vitamina alcanza valores entre 40 y 70% (Torre y Caja, 1998).

La absorción de la vitamina A está ligada, como todas las vitaminas liposolubles, a la digestión y absorción de los lípidos después de su hidrólisis abomasal. En el lumen del intestino delgado, por acción de la lipasa pancreática y de las sales biliares, se forman micelas de ácidos

grasos, monoglicéridos, fosfolípidos, sales biliares y colesterol, a las cuales se incorporan moléculas de la vitamina (Torre y Caja, 1998; Reboul, 2013).

Aunque se asume que los carotenoides se transportan a nivel general por las micelas mixtas, algunos pueden ser integrados en otras estructuras como vesículas y liposomas presentes en la misma fracción acuosa, ya que se ha demostrado que la vitamina A puede incorporarse en bicapas fosfolipídicas (Reboul, 2013).

Las micelas son transportadas hacia los enterocitos, y en las membranas celulares de la mucosa intestinal, los carotenos son escindidos a retinal, aunque también otros tejidos (pulmón, riñón e hígado) tienen capacidad para ello (Doldo, Costanza, Agostinelli, Tarquini, Ferlosio, Arcuri, Passeri, Scioli, & Orlandi, 2014; Torre y Caja, 1998). La enzima β -C 15-15'oxigenasa 1 (BCO1) produce una ruptura en el doble enlace central del β -caroteno (Harrison, 2012), formando en teoría dos moléculas de retinal por molécula de β -caroteno, sin embargo, la tasa de conversión es más baja en los rumiantes respecto de los monogástricos (Torre y Caja, 1998).

Una vez en los enterocitos, el retinal se une a una proteína citoplasmática (CRBP2) que lo protege de la oxidación a ácido retinoico y permite la reducción del retinal a retinol. El complejo retinol-CRBP2 reacciona con ácidos grasos de cadena larga formando ésteres de retinol, que junto con triglicéridos y ésteres de colesterol, son incorporados en los quilomicrones (QM) (Harrison, 2012; Reboul, 2013).

Los QM se transportan por el sistema linfático hasta la circulación general donde ocurren procesos de hidrólisis y el intercambio de apolipoproteínas que originará la formación de los quilomicrones remanentes (QMr). Los QMr, que contienen la mayor parte del retinol absorbido en forma de ésteres de retinol, son principalmente endocitados por los hepatocitos (Harrison, 2012; Doldo et al., 2014; Kono & Arai, 2015).

En las células hepáticas, los ésteres de retinol son hidrolizados liberando retinol que se transfiere al retículo endoplasmático (RE) y se une a la proteína de unión a retinol (RBP, conocida también como RBP4). El complejo retinol-RBP se trasloca al aparato de Golgi desde donde se secreta y se exporta a las células estrelladas hepáticas. En las células estrelladas, el retinol vuelve a ser re-esterificado. En mamíferos, más del 90% del total de la vitamina A es almacenado en las células estrelladas hepáticas en forma de ésteres de retinol constituyendo gotas lipídicas citoplasmáticas (Kono & Arai, 2015).

La mayoría del RBP-retinol circulante se acompleja reversiblemente en el plasma con otra proteína llamada transtirretina (TTR) (Doldo et al., 2014; Noy, 2015). Este complejo trimolecular presenta menor susceptibilidad de filtración renal que el formado solamente por RBP-retinol y de esta manera es transportado a los tejidos periféricos, pero antes de ingresar a las células, la vitamina se disocia de la proteína (Noy, 2015). El retinol-RBP no acomplejado, interactúa con el receptor de superficie de RBP (STRA6: proteína 6 estimulada por ácido retinoico), que además es un transportador bidireccional de retinol. Luego, el retinol se disocia de RBP y es transportado en las células a través de STRA6, y en las células diana sufre bioactivación para formar retinal y ácido retinoico (Reboul, 2013; Kono & Arai, 2015). Las principales vías de transporte y metabolismo de la vitamina A pueden observarse en la Figura 10.

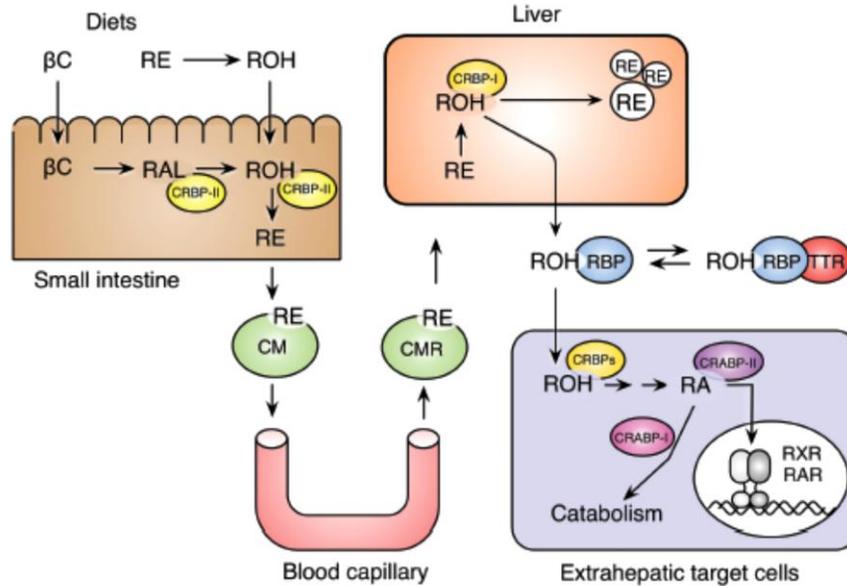


Figura 10. Vías principales de transporte y metabolismo de la vitamina A. β C: β -caroteno; RE: retinilo éster; ROH: retinol; RA: ácido retinoico; CRBPs, CRBP1 y CRBP2: proteínas celulares de unión a retinol; CRABP1 y CRABP2: proteínas celulares de unión a ácido retinoico; RBP: proteína de unión a retinol; TTR: transtiretina; RAR y RXR: receptores de ácido retinoico; CM: quilomicrones; CMR: quilomicrones remanentes. Ref: Kono & Arai, 2015.

El tráfico citosólico de retinol y sus metabolitos, retinal y ácido retinoico, involucran proteínas de unión a retinoides en la mayoría de los tejidos. Existen distintas clases de proteínas de unión a retinoides que actúan de forma selectiva regulando su transporte, orientación al sitio apropiado para cada metabolito en la célula y su metabolismo (Reboul & Borel, 2011). Estas son: las proteínas celulares de unión a ácido retinoico (CRABPs), proteína celular de unión a los 11-cis retinoides (CRALBP) y las proteínas celulares de unión al retinol (CRBPs) (Kono & Arai, 2015).

Las CRABPs incluyen dos formas, CRABP1 y CRABP2, que unen el todo *trans*-ácido retinoico con alta afinidad. Su función principal es el transporte del ácido retinoico hasta el núcleo donde interactúa con receptores nucleares. También se encargan del control intracelular de la cantidad del ácido retinoico libre en la célula. Ambas son inducibles por ácido retinoico,

por lo que existe un mecanismo *feedback* encargado de la regulación del exceso de ligando que impide una inapropiada expresión de genes inducibles por el ácido retinoico (Doldo et al., 2014).

En la familia de proteínas celulares de unión a retinol (CRBPs), se han descrito cuatro isoformas, CRBP1 a CRBP4. La proteína más generalizada de unión a retinol es CRBP1. Esta proteína es especialmente abundante en los hepatocitos y las células estrelladas, riñón, pulmón y órganos reproductivos, y se expresa también en el cerebro y en las células epiteliales pigmentadas en el ojo (Doldo et al., 2014; Kono & Arai, 2015). La expresión de las otras formas de CRBPs parece estar más restringida; CRBP2 se limita al intestino delgado, CRBP3 humana al riñón e hígado y CRBP4, principalmente, al riñón, corazón y colon (Kono & Arai, 2015).

Estas proteínas presentan distintas afinidades de unión por los retinoides. CRBP1 es la que presenta mayor afinidad por el *todo-trans* retinol, siendo 100 veces mayor que la evidenciada por CRBP2. Ambas, también, unen retinal con afinidades similares (Kono & Arai, 2015).

Se supone que las CRBPs, en especial CRBP1, secuestran retinoides desde el entorno celular manteniendo las concentraciones de estos compuestos libres muy bajas para proteger a la célula de sus propiedades detergentes y a los retinoides, relativamente lábiles, de interacciones no específicas que podrían degradarlos (Kono & Arai, 2015).

Además de estos roles, existen cada vez más evidencias de que las CRBPs tienen funciones en la regulación del metabolismo de retinol y retinal. Por ejemplo, CRBP-I facilita la síntesis de ésteres de retinilo mediante la entrega de retinol a la enzima LRAT (lecitina: retinol acil transferasa), regulando así la formación de la reserva principal de retinol y, además, se cree que puede estar involucrada en la síntesis de ácido retinoico a partir de retinol (Berry, O'Byrne, Vreeland, Blaner, Noy, 2012). CRBP-I entrega retinol a una enzima microsomal (RDH) que

convierte retinol en retinal. El retinal producido, también se une a CRBP-I, lo que actúa como sustrato para la retinal deshidrogenasa, otra enzima microsomal que convierte el retinal en ácido retinoico (Kono & Arai, 2015).

CRBP2 se expresa principalmente en las células absortivas del intestino, representando más del 1% de las proteínas citosólicas del enterocito. Esta proteína media el transporte intracelular de retinol durante su absorción desde el lumen intestinal y participa en el metabolismo de retinoides en el intestino de manera similar a CRBP1. Se ha demostrado una expresión aumentada de su ARNm en el intestino de ratas con dietas deficientes en retinoides (Reboul & Borel, 2011). La expresión y/o actividad de proteínas intestinales que participan en la absorción de carotenoides y de la vitamina A, puede ser modulada por la misma vitamina A y los carotenoides por medio de una regulación por retroalimentación (*feedback*) (Reboul, 2013).

Investigaciones recientes, han determinado que CRBP1 también participa en la absorción de retinol. Se observó que la activación del receptor STRA6 es provocada por la translocación del retinol unido a RBP plasmática a CRBP1 citoplasmática, por lo que esta funcionaría como un aceptor intracelular para el retinol transportado por STRA6 (Berry et al., 2012).

1.5.4.3. Luteína.

La luteína es un carotenoide de la familia de las xantofilas que no presenta actividad de provitamina A. Posee dos grupos hidroxilos en los extremos de la molécula, al igual que el licopeno y la zeaxantina, que la distinguen de otros carotenoides como el β -caroteno. Se cree que estos grupos desempeñan un papel crítico en su función biológica (Alves Rodrigues & Shao, 2004). Junto con otros carotenoides, no solo se encuentra en la mayoría de las plantas, frutas y

(2007) demostraron en células Caco-2 que las vitaminas C y E, las flavonas y ácidos fenólicos no tienen ningún efecto significativo sobre la biodisponibilidad de luteína, mientras que aparentemente, está afectada por otros antioxidantes como carotenoides y naringenina.

La luteína es conocida, junto con la zeaxantina, por su importancia para la salud de los ojos. Ambas, constituyen los pigmentos maculares de la retina donde funcionan como filtros de la luz azul y como antioxidantes, ante el daño oxidativo iniciado por la luz en la retina (Johnson, 2005). Los niveles séricos de luteína han demostrado estar inversamente relacionados con el riesgo de enfermedades oculares, incluyendo la degeneración macular (DMA) vinculada con la edad en el ser humano (Alves Rodrigues & Shao, 2004).

Al igual que los carotenoides provitamina A, la luteína cumple funciones relacionadas con la protección ante especies reactivas del oxígeno (ROS) que llevan a la destrucción de estructuras biológicas como las membranas. Sujak et al. (2000) observaron que la incorporación de carotenoides polares a los lípidos de membranas, resulta en un aumento de la barrera a la penetración del oxígeno potencialmente peligrosa para el núcleo lipídico insaturado de estas. La luteína exhibe una mayor capacidad de barrido de los radicales hidroxilo (OH^\bullet) y anión superóxido ($^1\text{O}_2^{\bullet-}$) que el β -caroteno en la misma concentración, mientras que la tendencia es opuesta para el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) (Peng, Lin Z.F., Su, Lin G.Z., Dou, & Zhao, 2006).

En vacas lecheras, se ha encontrado una correlación lineal positiva entre la concentración de luteína en leche y la ingesta de luteína suministrada en la dieta de los animales. La concentración de los carotenoides de la leche depende de la oferta dietética, por lo tanto, el mayor contenido de luteína en la leche, puede asociarse a recursos forrajeros más frescos ya que los alimentos secos o ensilados son bajos en carotenoides. Ese estudio también muestra que la

suplementación con luteína mejoró la producción de leche y la capacidad antioxidante de los animales (Xu, Wang H.F., Yang, Wang J.H., Duan, Wang C., Liu, & Lao, 2014).

Las principales funciones biológicas de la luteína están vinculadas a su actividad antioxidante, cuyos mecanismos están muy bien establecidos, pero hay pocos datos que describan su influencia en la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo y la defensa antioxidante en células de mamífero, tanto *in vitro* como *in vivo* (Serpeloni, Syllós Cólus, Singaretti de Oliveira, Ferro Aissa, Zerlotti Mercadante, Pires Bianchi, & Greggi Antunes, 2014).

Zhang, Han, Wang H., & Wang, T. (2014) evaluaron el grado de oxidación y la expresión de los genes que codifican para las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD; SOD1 y SOD2) y catalasa (CAT) en moscas *Drosophila melanogaster* luego de recibir una dieta rica en luteína. Los resultados mostraron un menor daño oxidativo, reflejado por una reducción significativa del nivel de malondialdehído (MDA), y una mayor expresión de los genes que para el grupo control.

Otros estudios han informado el aumento en la expresión de genes relacionados con propiedades antiinflamatorias (iNOS: enzima óxido nítrico sintasa inducible), la inhibición de la expresión de genes regulados por estrés (NF-kappaB), la estimulación de la apoptosis inducida por disminución de la expresión del gen antiapoptótico 2 (Bcl-2) y el aumento de la expresión de genes pro-apoptóticos (proteína tumoral p53 (TP53) y BCL2 X-asociado (Bax) en ratón (Serpeloni et al., 2014). Estos mismos autores, estudiaron la influencia de la luteína en la modulación de la expresión 84 de genes antioxidantes y de respuesta a estrés oxidativo en el hígado de ratón. La luteína cambió la expresión de 37 genes con una inducción de 13, principalmente, transportadores de oxígeno. Estos resultados sugieren que los carotenoides

como la luteína podrían actuar como antioxidantes, no solo por la eliminación directa de ROS, sino también indirectamente mediante la inducción de la expresión de genes relacionados con una mejor respuesta antioxidante (Serpeloni et al., 2014).

1.6. Antioxidantes y dietas

La dieta suministrada a los animales proporciona antioxidantes que se pueden incorporar en el tejido muscular. El efecto de la dieta sobre el estatus antioxidante del músculo depende de distintos factores como la composición en nutrientes antioxidantes y pro-oxidantes aportados, de la absorción y biodisponibilidad de todos ellos, y del agregado de aditivos y suplementos no nutricionales. Algunos compuestos proporcionados no son propiamente antioxidantes, sin embargo, son nutrientes esenciales para el funcionamiento de sistemas antioxidantes endógenos, como es el caso metales (cobre, manganeso, selenio y zinc), cofactores de sistemas enzimáticos antioxidantes (Carreras Ferrer, 2004).

La suplementación de las dietas de los animales destinados a la producción de carne con antioxidantes, tiene por finalidad garantizar la deposición de suficiente cantidad de estos en los músculos para una correcta protección frente a la degradación oxidativa. Por otro lado, la carne o productos cárnicos con antioxidantes incorporados podrían considerarse alimentos funcionales, es decir, que además de su valor nutritivo, pueden ser utilizados para prevenir o tratar ciertos desórdenes o enfermedades (Carreras Ferrer, 2004).

Entre las estrategias de suplementación nutricional, la dieta con vitamina E, uno de los antioxidantes más utilizados, ha demostrado ser eficaz en la reducción de la oxidación de lípidos (Descalzo & Sancho, 2008). La mejora de la estabilidad oxidativa de la carne se debe principalmente a la distribución de las moléculas de vitamina E en el interior de las membranas

celulares en una situación óptima para su actuación (Arnold, Arp, Scheller, Williams, & Schaefer, 1993). La suplementación dietética prolongada permite la incorporación del α -tocoferol directamente en las membranas del tejido muscular y adiposo (Carreras Ferrer, 2004), mientras que la adición *post mortem* del antioxidante en la carne, resulta en un contacto superficial extensivo y no intramembranoso, menos eficaz para bloquear la progresión de la oxidación (Arnold et al., 1993; Kerry, Buckley, Morrissey, O'Sullivan, & Lynch, 1999).

En general cuanto mayor es la cantidad de vitamina E y el tiempo de suplementación, más elevada es la concentración en el tejido (Arnol et al., 1993). Lynch et al. (1999) observaron que esta suplementación mejora el color y la estabilidad oxidativa de la carne fresca, congelada y envasada al vacío, luego de siete días de almacenamiento, comparada con carne proveniente de dietas sin suplementar. Se cree que los productos de la oxidación de los lípidos catalizan la oxidación de oximioglobina a metamioglobina, pero la acción antioxidante directa del α -tocoferol en los lípidos de membrana es aproximadamente 10^4 veces más rápida que la propagación de la peroxidación lipídica, la que además se extiende a la oxidación de proteínas. Por lo tanto, el α -tocoferol indirectamente puede retrasar la oxidación de la oximioglobina y la decoloración de la carne (Faustman, Chan, Schaefer, & Havens, 1998; Descalzo & Sancho, 2008). Dunne, Monahan, O'Mara, Moloney (2005) determinaron que la carne de novillos alimentados con pasto ensilado suplementado con vitamina E afectó positivamente la estabilidad del color en el músculo *L. dorsi*, que se mantuvo bajo condiciones de venta simuladas.

Asimismo, el α -tocoferol podría preservar la integridad de las membranas celulares del músculo mediante la prevención de la oxidación de los fosfolípidos, lo que inhibe el pasaje de fluido sarcoplasmático a través de la membrana, y por lo tanto, mejora la calidad de la carne durante el almacenamiento (Gray, Gomaa, & Buckley, 1996; Descalzo & Sancho, 2008).

Houben, Van Dijk, Eikelenboom, & Hoving-Bolink (2000) encontraron que la carne de animales cuya dieta fue suplementada con vitamina E durante los 136 días previos a la faena, mostró mayor resistencia a la oxidación lipídica que la carne con igual dieta pero sin vitamina E adicional, mientras fue almacenada durante 10 días a 7 ° C.

Sin embargo, otros estudios difieren con respecto al efecto beneficioso de los suplementos de vitamina E en las dietas. Pereira, Sobral, Leme, & Silva (2008) observaron que no hubo ningún efecto protector sobre el color de la carne envasada al vacío y mantenida por 21 días y la congelada y almacenada hasta 6 meses, aunque hubo una mejora en la capacidad de retención de agua en todas las muestras.

Las dietas basadas en pasturas también proporcionan antioxidantes naturales tales como las vitaminas A, C y, especialmente α -tocoferol, carotenoides, flavonoides y glutatión, que se incorporan de manera eficiente en el músculo y estabilizan los ácidos grasos (Gatellier et al., 2004; Gatellier et al., 2005; Descalzo & Sancho, 2008), con implicaciones en la mejora de la calidad de la carne.

Los granos son menos ricos en vitaminas antioxidantes debido a que estas son muy inestables y disminuyen durante la deshidratación y el almacenamiento, pero también contienen otros compuestos antioxidantes como polifenoles y ácido fítico. Todos estos antioxidantes naturales actúan como interruptores de cadena en la producción de radicales libres y son considerados como una segunda línea de protección frente al ataque de los radicales (Gatellier et al., 2004).

Varios trabajos han demostrado que la carne de animales terminados en pastos de buena calidad presenta mayor concentración de vitamina E (Yang, Brewster, Lanari, & Tume, 2002b; Realini et al., 2004; Descalzo et al., 2005; Insani et al., 2008; De La Fuente, Díaz, Álvarez,

Oliver, Font i Furnols, Sañudo, Campo, ... & Cañeque, 2009), β -caroteno (Yang et al., 2002b; Descalzo et al., 2005; Insani et al., 2008) y ácido ascórbico (Descalzo et al., 2005), que los terminados con dietas de concentrados lo que le otorga un alto valor antioxidante.

Los mayores niveles de vitamina E incorporados en el músculo por la dieta de pasturas se asocian, en general, con carnes con mayor estabilidad oxidativa, lo que se evidencia luego del almacenamiento refrigerado o de la cocción de la carne, más que en la carne fresca (Descalzo & Sancho, 2008). Nuernberg, K., Dannenberg, Nuernberg, G., Ender, Voigt, Scollan, Wood, Nute, & Richardson (2005) encontraron que la carne de toros alimentados a base de pastos produjo carnes más estables, de acuerdo a los resultados de TBARS, que los alimentados con una dieta de concentrado, en especial a los 10 días de comercialización. Tres ensayos diferentes mostraron que el ganado bovino terminado en pasturas o con grano, y búfalos terminados en pasto, tenían niveles iniciales de TBARS distintos, incluso en la carne fresca. Las carnes frescas de pasturas presentaron niveles de TBARS por debajo de 0,2 mg de malondialdehído por Kg de carne (mgMDA/Kg), mientras que los niveles de α -tocoferol fueron mayores a 2 μ g/g (Realini et al., 2004; Descalzo et al., 2005; Insani et al., 2008).

Aunque las concentraciones de los carotenoides se mantienen en al menos un orden por debajo de los niveles de α -tocoferol *in vivo*, la alimentación en pasturas tiene efecto sobre el contenido de β -caroteno en el tejido muscular (Descalzo & Sancho, 2008). Descalzo et al. (2005) encontraron cantidades de este antioxidante significativamente superiores (7 veces más) en la carne de animales alimentados con pastos con respecto a la carne de dieta de grano. Datos similares fueron reportados por Yang et al. (2002b) y e Insani et al. (2008), presumiblemente debido al alto contenido de β -caroteno en los forrajes frescos comparado con los granos. Los ruminantes con raciones altas en forrajes verdes pasan una parte de los carotenoides ingeridos a la

leche y a la grasa corporal de una manera que aún no se ha aclarado completamente (Daley et al., 2010). El β -caroteno coopera con los tocoferoles en la capacidad de eliminación de radicales en la zona interna de las membranas lipídicas y, además, actúa a baja presión parcial de oxígeno como inhibidor de productos de la peroxidación de lípidos (Descalzo & Sancho, 2008).

Se ha informado que la alimentación en pasturas puede aumentar la concentración de ácido ascórbico con respecto a la dieta de concentrado, pero el nivel de este antioxidante no es comúnmente informado (Descalzo et al., 2005).

Las concentraciones de glutatión (GT) son elevadas en las partes verdes de los forrajes, así que la carne del ganado alimentado con estos, tiene niveles particularmente altos de GT comparado con los alimentados con grano (Descalzo et al., 2007; Daley et al., 2010). Además, se ha encontrado que las muestras de dietas de pasto muestran actividades más elevadas de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) que las dietas de grano (Daley et al., 2010). Sin embargo, la importancia de las enzimas antioxidantes es variable, debido a que su comportamiento depende del estado redox individual previo a la faena (Descalzo & Sancho, 2008).

Recapitulando, varios trabajos han comunicado sobre los efectos de la alimentación con pasturas naturales tales como: mejor color y estabilidad de los lípidos tanto en carne fresca como madurada (Yang et al., 2002a); mejor color y estabilidad de los lípidos, modulación de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPX) pero sin repercusión sobre la oxidación de proteínas (Mercier et al., 2004); mejora en la estabilidad de los lípidos y color durante todo el almacenamiento refrigerado (Realini et al., 2004); mejora en la estabilidad oxidativa y en los niveles de actividad antioxidante (Descalzo et al., 2005); mejora en la capacidad antioxidante medida por FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) y aumento en la

actividad de superóxido dismutasa (SOD) (Descalzo et al., 2007); mejora en la estabilidad oxidativa y en la retención del color hasta el final del almacenamiento y modulación de la enzima glutatión peroxidasa (GSH) (Insani y et al., 2008); menor oxidación de los lípidos medidos a 4 y 7 días de venta al consumidor y una mejor estabilidad del color durante la vida útil de la carne (Warren, Scollan, Nute, Hughes, Wood, & Richardson, 2008).

Tres décadas de investigación apoyan el argumento que las dietas de pasto mejoran el contenido global de antioxidantes de la carne, como es el caso de los precursores de la vitamina A y E, el glutatión y la actividad de superóxido dismutasa (SOD), pero además, pueden alterar significativamente la composición en ácidos grasos. La carne proveniente de pasturas posee un perfil lipídico más deseable que el alimentado con grano, y en general, tiende a tener menos grasa y ácidos grasos C14:0 y C16:0, y más ácido graso C18:0. El ácido graso C18:0 posee un comportamiento neutro con respecto a los niveles de colesterol, mientras que los otros dos elevan los niveles plasmáticos de esta molécula. La carne de vacuno terminado en pasturas también presenta mayor contenido total de isómeros del ácido graso insaturado C18:2, de ácido vaccénico (TVA; C18:1, *trans*-11) y de ácidos grasos n-3, expresados en g/g de grasa. Esto resulta en una mejor relación de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) n-6:n-3, acorde con las recomendaciones nutricionales actuales (Daley et al., 2010).

En consecuencia, para maximizar el perfil lipídico favorable, mejorar la protección de los lípidos musculares contra la oxidación y garantizar un estado antioxidante elevado, así como proporcionar al consumidor de carne una fuente adicional de compuestos antioxidantes, los animales deberían ser terminados 100% en pasturas o con dietas a base de pastos (Daley et al., 2010).

1.6.1. Genes asociados a la calidad de la carne.

En el contexto de la agricultura sustentable, son necesarios nuevos conocimientos con el fin de desarrollar sistemas de producción de carne que respondan a las recientes y diversificadas demandas de los consumidores (Hocquette, Bernard-Capel, Vidal, Jesson, Levéziel, Renand, & Cassar-Malek, 2012). Estas se refieren a la producción de productos cárnicos seguros, saludables y de alta calidad, respetando al mismo tiempo la salud y el bienestar de los animales, y la protección del medio ambiente (Hocquette, Cassar-Malek, Bernard-Capel, & Picard, 2009). Es sabido que el crecimiento de los animales, la salud y calidad de la carne son controladas por factores genéticos y ambientales (Carrillo, He, Li, Liu, Erdman, Sonstegard, & Song, 2016).

La influencia genética sobre la calidad de la carne comprende diferencias entre las razas, así como diferencias entre animales dentro de la misma raza. Estas disimilitudes en los atributos de calidad son causadas por un gran número de genes con efectos pequeños (efecto poligénico), por lo tanto la heredabilidad de la mayoría de los atributos relativos a la calidad es baja a moderada, con excepción de unos pocos efectos monogénicos, como por ejemplo, el gen de miostatina en bovinos, los genes de la grasa intramuscular y de androstenona en cerdos (Andersen et al., 2005).

La mayoría de las propiedades de interés para la calidad de la carne dependen de mecanismos biológicos complejos y multifactoriales, lo que origina una alta variabilidad de las características del músculo, una de las razones de la insatisfacción de los consumidores. El valor predictivo de las características de los músculos que se han estudiado hasta ahora parece ser bajo, ya que sólo han podido explicar no más del 36% de la variabilidad en la carne vacuna (Renand, Picard, Touraille, Berge, & Lepetit, 2001; Andersen et al., 2005). Subyacen a esta elevada variabilidad el potencial genético de los animales, y en mayor medida, la expresión de los genes

en los músculos en concordancia con factores del medio ambiente. Por lo tanto, las condiciones del itinerario de la producción (crecimiento, gestión, nutrición, etc.) interactúan con el potencial genético de los animales para determinar los rasgos de calidad de la carne (Hocquette et al., 2012).

Con la alimentación siendo el factor más decisivo en la producción de carne, un enfoque nutrigenómico, es decir el genoma en interacción con la alimentación, parece ser el más adecuado para el aprovechamiento de los procesos biológicos de importancia directa en los atributos de calidad de la carne (Andersen et al., 2005). La alimentación tiene un efecto regulador sobre los procesos biológicos en el músculo que se refleja directamente en la calidad de la carne. Esto está de acuerdo con el hecho que, componentes específicos de la dieta, se sabe que regulan la expresión génica dentro de las células. Es de esperar que la genómica funcional pueda ser útil para la industria de la carne que está requiriendo indicadores biológicos o moleculares que identifiquen animales vivos con características de calidad deseables, con el fin de orientarlos hacia el sistema de producción más adecuado (Hocquette, Lehnert, Barends, Cassar-Malek, & Picard, 2007; Cassar-Malek, Jurie, Bernard, Barnola, Micol, & Hocquette, 2009).

Algunas investigaciones recientes han posibilitado la identificación de marcadores para el potencial de crecimiento del músculo de bovinos, para el vetado de grasa, la terneza de la carne y para la trazabilidad de los sistemas de producción basados en pasturas (Hocquette et al., 2009). Nuevas herramientas (chips de genes y de proteínas), están en desarrollo para evaluar un gran número de estos marcadores de forma simultánea con el objeto de reconocer patrones globales de expresión génica en diversos tejidos y tipos de células, pero la falta de un registro estandarizado de medidas de calidad de la carne hace muy difícil implementar grandes programas de selección

para mejorar la calidad del producto (Sudre, Leroux, Cassar-Malek, Hocquette, & Martin, 2005; Hocquette et al., 2012).

De todas las características de la carne, la ternera se considera la más importante. Esta depende, por un lado, de los factores asociados con la maduración *post mortem* y la forma de cocción, y por el otro, de las características musculares de los animales vivos que a su vez dependen de la expresión génica. Los principales determinantes de la ternera son las características del colágeno y el tipo de fibra muscular (Renand, Picard, Touraille, Berge, & Lepetit, 2001), y en asociación con esto, el grado de proteólisis durante la maduración y también la cantidad de grasa intramuscular que facilita la masticación. Se ha demostrado que un mayor contenido de grasa intramuscular y de solubilidad del colágeno se asocia positivamente con la ternera (Guillemin, Jurie, Renand, Hocquette, Micol, Lepetit, Levéziel, & Picard, 2012).

Dos determinantes biológicos descubiertos recientemente son las relaciones de la ternera de la carne con los niveles de expresión de genes de proteínas del choque térmico (HSP) y con los niveles de expresión de genes relacionados con el metabolismo de la grasa y la energía en las fibras musculares (Hocquette et al., 2012). En un estudio del transcriptoma en músculo *L. thoracis* de terneros Charolais, un gen (DNAJA1) que codifica para una proteína del choque térmico que pertenece a la familia Hsp40, correlacionó negativamente con la ternera (Bernard, Cassar-Malek, Dubroeuq, Hocquette, Le Cunff, & Renand, 2007).

Jia, Veiseth-Kent, Grove, Kuziora, Aass, Hildrum, & Hollung (2009) al investigar un marcador de ternera, observaron que la expresión de peroxirredoxina-6 era más abundante en el grupo con mayor ternera, tanto en los animales vivos como en el músculo poco después de la faena. Por lo tanto, la relación entre peroxirredoxina-6 y la ternera puede indicar que esta última está asociada al estrés oxidativo en el músculo.

Hocquette et al. (2012) desarrollaron una nueva herramienta empleando la tecnología de matriz (GENOTEND chip) para analizar la expresión génica en músculos de ganado bovino con fines predictivos de la calidad de la carne. En este análisis de transcriptómica, los autores identificaron numerosos marcadores de terneza aunque, a menudo, resultaron específicos de un tipo de animal (buey o novillo) o para las condiciones del medio ambiente de producción. Sin embargo, los resultados confirmaron la idea de que las proteínas de choque térmico (especialmente de la familia Hsp40) o enzimas metabólicas pueden ser posibles buenos marcadores de la terneza de la carne.

En cuanto al veteadado y el contenido de grasa intramuscular, poseen una variabilidad genética mucho más alta que la terneza, el sabor o la jugosidad de la carne. Se ha demostrado una correlación positiva entre el contenido de grasa intramuscular y un marcador de diferenciación de los adipocitos (la expresión del gen A-FABP) (Scollan, Hocquette, Nuernberg, Dannenberger, Richardson, & Moloney, 2006). Las expresiones de leptina y G6PDH (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa) también se han propuesto como indicadores relevantes de marmoleado (Hocquette et al., 2009).

Se han estudiado ampliamente enfoques genéticos y nutricionales en relación con la composición de ácidos grasos de la carne, aunque se reconoce que los factores genéticos, en general, proporcionan diferencias más pequeñas que los factores dietéticos. Sin embargo, a pesar de que las diferencias de raza son generalmente pequeñas, reflejan diferencias en la expresión génica subyacente o en enzimas implicadas en la síntesis de ácidos grasos, por lo tanto merecen ser tenidas en consideración (Scollan et al., 2006). Por ejemplo, los ácidos grasos poliinsaturados de la dieta (AGPI) afectan considerablemente la expresión de genes de cuatro familias de factores de transcripción: proteínas de unión al elemento regulador de esteroides (SREBPs),

receptores X del hígado (LXRs), factor nuclear hepático-4 alfa (HNF-4) y receptor activado por el proliferador de peroxisomas alfa, beta y gamma (PPARs). Estos factores de transcripción juegan un papel importante en el metabolismo de ácidos grasos, colesterol, triglicéridos, carbohidratos hepáticos y ácidos biliares, lo que demuestra una interacción compleja entre la dieta, el genotipo y la actividad de los genes y los diversos mecanismos de acción de los pequeños componentes bioactivos dietarios (Carrillo et al., 2016).

Un estudio examinó la influencia de dos sistemas de producción (pasturas y ensilado de maíz) en los perfiles de genes musculares en novillos Charolais de 30 meses de edad. Los músculos de los novillos en pastoreo mostraron más características oxidativas que los de novillos alimentados con ensilado de maíz, y además, se observó la disminución de la expresión de la selenoproteína W en los novillos en pastoreo. Aunque su función metabólica aun no es conocida, es probable que esta proteína desempeñe un papel en la defensa frente a los procesos oxidativos, por lo tanto, la expresión de la selenoproteína W en el músculo podría ser propuesta como un indicador potencial para un sistema de producción basado en pasturas (Cassar-Malek et al., 2009).

La estrategia hasta ahora ha sido la identificación de genes o proteínas que son expresados diferencialmente entre animales que presentan atributos de calidad extremos sin ningún conocimiento previo de los procesos involucrados. Actualmente se están desarrollando herramientas de la biotecnología para evaluar, al mismo tiempo y de forma rutinaria, todos los genes conocidos hasta el momento para predecir la calidad de la carne identificando previamente relaciones. El interrogante ahora es cómo modular con el fin de mejorar la calidad de este producto (Hocquette et al., 2009; Hocquette et al., 2012).

1.7. Importancia del trabajo

Argentina posee una plataforma de producción de carne bovina muy diversa, desde sistemas pastoriles puros hasta los engordes a corral y sus combinaciones. Puede generar carnes de distinto tipo y composición para diferentes mercados, incluso divergentes en la apreciación de la calidad. En la actualidad, es habitual el creciente interés de los mercados por la información sobre los atributos, una mayor diferenciación y definición del producto.

El valor nutritivo de los productos cárnicos es muy bien conocido y la posibilidad de manipular la composición de la carne a través de la alimentación, la genética y el manejo del estrés animal, permitiría lograr un producto con propiedades biológicas complementarias que produzca un beneficio contrastado sobre la salud de los consumidores. Entre las propiedades nutraceuticas de la carne, el interés científico y comercial se ha centrado en los últimos años en los atributos de los perfiles grasos de los distintos tipos de carne, el contenido de vitaminas y otros factores antioxidantes de naturaleza lipofílica, así como de minerales, como el hierro.

La utilización de estrategias nutricionales para mejorar la calidad de la carne desempeña un importante rol debido a su efecto regulador sobre los procesos bioquímicos en los músculos, lo que se refleja en la calidad del producto (Andersen et al.; 2005). Es así como los sistemas pastoriles producen carnes con características diferentes a los intensivos; presentan menor contenido de grasa y colesterol y mayores niveles de vitaminas antioxidantes y de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) que las de corral, lo que influye sobre aspectos organolépticos y la vida útil del producto (Yang et al., 2002; Realini et al., 2004; Descalzo et al., 2005). En consecuencia, las pasturas frescas podrían conferir a la carne mayor capacidad antioxidante, generar un producto más estable frente al deterioro oxidativo y más saludable.

Las vitaminas antioxidantes, naturalmente incorporadas, que parecen influir más significativamente en el estado oxidativo/antioxidante de la carne fresca son el α -tocoferol y el β -caroteno (Descalzo & Sancho, 2008). Se ha observado que la suplementación de las dietas del ganado bovino con estas vitaminas, en particular la vitamina E, no resulta tan eficiente como para alcanzar los valores nutricionales conferidos por la alimentación natural (Kerry et al., 1999; Descalzo & Sancho, 2008). De ahí la importancia de estudiar los mecanismos mediante los cuales estas vitaminas son incorporadas a los tejidos y la modulación de éstos por efecto de factores nutricionales, genéticos y ambientales, dado que conociendo los mismos, se podrán proponer estrategias de alimentación del ganado bovino con el fin de enriquecer dichos compuestos y así lograr un producto con propiedades diferenciales.

Al mismo tiempo, la expresión diferencial de genes asociados con el transporte de estas vitaminas antioxidantes hacia los tejidos animales y los factores que regulan la misma, constituyen un punto de partida para el estudio de posibles marcadores de calidad en carne (Descalzo, Nanni, Gasparovic, Rosetti, Islas-Trejo, Medrano & Pordomingo, 2011). La oportunidad de prevenir enfermedades y/o mejorar la salud humana mediante un factor ambiental de máxima importancia como lo es la alimentación, así como el desarrollo de ensayos que aporten a la diferenciación del producto, son aspectos trascendentes para la población y la industria alimentaria.

2. Hipótesis

Se espera que:

- Los bovinos terminados con la dieta de pasturas naturales incorporen mayores niveles de las moléculas antioxidantes ensayadas (α y γ - tocoferol, β -caroteno, retinol y luteína) en el tejido muscular.
- Los animales terminados con la dieta de pasturas naturales evidencien un aumento del estado antioxidante en el tejido muscular con respecto de los alimentados con la dieta de granos.
- La carne de los bovinos terminados con la dieta de pasturas naturales muestren mayor resistencia a la oxidación que la de los animales terminados a corral.
- La incorporación en el tejido muscular de las moléculas antioxidantes estudiadas esté asociada a la expresión de los genes candidatos ensayados, evaluados mediante la expresión diferencial de los mismos.
- La expresión diferencial de genes específicos asociados a la captación de vitaminas en tejido muscular, pueda ser potencialmente utilizada como indicador de dieta.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

- Profundizar en el conocimiento sobre factores a nivel bioquímico y molecular que influyen sobre la calidad antioxidante y, por lo tanto, sobre el agregado de valor a la carne bovina.

3.2. Objetivos específicos

- Cuantificar por HPLC vitamina E (isómeros α y γ), β -caroteno, retinol y luteína en muestras de músculo *Longissimus dorsi* (LD) de bovinos alimentados con dos dietas diferentes, dieta de pasturas y granos.
- Establecer la variabilidad en el contenido de los antioxidantes analizados entre las diferentes dietas.
- Determinar capacidad antioxidante total (CAO) en extractos acuosos y lipídicos de muestras de músculo LD de animales alimentados con las diferentes dietas.
- Determinar el grado de oxidación en muestras de LD en los bovinos alimentados con dos dietas diferentes.
- Analizar si existen diferencias significativas en la capacidad antioxidante total y en el estado de oxidación de muestras de músculo LD entre los dos sistemas de alimentación.
- Relacionar los contenidos de los antioxidantes evaluados y el estado de oxidación.

- Determinar la expresión de ARNm, mediante RT-PCR semicuantitativa, de cuatro proteínas asociadas a la captación de las vitaminas en el músculo.
- Establecer si existen diferencias significativas en la expresión, a nivel de ARNm, de las cuatro proteínas en muestras de LD modulada por el cambio de dieta.
- Relacionar los niveles de los antioxidantes evaluados y la expresión diferencial de genes candidatos, con la capacidad antioxidante en músculo de bovinos con dos estrategias de alimentación.

4. Materiales y Métodos

4.1. Muestras

4.1.1. Caracterización de las muestras.

Las muestras se obtuvieron de novillos raza Aberdeen Angus criados en la estación experimental Anguil (EEA Anguil-La Pampa), del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Las muestras (n=12) de músculo *Longissimus dorsi* (LD), provinieron de animales que recibieron dos dietas diferentes de terminación. Todos fueron faenados cuando presentaban un peso aproximado de 480 kg, independientemente de las diferencias exhibidas en las tasas crecimiento.

Los tratamientos fueron:

Dieta de pasto (P) (n=6): recría en verdeos de invierno y pasturas perennes de leguminosas y terminación durante 150 días con pasturas de alfalfa o maíz ensilado.

Dieta de grano (G) (n=6): recría en verdeos de invierno y pasturas perennes de leguminosas y terminación a corral durante 150 días con dieta de alto grano (68% de ensilado de maíz, 15% de harina de girasol, 5% de heno y 2% de núcleo vitamínico y mineral).

Al ingreso a los corrales, se llevó a cabo un período de 10 a 15 días de acostumbramiento progresivo a la nueva dieta. Al finalizar el período de engorde los animales se faenaron en un frigorífico habilitado para exportación, siguiendo los protocolos establecidos en el mismo, y se obtuvieron los cortes de músculo necesarios para llevar a cabo las determinaciones que se describen en este trabajo. Todos los procedimientos utilizados cumplieron con las normas nacionales relativas a la experimentación con animales de granja (INTA).

Las muestras de tejido bovino se rotularon y se conservaron en nitrógeno líquido (-150°C) en bolsas estériles con cierre hermético hasta el envío al laboratorio, donde se

conservaron en ultrafreezer (-80°C) hasta su análisis.

Tabla 1

*Identificación de las muestras
de LD según el tipo de dieta*

Dieta	Muestra (N°)
Pasto	1 - 3 - 6 - 8 - 9 - 11
Grano	2 - 4 - 5 - 7 - 10 - 12

4.1.2. Procesamiento de las muestras.

Las muestras de LD se trituraron en morteros estériles con N₂ hasta obtener el tejido muscular en forma de polvo. Este se mezcló y se almacenó en envases estériles de polipropileno en ultrafreezer (-80°C) en diferentes fracciones para la realización posterior de los ensayos.

4.2. Análisis

La totalidad de las determinaciones se efectuaron utilizando una muestra de tejido por animal que se examinó por duplicado.

4.2.1. Determinación del contenido de vitaminas antioxidantes.

En extractos de las muestras de LD se cuantificaron, por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia de Fase Reversa (RP-HPLC), las vitaminas: E (isómeros α y γ), β -caroteno, retinol y luteína.

4.2.1.1. Extracción de las vitaminas.

Se utilizó la técnica de Buttriss & Diplock (1984), adaptada según Descalzo et al. (2005), que consta de una extracción previa de la muestra con n-hexano y un paso de saponificación.

Se pesaron en frío 5 g de cada muestra de tejido magro por duplicado en tubos cónicos de polipropileno que contenían buffer fosfato de potasio 0,05 M pH 7,7 (1:2 P/V) y se homogeneizaron durante 30 s con un homogenizador Ultraturax T25 (IKA, Germany) a 3000 rpm en baño de hielo. A 3 ml del homogenato obtenido, se le adicionaron 6 ml de pyrogallol (Sigma–Aldrich St. Louis, USA) 1% P/V en etanol p.a. preparado en el momento para evitar la oxidación de las vitaminas, se mezcló con vortex y se incubó 2 min a 70°C en baño termostatzado (Vicking, modelo Dubnoff).

La saponificación se llevó a cabo durante 30 min a 70 °C en baño de agua, previo agregado y mezclado con vórtex, durante 10 s, de 0,9 ml de KOH (10 N) (Merck Química, Argentina). Los tubos se agitaron con vórtex cada 10 min por 10 s, y una vez finalizado el proceso, se enfriaron en baño de hielo. Luego de adicionar 3 ml de agua bidestilada (H₂O_{dd}) a cada tubo y mezclar, las muestras se extrajeron dos veces con n-hexano (J. T. Baker, USA, grado HPLC). La primera extracción se hizo con 12 ml del solvente agitando de forma rotatoria por 2 min. Luego se separó la fase hexano superior en un nuevo tubo con tapón a rosca y se reservó (esta fase contiene las vitaminas antioxidantes). La fase acuosa se reextrajo con 6 ml de hexano, se separó la fase hexano superior y se reunió con la anterior. Los extractos combinados se evaporaron a sequedad en corriente de nitrógeno. En este paso, las muestras pueden reservarse en freezer a -20°C para su análisis posterior, siempre y cuando se proceda al gaseado con nitrógeno y sellado de los tubos con teflón para evitar la oxidación. Los residuos se resuspendieron en 500

μl de etanol absoluto (J. T. Baker, USA, grado HPLC) y se filtraron por una membrana de nylon (Filtros HULP 04700, 0,45 μm de porosidad) previo al análisis por HPLC.

Todo el proceso de extracción se llevó a cabo en iluminación tenue, preferiblemente iluminación oro, para evitar la oxidación de los compuestos sensibles a la luz, por ello las fases se reunieron en tubos con tapones a rosca y protegidos con papel de aluminio.

4.2.1.2. Condiciones de la HPLC.

Todas las muestras y los estándares externos para cada vitamina se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC). Este tipo de cromatografía es uno de los métodos de elección para el análisis de carotenoides debido a que la retención es poco afectada por variaciones en la composición de la fase móvil, el riesgo de formación de artefactos en el paso a través de la columna es mínimo y las interacciones del soporte del soluto sobre las fases no polares involucran fuerzas débiles (Barua, Furr, Olson, & Van Breemen, 2000).

Para el desarrollo de este trabajo se disponía de dos equipos de HPLC (Thermo Separation Products Inc., USA), ambos con una bomba cuaternaria (modelo P4000) y una membrana de vacío desgasificadora, conectados a una columna de acero inoxidable C18 (250 mm x 4.6 mm, Alltima, Alltech, Argentina) con un diámetro de partícula de 5 μm y una precolumna del mismo material.

Uno de los equipos contaba con un muestreador automático (AS2000), con bucle de inyección de 10 a 100 μl y dos detectores Spectra System, uno UV-Visible (UV6000 LP) y otro de fluorescencia (FL3000). Para los tocoferoles (isómeros α y γ) se empleó el detector de fluorescencia a 292-330 nm para absorción y emisión, respectivamente. El detector UV6000 se fijó en 445 nm para la detección de β-caroteno, en 470 nm para la luteína y en 325 nm para el

retinol. La fase móvil utilizada fue etanol: metanol (J.T. Baker, Argentina, grado HPLC) (60:40 V/V) en modo isocrático con un caudal de 1ml/min. La técnica permite determinar tocoferoles, carotenoides incluida la luteína y retinol, en una sola corrida con un tiempo de elución de 25 min.

El segundo sistema, era de inyección manual y poseía un bucle de 20 μ l y un detector electroquímico (Decade, Antec Leyden, The Netherlands) equipado con una celda de referencia de Ag/AgCl y un electrodo de trabajo de carbón.

Para evaluar cual de los dos sistemas cromatográficos era más conveniente para la cuantificación de vitaminas antioxidantes en carne, se realizaron ensayos previos en el Laboratorio de Antioxidantes del Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA). Los resultados, comparables con valores de pendiente cercanos a 1 en las relaciones entre ambos procedimientos, demostraron que ambos sistemas eran adecuados excepto para el retinol. Para el caso particular del retinol, aunque el sistema con detección electroquímica es de al menos un orden más sensible que el sistema con detección UV-Visible/Fluo, existe el inconveniente que la molécula sale muy cerca del inicio de la corrida, seguido al frente de etanol, lo que dificulta su cuantificación. En consecuencia, se optó por el segundo debido a que en una misma corrida se pueden cuantificar todos los antioxidantes propuestos (Ramos; 2010).

4.2.1.3. *Cuantificación de las vitaminas.*

Para la cuantificación de las vitaminas antioxidantes, se generaron curvas de calibración a partir de una solución de concentración conocida de cada una de ellas y de la que luego se prepararon diluciones en etanol, seleccionadas en base al contenido estimado de los distintos antioxidantes presentes en las muestras.

Las curvas de calibración se realizaron con estándares de DL- α -tocoferol (Merck, Darmstadt, Alemania) y β -caroteno, γ -tocoferol, luteína y retinol (Sigma–Aldrich, St. Louis, USA) diluidos en etanol absoluto (J. T. Baker, USA, grado HPLC), procedimiento que se explica en detalle en este apartado solo para el caso del α -tocoferol. La recuperación de todos ellos fue del 98%.

Para la construcción de la curva de calibración del α -tocoferol, se realizó una dilución 1/100 del estándar (α -toco fluk A 1 mg/ml) en etanol absoluto grado HPLC en un eppendorf (20 μ l estándar + 1980 μ l de etanol). Se midió la absorbancia de esta solución a 292 nm en un espectrofotómetro UV/VIS Perkin – Elmer (Rotkreuz, Switzerland) modelo Lambda Bio 20, utilizando como blanco etanol. Con este valor ($A=0,068$) y sabiendo que el coeficiente de extinción molar para este caso es $E_{292} = 75,8$ gr/100ml, se calculó la concentración de la solución estándar madre que luego se emplearía para los ensayos, del siguiente modo:

$$E_{292} = \text{densidad óptica (DO)} / \text{concentración (CC)}$$
$$CC = (0,068 * 100) / (75,8 \text{ gr/100ml}) = 0,089709 \text{ gr/100 ml}$$
$$\text{Cálculo para 1ml} = 8,97E^{-04} \text{ gr/ml} * 1000\text{mg/gr} = 0,89709 \text{ mg/ml}$$
$$\text{Como la dilución es 1/100: } CC = 8,9709E^{-03} \text{ mg/ml}$$

A partir de esta solución madre se realizaron cinco diluciones para inyectar en el HPLC. Las señales cromatográficas fueron colectadas a través del acoplamiento del detector con el equipo de HPLC y para el análisis de los datos se utilizó el programa Chromquest 4.0, Chromatographic Work Station (Thermoquest products). En base al cromatograma obtenido y los respectivos tiempos de retención (T_r), se integró para obtener el valor de las áreas de los picos correspondientes. De esta manera se obtuvieron los puntos para la construcción de la curva de calibración. Se aplicó regresión lineal simple en donde, los valores de las áreas se asignaron a

la variable dependiente (y) y las concentraciones del estándar, a la variable independiente (x). El mismo procedimiento se siguió para todos los antioxidantes analizados.

La identificación de los diferentes antioxidantes se llevó a cabo por comparación de los tiempos de retención (Tr) de los estándares con los tiempos de retención de las muestras en las mismas condiciones. Las determinaciones de los niveles de vitaminas antioxidantes en las muestras se efectuaron en cuatro diluciones (1/2, 1/5, 1/10 y 1/20) por duplicado, a partir de una cantidad conocida de los distintos estándares considerando la recuperación de los mismos, y los resultados se expresaron en $\mu\text{g/g}$ de carne.

Todos los pasos de preparación de estándares y muestras se llevaron a cabo en una habitación con luz tenue para evitar la descomposición de las vitaminas.

4.2.2. Determinación de la capacidad antioxidante.

Se efectuó con el método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) adaptado para muestras de carne, es decir, un ensayo en extracto hidrosoluble y otro en extracto liposoluble, de acuerdo con Linden (2003) y la modificación de Mahecha et al. (2010). Asimismo, para medir la capacidad endógena de la muestra debida a iones Fe^{2+} presentes que podrían reducir el complejo y producir color azul, se llevó a cabo la modificación propuesta por Descalzo et al. (2007).

- **Preparación del extracto hidrosoluble:**

5 g de las muestras de LD pulverizadas y congeladas a -80°C se homogeneizaron en 10 ml (1:2 P/V) de tampón fosfato de potasio 0,05 M pH 7,2 con un Ultraturax (IKA, Alemania) durante 2 min a 3000 rpm. Los homogenatos se centrifugaron a 10.000 g durante 30 min a 4°C y se recolectaron los sobrenadantes para la colorimetría.

- **Preparación del extracto liposoluble:**

Se pesaron 5 g de las muestras de LD pulverizadas y congeladas a -80°C y se disgregaron en 5 ml de solvente de extracción acetona:etanol:agua destilada (5:4:1 V:V:V) con un Ultraturrax (IKA, Alemania) durante 2 min a 3000 rpm. Se centrifugaron 30 min a 10.000 g a 4°C y se tomaron los sobrenadantes para la colorimetría (Mahecha et al., 2010).

Una vez obtenidos los dos extractos se procedió de la misma manera. Se añadieron alícuotas de 83 μl de cada sobrenadante a cubetas que contenían 2,5 ml de reactivo FRAP tamponado. El reactivo FRAP se preparó por la mezcla de tampón acetato (300 mM, pH 3,6), TPTZ (2,4,4-Tri (2-piridil)-s-triazina, Sigma-Aldrich, Argentina) 10 mM en HCl 40 mM y $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM, (Sigma-Aldrich Argentina) en relación 10:1:1 (V/V/V) (Soluciones y Reactivos).

Las mezclas de reacción se homogeneizaron e incubaron a 37°C en baño de agua por espacio de 4 min para desarrollo del color. Al cabo de este tiempo se enfriaron en baño de agua y se midió inmediatamente la absorbancia a 593 nm en un espectrofotómetro UV/VIS Perkin – Elmer (Rotkreuz, Suiza), modelo Lambda Bio 20 (Pulido, Bravo & Saura-Calixto, 2000; Descalzo et al., 2007). El valor de absorbancia a los 4 min de reacción se tomó como medida de FRAP expresada en equivalentes de Fe (II) en mM/g de tejido fresco.

El contenido endógeno de Fe^{2+} (FRAP_0), se determinó con la solución de TPTZ/HCl pero sin el agregado de FeCl_3 a la mezcla de reacción (Descalzo et al., 2007).

La cantidad de hierro reducido se determinó por medio de una curva de calibración que se construyó empleando un estándar de sulfato ferroso 100 mM ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich, Argentina, SA), cubriendo un rango de concentraciones entre 100 y 1000 μM con la siguiente relación: 1 parte de las distintas concentraciones del estándar y 34 partes del reactivo.

4.2.3. Medida de la oxidación lipídica.

La medida de la oxidación lipídica se realizó por la determinación de TBARS (Sustancias Reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico). Se utilizó la técnica de precipitación ácida descrita por Pensel (1990) y Descalzo et al. (2005).

Para estimar el grado de oxidación basal de las muestras, el ensayo se efectuó sin inducción de la oxidación (TBARS basal) y con inducción de la oxidación (tiempo 0 y 30 min) (Descalzo et al., 2005; Descalzo et al., 2007; Mahecha, Nuernberg, K., Nuernberg, G., Ender, Hagemann, & Dannenberger, 2009).

4.2.3.1. Preparación de las muestras para el ensayo de TBARS.

Se prepararon homogenatos con 5 g de carne y 10 ml de tampón fosfato de potasio 0,05 M pH 7,2. La homogeneización se realizó con Ultra Turrax durante 2 min a 3000 rpm.

- **Sin inducción (TBARS basal):**

Se tomaron 0,5 ml de cada homogenato y se mezclaron de inmediato con 0,25 ml de ácido tricloroacético 20% P/V (Merck, Darmstadt, Alemania).

- **Con inducción (tiempo 0 y 30 min):**

Para estimular la peroxidación lipídica, a una alícuota (3 ml) de cada homogenato muscular se le agregaron soluciones de ácido ascórbico 0,1 mM (Merck, Darmstadt, Alemania) y sulfato ferroso 5 μ M ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich, Argentina). A partir de esta mezcla se extrajeron de inmediato 0,5 ml que se adicionaron a 0,25 ml de ácido tricloroacético (TCA) 20% P/V (Merck, Darmstadt, Alemania). El homogenato restante, se incubó en un baño de agua a 37°C durante 30 min. Al cabo de ese tiempo, se extrajeron 0,5 ml que se colocaron en la solución de ácido tricloroacético anteriormente citada.

Luego, todas las muestras acidificadas se centrifugaron a 10.000 g por 10 minutos y 0,5 ml de los sobrenadantes se mezclaron con un volumen igual (0,5 ml) de ácido 2-tiobarbitúrico 0,02 M fresco (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA) que se incubaron a 25°C durante 15 h en oscuridad, hasta el desarrollo de un color rosado. Se determinó absorbancia a 530 nm con un espectrofotómetro UV/VIS Perkin–Elmer (Rotkreuz, Switzerland), modelo Lambda bio 20. Cada muestra se analizó por duplicado. La intensidad del color está directamente relacionada con la concentración de las sustancias que reaccionan con el TBA en la muestra original.

Las concentraciones de TBARS se calcularon con una curva de calibración usando como estándar una solución de TEP $1 \times 10^{-3} \text{M}$ (1,1,3,3-tetraetoxipropano, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), precursor del malondialdehído (MDA), en el rango comprendido entre 0 y 0,5 μM . A pesar de la inestabilidad del TEP, éste es más estable que el MDA, razón por la cual se lo utiliza para elaborar la curva estándar. El TEP se hidroliza en medio ácido, proceso que se favorece con la adición de TCA (Grau et al., 2000; Fenaille, Mottier, Turesky, Ali, & Guy, 2001). Los resultados se expresaron como mg de MDA/kg de carne.

4.2.4. Análisis estadístico.

Las variables bioquímicas se compararon para las dos dietas (pasto y corral) con seis animales por grupo. El contraste de varianzas de cada variable calculada para los dos grupos, se determinó con la prueba de homogeneidad de varianzas de *Levene*, y los valores medios se compararon mediante la *prueba t* para muestras independientes. Se consideraron significativas las diferencias con $p < 0,05$. Se utilizó el software IBM SPSS Statistics 23.0. Las relaciones entre las variables se determinaron por correlación utilizando el *coeficiente de correlación de Pearson* con el citado software.

4.2.5. Expresión de genes relacionados con la incorporación de vitaminas antioxidantes en el tejido muscular.

La evaluación de la expresión génica de potenciales determinantes moleculares de dieta en bovinos, fue realizada mediante una reacción de retro-transcripción - reacción en cadena de la polimerasa semicuantitativa (RT-PCR), a partir del ARN total aislado de muestras de músculo bovino *Longissimus dorsi* (LD).

El procedimiento experimental empleado se puede sintetizar como sigue: se aisló ARN total de muestras de músculo bovino (LD), se determinó concentración y pureza e integridad por electroforesis en gel y se hizo un tratamiento con DNasa I; luego, se efectuó una RT para transformar los ARN de interés en ADN complementario (ADNc), los que se amplificaron con la Taq polimerasa en presencia de cebadores específicos, correspondientes a los ARNm de proteínas relacionadas con el transporte o unión de vitaminas con actividad antioxidante. Por último, el análisis de los productos de amplificación de los ARNm se realizó por electroforesis en gel de agarosa.

Todas las técnicas que se llevaron a cabo en este apartado tuvieron que ser ajustadas y modificadas de la bibliografía consultada, para poder obtener resultados reproducibles.

4.2.5.1. Extracción de ARN del tejido muscular.

El ARN total fue aislado mediante el método de extracción con Trizol® (Reagent Invitrogen™, Cat. # 15596-018) (Chomczynsky & Sacchi, 1987). Esta técnica se basa en la utilización de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina para lisar las células y separar la muestra en dos fases (acuosa y orgánica). A partir de la fase acuosa se extrae y se precipita el ARN total con cloroformo e isopropanol, respectivamente.

Se enfriaron tubos Falcon (Polypropylene Round-Bottom Tube 35 - 2059 cat.) de base redonda con nitrógeno líquido. En estos tubos se pesaron aproximadamente 500 mg de cada muestra de tejido pulverizado con N₂ y congelado. Se adicionaron 4500 µl del volumen total de Trizol® (relación 1:10). Se homogeneizaron en Ultraturrax (IKA, Alemania) a velocidad 3 por 30 s hasta disgregación total de las muestras, manteniendo los tubos en baño de hielo. Las suspensiones se centrifugaron a 12.000 g por 15 min a 4 °C en una centrífuga (Sigma 3K30) para eliminar los restos celulares. Los sobrenadantes se transfirieron a otros tubos que se mantuvieron durante 5 min a temperatura ambiente para completar la disociación de los complejos nucleoproteicos. Luego se añadieron a cada tubo, 1/5 del volumen total de cloroformo frío y se agitaron vigorosamente a mano (cabeza-cola) durante 15 s. Se dejaron reposar 2 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12.000 g durante 20 min a 4 °C.

Se recuperaron las capas superiores acuosas que contienen el ARN total y se colocaron en tubos libres de ARN previamente enfriados. Estas fases, se resuspendieron en isopropanol (1 volumen por cada vol. de Trizol®). Se mezclaron suavemente cabeza-cola en forma envolvente, se dejaron reposar 10 min a temperatura ambiente y luego se colocaron 1 h 30 min a -20°C.

Luego se centrifugaron a 12.000 g durante 20 min a 4 °C, se descartaron los sobrenadantes y los pellets se lavaron con 5 ml de etanol 75% frío. Se centrifugaron nuevamente a 12.000 g por 5 min a 4 °C y se descartaron los sobrenadantes. Los residuos se transfirieron a tubos Eppendorf fríos. Para facilitar el pasaje de los pellets de ARN se adicionaron 750 µl de etanol frío. Se repitió el lavado con el mismo volumen de etanol frío y se volvieron a centrifugar a 12.000 g durante 5 min a 4 °C (Microcentrifuge 22 R Beckman Coulter). Se volcaron los sobrenadantes y los pellets de ARN total se secaron por 5 min en horno de vacío, se resuspendieron en 120 µl de H₂O DEPC (dietilpirocarbonato 0,01% V/V), y se disolvieron por

incubación durante 10 min a 56°C. Se tomó una alícuota para determinar concentración, grado de pureza e integridad del ARN total aislado. La alícuota restante se almacenó a -80°C. Con este procedimiento, en un volumen de 120 µl, se obtiene ARN total en una concentración promedio de 0,9 a 1,7 µg/µl, siendo el rendimiento aproximado de 0,2 - 0,4 µg/mg de tejido.

Todos los tubos y materiales descartables empleados eran nuevos, óptimos para Biología Molecular, libres de DNA/RNAasa y estériles. La superficie de trabajo se limpió previamente con RNase away (Invitrogen). Entre muestras diferentes se realizó un lavado secuencial de las cuchillas del Ultraturrax, primero con agua destilada estéril (Milli-Q®) con detergente, luego dos veces con agua destilada estéril (Milli-Q®), una vez con etanol absoluto, nuevamente con agua destilada estéril (Milli-Q®).

4.2.5.2. Determinación de la concentración y pureza del ARN aislado.

La concentración del ARN total se determinó por espectrofotometría a 260 nm, y la pureza, se estimó a partir de la relación entre los valores obtenidos de las lecturas de absorbancias realizadas a 260 nm y a 280 nm (A_{260}/A_{280}). Este valor debe encontrarse entre 1,8 y 2,0 para que pueda considerarse aceptable la calidad del ARN extraído. En los casos en que resultó menor, se repitió el proceso de extracción de la muestra.

Las mediciones se efectuaron por duplicado, en cubetas descartables libres de ARN, en un espectrofotómetro UV/VIS Perkin – Elmer (Rotkreuz, Switzerland) modelo Lambda Bio 20. Éstas se llevaron a cabo en 150 µl de tres diluciones (1:10, 1:100 y 1:500) de las muestras disueltas en NaOH 8 mM (Merck, Argentina). Una vez obtenidos los valores de absorbancia de las muestras, a partir de la siguiente ecuación, se puede conocer su concentración sabiendo que una unidad de absorbancia a 260 nm ($1 A_{260}$) = 40 µg de ARN/ml, relación válida sólo para

mediciones efectuadas a pH neutro o ligeramente alcalino y para el trayecto óptico estándar de 1 cm (Chomczynski & Sacchi, 1987; Hongbao, Young & Shen, 2008; Qiagen Protocol RNA, cap. 3).

$$\text{Concentración de ARN } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (A_{260}) \cdot (40) \cdot (\text{dilución}) / 1000$$

4.2.5.3. Evaluación de la calidad del ARN extraído.

La integridad del ARN total obtenido se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes. El agregado de formaldehído en el gel altera la estructura secundaria del ARN de modo que las moléculas de éste pueden ser separadas por su tamaño.

Se consideró que el ARN estaba íntegro, cuando las bandas correspondientes a los ARN ribosómicos 35S y 18S aparecían agudas en el gel teñido y la intensidad de la señal del primero era alrededor del doble de la del segundo. Si las bandas ribosomales presentaban iguales intensidades o se visualizaban como un “chorreado”, se consideró que la muestra sufrió durante la preparación, una degradación parcial o significativa, respectivamente. En ambos casos se extrajo de nuevo el ARN total de la muestra.

Para preparar el gel de agarosa/formaldehído se procedió a pesar 0,35 g de agarosa (proporción equivalente al 1% según el gel de uso), se agregó 21,8 ml de agua (Milli-Q®) estéril y se disolvió en microondas 30 s a potencia máxima. La solución se dejó enfriar a 60°C; se adicionó 7 ml de buffer MOPS 5X (Soluciones y Reactivos) y 6,24 ml de formaldehído 37%. Por último se añadió 3 μl de bromuro de etidio (10 mg/ml) y se esperó hasta su gelificación aproximadamente 30 min. El gel se transfirió a la cuba de electroforesis cubriéndolo con el buffer de corrida (MOPS 5X) (Sambrook & Russell, 2001).

Se mezcló 5 µl de cada una de las muestras de ARN con 15 µl de buffer de siembra (Soluciones y Reactivos). Se calentó a 65°C durante 10 min y se enfrió inmediatamente a 0°C. Se sembró 10 µl de estas soluciones en el gel. La corrida se realizó a temperatura ambiente en una cuba de electroforesis horizontal (Wide-Mini-Sub Cell GT cell, Bio-rad) a 25-30 Volts (50 mA como máximo) durante 2-3 horas. El gel se visualizó en un transiluminador a la luz UV (Dual System Transiluminator UVP Inc.).

4.2.5.4. Tratamiento de las muestras de ARN con DNAsa-1.

En la actualidad no se dispone de un método de purificación que pueda garantizar que el ARN aislado esté completamente libre de ADN, incluso cuando no se visualiza en un gel de agarosa.

Con el propósito de eliminar los residuos de ADN genómico que pudieron haber sido extraídos junto con el ARN total, las muestras se trataron con DNAsa-1. Para ello se siguió el protocolo del Kit DNAsa-1 (Invitrogen Argentina S.A).

La mezcla de reacción se efectuó con 1 µg de muestra de ARN extraído, 1 µl de buffer, 1 µl de DNAsa-1 y se completó con agua DEPC (dietilpirocarbonato 0,01% V/V) hasta 10 µl. Se incubó 1h a 25°C. Al finalizar se agregó 1 µl de EDTA 25 mM y se incubó 10 min a 65 °C en bloque termostático (Accublock Digital Dry Bath, Labnet International Inc.) para inactivar la enzima. El ARN tratado con DNAsa-1 fue almacenado a -80°C hasta efectuar la síntesis de ADN complementario.

4.2.5.5. Síntesis de ADN complementario (ADNc).

A partir del ARN total tratado con DNAsa-1, se sintetizó el ADNc mediante una reacción de retro-transcripción (RT).

La mezcla de reacción se realizó con 1 µl de ARN (2 µg) tratado con DNAsa-1, 1 µl de Buffer RT 5x (Promega), 0,5 µl de una solución 10 mM de dNTPs (Promega) (soluciones y reactivos), 0,125 µl de RNAsin 40 U/µl (Promega), 0,165 µl de “Random Primers” 2 µg/µl (Alfa DNA), 0,17 µl de Transcriptasa Reversa M-uLV 200 U/µl (Promega) y se completó con 2,0 µl de H₂O libre de DNAsa/RNAsa (Invitrogen) para obtener un volumen final de 5 µl por muestra. Esta reacción fue realizada para cada muestra por duplicado.

Los volúmenes de la mezcla de reacción modelo descrita anteriormente, fueron modificados manteniendo las relaciones de concentración de los reactivos de acuerdo a los valores de concentración de ARN obtenidos para cada muestra, de manera tal que la RT se realizó en todos los casos con 2 µg de ARN.

La reacción se realizó en un termociclador Eppendorf Mastercycler® Personal sometiendo la muestra a un ciclo de síntesis de ADNc a 42 °C durante 45 min, luego a 94 °C por 10 min para desnaturalizar la enzima y estabilización a 4°C. Una vez finalizados los ciclos, el ADNc se almacenó a -80°C.

4.2.5.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los productos de la reacción de RT se amplificaron por PCR. Para la reacción de PCR se utilizaron los 5 µl de la reacción de retrotranscripción.

Se realizó una mezcla de reacción que contenía: 0,5 µl de cada uno de los oligonucleótidos iniciadores, 0,125 µl de Taq DNA polimerasa 0,5 U/µl (Promega), 0,75 µl de

MgCl₂ de 50 mg/ml, 2,5 µl de buffer PCR 10x (Promega) y 15,63 µl de H₂Odd, para obtener un volumen final de 20 µl, a los cuales se les agregaron los 5 µl del producto de la reacción de RT. La reacción se realizó en el termociclador Eppendorf Mastercycler® Personal con el perfil de ciclado descrito en la Tabla 2.

Tabla 2

Ciclado para la reacción en cadena de la polimerasa

Reacción en cadena de la polimerasa	Ciclado
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Desnaturalización: 94 °C durante 30 seg.
Amplificación del producto de la reacción de RT	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Pegado de “primers”: 58 °C durante 30 seg. ▪ Síntesis: 72 °C durante 45 seg. ▪ Extensión final: 72 °C durante 5 min ▪ Estabilización: infinito a 4°C.

En este trabajo se llevó a cabo la técnica RT-PCR tradicional, en dos pasos. Se emplearon “random primers” en la reacción de RT, obteniéndose ADNc de todo el ARN.

Con el fin de determinar el punto óptimo para visualizar la expresión diferencial de cada gen a evaluar, se realizó la amplificación con diferentes números de ciclos. El protocolo detallado en la Tabla 2 se repitió, para cada muestra y cada par de cebadores, con 28, 30 y 35 ciclos de amplificación.

Los oligonucleótidos iniciadores se diseñaron en el laboratorio de Antioxidantes del Área Bioquímica y Nutrición del Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA), INTA Castelar (Descalzo, 2009). El diseño se programó a partir de secuencias presentes en la base de datos genéticos “GenBank” de ARNm, para las proteínas a estudiar. Se utilizaron la base de datos de nucleótidos de la especie *Bos taurus* del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y el programa Primer 3 versión 0.4.0.

Los parámetros para el diseño fueron: longitud equivalente a 20 nucleótidos, cantidad de GC \geq 45%, temperatura de alineamiento 60 ± 2 °C. Se utilizó ARN 18 S como gen de expresión constitutiva.

En las tablas 3 y 4 se especifican la denominación, ubicación, número de acceso de la página web NCBI para cada gen consultado, al igual que el nombre, la secuencia, la temperatura de fusión (Tm) y el tamaño esperado de los productos amplificados para cada transcripto.

Tabla 3

Denominación, ubicación e identificación de los genes seleccionados para los ensayos de transcripción de los ARNm

Gen	Denominación	Ubicación
AOXP2	[Bos taurus] AOP2 MGC cDNA clone anti-oxidant protein 2 (non-selenium glutathione phospholipid-peroxidase). Other Designations: acidic calcium-independent phospholipase A2; peroxiredoxin 6 (PRDX6)	Chromosome: 16 Gene ID: 282438
CRBP-1	[Bos taurus] Cellular retinol binding-protein 1	Chromosome: 1 Gene ID: 537379
α -TAP	[Bos taurus] Tocopherol (alpha) associated protein/ activator transcription. SEC14-like protein 2 (<i>S. cerevisiae</i>)	Chromosome: 17 Gene ID: 282469
α -TTP	[Bos taurus] Tocopherol (alpha) transfer protein/TTPA	Chromosome: 14 Gene ID: 286813
18 S	[Bos taurus] 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Nr

Nr : no registrada.

Tabla 4

Oligonucleótidos iniciadores específicos utilizados para los ensayos de transcripción de los ARNm

Nombre ^a	Secuencia (5' > 3')	Tamaño produc. de PCR (pb)	Tm (°C)	Secuencia ^b
AOXP2 (F)	AGGCATGAGCAACATGACTG		60	
AOXP2 (R)	AATATCTCCCTCCCCCACTG	161	62	NM_174643
CRBP-1 (F)	AGGACGGGGACCAGTTCTAC		60	NM_001025343/ XM_617541/ AF502256
CRBP-1 (R)	CCCCTCCAGAAGAGTTTGTG	162	62	
α -TAP (F)	GCATCTATGTCCTGCGGTTT		60	NM_17943.2/ AF_432353
α -TAP (R)	CCCCAACTGTTGCATCTTCT	119	60	
α -TTP (F)	CACACTGGGACCCAAAAGTT		60	XM_587081.3
α -TTP (R)	TGAAAGGCATGAGCAAACCTG	151	60	
18 S (F)	AAACGGCTACCACATCCAAG		60	
18 S (R)	CGCTCCCAAGATCCAACCTAC	417	62	AF176811

^a: Dentro del nombre las letras (F) y (R) indican que se trata de un oligonucleótido “forward” o “reverse”, respectivamente.¹

^b: Se refiere al número de acceso de la secuencia reportada para cada transcripto en *GenBank*, National Center for Biotechnology Information (NCBI) (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Todos los ensayos, el de extracción, el de retro-transcripción y la reacción en cadena de la polimerasa, fueron realizados con Eppendorf® y tips de barrera con filtro descartables, con tratamiento de libre de DNAsa/RNAsa (Axygen). Además, se utilizaron micropipetas exclusivas que nunca estuvieron en contacto con producto amplificado o ARN de otras fuentes. Las mezclas

¹ El diseño de los oligonucleótidos se realizó únicamente con regiones exónicas, eludiendo las secuencias entre las uniones exón-intrón con el fin de evitar una probable amplificación inespecífica del ADN genómico.

de la reacción de retrotranscripción y de la reacción de PCR fueron realizadas en una cabina de aislamiento previamente irradiada con UV.

Los productos de PCR obtenidos se resolvieron en geles de agarosa al 1,8% (Ultrapure™ Invitrogen) (Soluciones y Reactivos) en Buffer TAE 1X (Tris acético – EDTA) (Soluciones y Reactivos) que se tiñeron con 5 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml). Las corridas electroforéticas se realizaron a 95 volts durante 40 min, 6-12 volts/cm a temperatura ambiente en una cuba de electroforesis horizontal (Wide-Mini-Sub Cell GT cell, Bio-rad). Las muestras (10 µl) de tres diluciones (tal cual, 1/2 y 1/10) se sembraron en el gel con el agregado de 2 µl de azul de bromofenol - xilenecyanol (Soluciones y Reactivos). Se incluyó en cada corrida 4 µl de un marcador de peso molecular (100 – 2000 pb, Low DNA Mass Ladder, Invitrogen).

Posterior a la corrida electroforética, los productos amplificados por PCR se visualizaron en el gel a la luz UV en un transiluminador (Dual System Transiluminator UVP Inc.). Se determinó la expresión semicuantitativa de cada gen empleando el programa *ImageJ*, para procesamiento de imágenes digitalizadas de geles. El valor obtenido de cada imagen fue normalizado a la señal correspondiente al ARN 18 S, lo que también fue indicativo de la eficiencia de la reacción. El resto de los productos de la PCR fue almacenado a 4 °C.

4.2.5.7. Criterio de validez y positividad.

A partir de las muestras de musculo bovino LD de los 12 animales del ensayo, se extrajo y purificó el ARNm, se realizó la amplificación por RT-PCR por duplicado con los “primers” detallados en la Tabla 4, incluyendo los correspondientes al ARN del 18S el cual se utilizó como criterio de validez de la técnica (control positivo de expresión constitutiva). La expresión del ARN 18S, además, fue utilizada para determinar la expresión relativa de los genes de interés.

Como control negativo, se realizó la extracción de una muestra conteniendo H₂O, de manera de asegurar la no contaminación entre muestras y la no existencia de productos de amplificación.

5. Soluciones y Reactivos

Acetona (J. T. Baker, Argentina, grado HPLC)

Ácido ascórbico 0,1 mM (Merck, Darmstadt, Alemania)

Ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) 0,02 M (**4,6-dihidroxipirimidina-2-tiol**) (Sigma–Aldrich, St. Louis, USA, PM: 144; 15 g/mol; pureza \geq 98%)

Ácido tricloroacético (TCA) 20% P/V en H₂O dd. (Merck, Darmstadt, Alemania, PM: 163,38 g/mol)

Agarosa 1,8% (Ultrapure™ Invitrogen)

Agua DEPC

0,1 ml dietilpirocarbonato

100 ml H₂O dd.

Agua libre de DNAsa/RNAsa (Invitrogen)

Agua Milli-Q® estéril

β-caroteno (Sigma–Aldrich, St. Louis, USA)

Bromuro de Etidio 1 % P/V

1 g bromuro de etidio

100 ml H₂O dd.

Buffer fosfato de potasio 0,05 M pH 7,2 (Merck Química, Argentina)

Buffer fosfato de potasio 0,05 M pH 7,7 (Merck Química, Argentina)

Buffer PCR 10x (Promega)

Buffer RT 5X (Promega)

Buffer de Siembra

0,25 % azul de bromofenol

0,25 % xylene cyanol FF

30 % de glicerol en agua.

Cloroformo (J.T. Baker, Argentina)

Cloruro de magnesio (50 mg/ml) (Merck Química, Argentina)

DL-α-tocoferol (Merck, Darmstadt, Alemania)

dNTPs, solución 10 mM (Promega)

7 µl, 100 mM dATP

7 µl, 100 mM dCTP

7 µl, 100 mM dGTP

7 µl, 100 mM dTTP

H₂O dd libre de DNAsa/RNAsa csp 280 µl volumen final.

Etanol 70% V/V

70 ml etanol 100%

30 ml H₂O dd.

Etanol 75% V/V

75 ml etanol 100%

25 ml H₂O dd.

Etanol absoluto (J. T. Baker, USA, grado HPLC)

Fase móvil HPLC: etanol: metanol (60:40 V/V) (J.T. Baker, Argentina, grado HPLC)

γ-tocoferol (Sigma–Aldrich, St. Louis, USA)

Gel de Agarosa 1,8% (Ultrapure™ Invitrogen)

1,8 g agarosa

100 ml TAE 1X

Hidróxido de potasio, solución 10 N (Merck Química, Argentina)

Hidróxido de sodio, solución 8 mM (Merck Química, Argentina)

Isopropanol (J. T. Baker, USA)

Kit DNAsa-1 (Invitrogen Argentina S.A).

Luteína (Sigma–Aldrich, St. Louis, USA)

Marcador de peso molecular (100-2000 pb, Low DNA Mass Ladder, Invitrogen)

Metanol (J.T. Baker, Argentina, grado HPLC)

n-hexano (J. T. Baker, USA, grado HPLC).

Pyrogallol, solución de (1,2,3-trihidroxibenceno) (Sigma–Aldrich St. Louis, USA) 1% P/V en etanol p.a. (Baker, Xalostoc México)

“Random Primers” 2 µg/µl (Alfa DNA)

Reactivo FRAP

Soluciones A, B y C relación 10:1:1 (V/V/V)

Solución A: Buffer Acetato (300 mM, pH 3,6)

3,1 g de acetato de sodio trihidrato (Merck Química, Argentina)

16 ml de ácido acético glacial (Merck Química, Argentina)

Llevar a 1 L con H₂Odd.

Solución B: TPTZ 10 mM (2,4,4-Tri (2-piridil)-s-triazina, Sigma-Aldrich, Argentina) PM: 312,3 g/mol) en HCl (PM: 36,5 g/mol) 40 mM.

Solución C: Cloruro Férrico 20 mM (FeCl₃.6H₂O, PM: 270,3 g/mol, pureza 98% Sigma-Aldrich Argentina) en H₂Odd.

Reactivos gel de agarosa/formaldehído para calidad de ARN

Buffer MOPS (3-(N-morfolino) propan sulfónico). Buffer de corrida 5X

25 ml MOPS 1 M (concentración final: 0,1 M)

3,33 ml NaAc 3 M (concentración final: 40 mM)

2,5 ml EDTA 0,35 M pH 8 (concentración final: 5 mM)

Llevar a 250 ml con H₂O DEPC.

Buffer de Siembra

200 µl formamida 100%

80 µl buffer MOPS 5X

76 µl formaldehído 37%

14 µl azul de bromofenol 0,25%.

Retinol (Sigma–Aldrich, St. Louis, USA)

RNase away (Invitrogen)

RNAsin[®] Ribonuclease Inhibitors 40 U/µl (Promega)

Sulfato ferroso 100 mM (FeSO₄.7H₂O, Sigma-Aldrich, Argentina)

Taq DNA polimerasa 0,5 U/µl (Promega)

TAE 50X (Buffer Tris acético – EDTA)

242 g TRIS Base,

57,1 ml Ácido acético glacial

100 ml EDTA 0,5M (pH 8.0)

H₂Odd csp 1000 ml.

TAE 1X

20 ml TAE 50X
H₂O dd csp 1000 ml

TEP (1,1,3,3-tetraethoxypropane, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Transcriptasa Reversa M-uLV 200 U/μl (Promega)

Trizol® (Reagent Invitrogen™, Cat. # 15596-018)

6. Resultados

6.1. Vitaminas antioxidantes en LD por HPLC

Los tocoferoles y carotenoides de interés se separaron por HPLC, se identificaron por sus respectivos tiempos de retención y máximos de absorción a longitudes de onda características y se cuantificaron en base a las áreas de cada uno, obtenidas de los cromatogramas, comparadas con las áreas de su estándar correspondiente.

6.1.1. Cromatogramas y curvas de calibración de estándares.

Previo a la cuantificación de las moléculas antioxidantes se construyeron las curvas de calibración correspondientes para cada variable respuesta. Para ello se realizaron cinco diluciones a partir de una solución madre (dilución 1/100) de los estándares de α -tocoferol, γ -tocoferol, β -caroteno, retinol y luteína que se inyectaron en el HPLC, procedimiento que se explica en detalle solo para el caso del α -tocoferol en el apartado Materiales y Métodos (Cuantificación de las vitaminas).

Por medio del cromatograma obtenido y del programa Cromquest, se procedió a integrar para obtener los valores de las áreas de los picos correspondientes, de acuerdo a sus respectivos tiempos de retención, los que se emplearon para construir las curvas de calibrado. En las Figuras 12 y 13 se muestran dos ejemplos de cromatogramas de estándares de los antioxidantes. En el cromatograma de la Figura 12, se pueden observar los tiempos de retención (Tr): 4,5 min para la luteína (470 nm); 4,6 min para el retinol (325 nm) y 21,7 min para el α -caroteno y 22,8 min para el β -caroteno (445 nm), y en la Figura 13, los Tr del γ -tocoferol y α -tocoferol (vitamina E), de 7 y 7,5 min, respectivamente, a 330 nm.

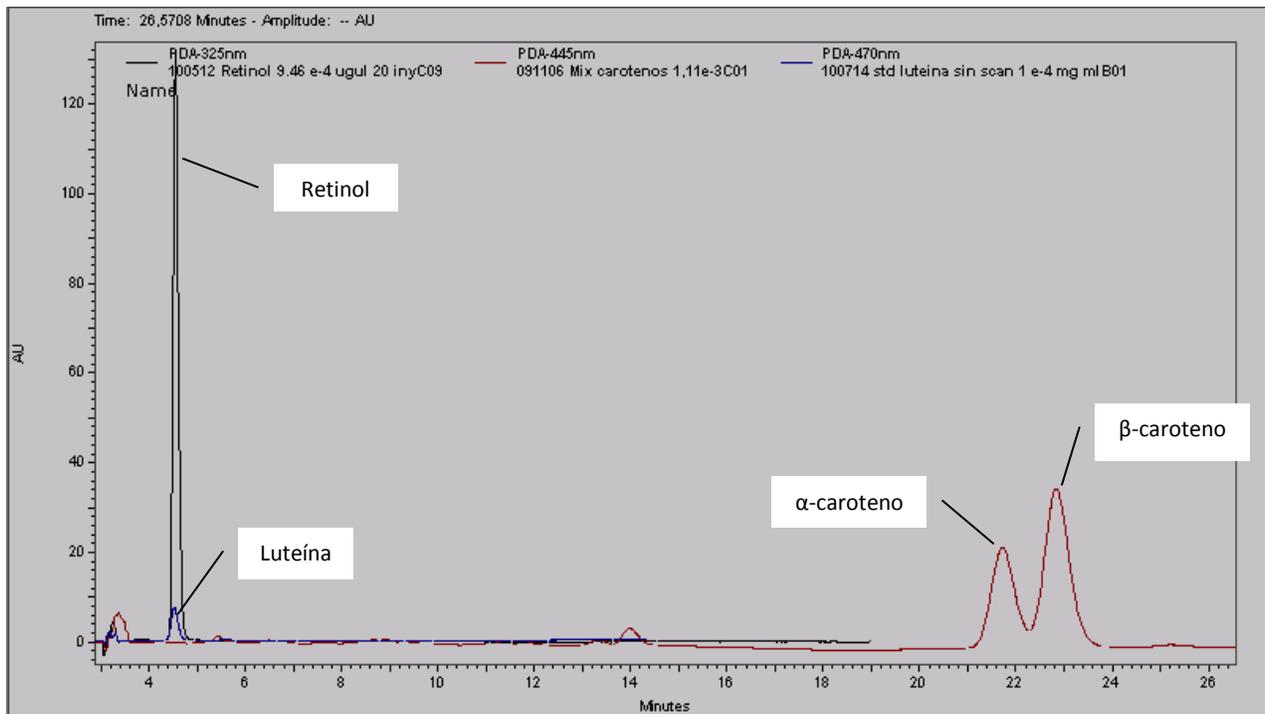


Figura 12. Cromatograma de estándares de retinol, α y β -carotenos y luteína obtenido por HPLC con detector UV-Visible.

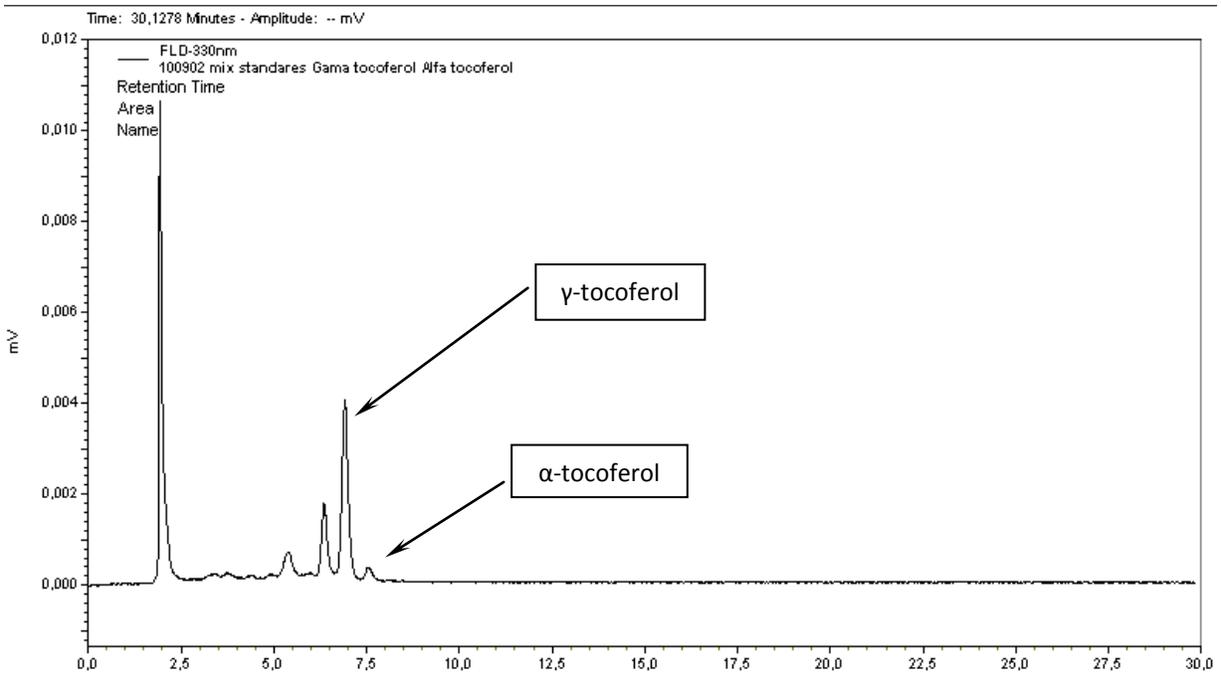


Figura 13. Cromatograma de estándares de α y γ -tocoferol obtenido por HPLC con detector UV/Fluo (330nm).

A modo de ejemplo, se incluyen los cromatogramas de dos muestras (Figuras 14 y 15) obtenidos con detector UV/Fluo a 330nm. Éstos, muestran las áreas correspondientes al α -tocoferol (Tr 7,525 min en ambos casos) y al γ -tocoferol (Trs 6,91 y 6,895 min), el primero, de un animal alimentado con dieta de pasturas y, el segundo, de uno alimentado con dieta de granos. Como puede observarse, el valor del área para el α -tocoferol del animal alimentado con pastos, casi duplica al área del alimentado con granos, lo que luego se manifiesta en un mayor contenido de esta vitamina incorporada en el músculo. Mientras tanto, para el γ -tocoferol, prácticamente no hay diferencia en el contenido según las dietas, como puede observarse en base a los valores de las áreas (pasto:13704 y grano:15074).

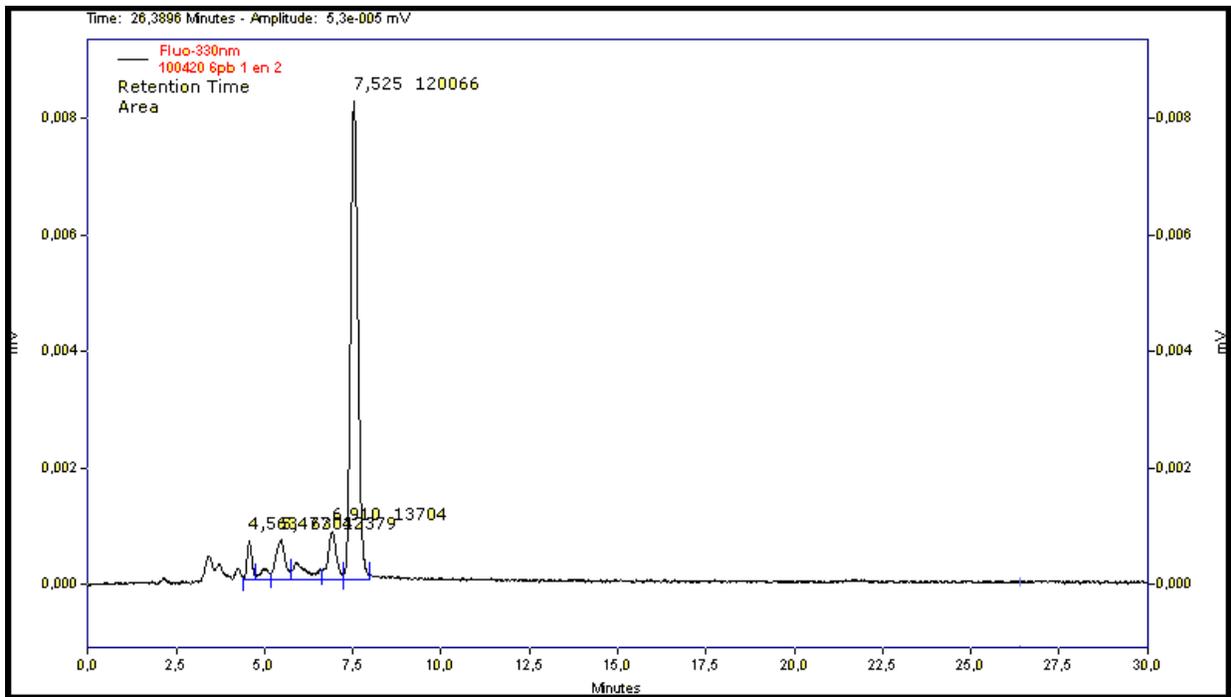


Figura 14. Cromatograma obtenido por HPLC/UV-Fluo (330 nm) para la muestra N°6 con dieta de pasto.

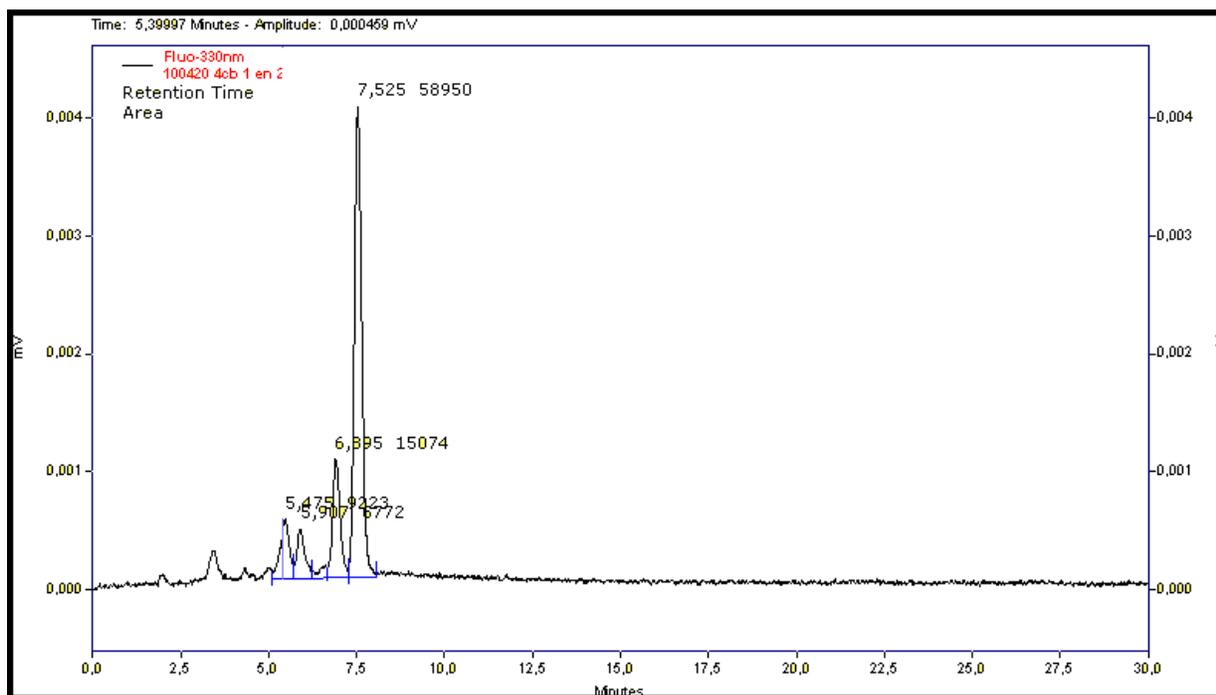


Figura 15. Cromatograma obtenido por HPLC/UV-Fluo (330 nm) para la muestra N°4 con dieta de grano.

Las curvas de calibración relacionando los valores de las áreas obtenidas de los cromatogramas con las concentraciones correspondientes de los estándares, se realizaron con detector UV-Vis/Fluo. Éste posibilita cuantificar todos los antioxidantes propuestos en una sola corrida cromatográfica en 25 minutos. Los valores de los *coeficientes de correlación de Pearson* de las curvas fueron: 0,9992 para el α -tocoferol; 0,9983 para el β -caroteno; 0,9998 para γ -tocoferol y retinol y 0,9991 para la luteína. Los gráficos muestran la adecuada linealidad para la cuantificación de los estándares de vitaminas en los rangos ensayados mediante la aplicación de la metodología HPLC con detección UV-Visible. En las Tablas 5 a 9, y las Figuras 16 a 20, se presentan las curvas de calibración de los antioxidantes analizados.

Tabla 5

*Áreas correspondientes a diferentes concentraciones de α -tocoferol
obtenidas del cromatograma del estándar por HPLC*

α -tocoferol	
Concentración (mg/ml)	Áreas
1,27 E-05	3238
2,54 E-05	6585
5,08 E-05	12402
7,62 E-05	18302
1,27 E-04	31546

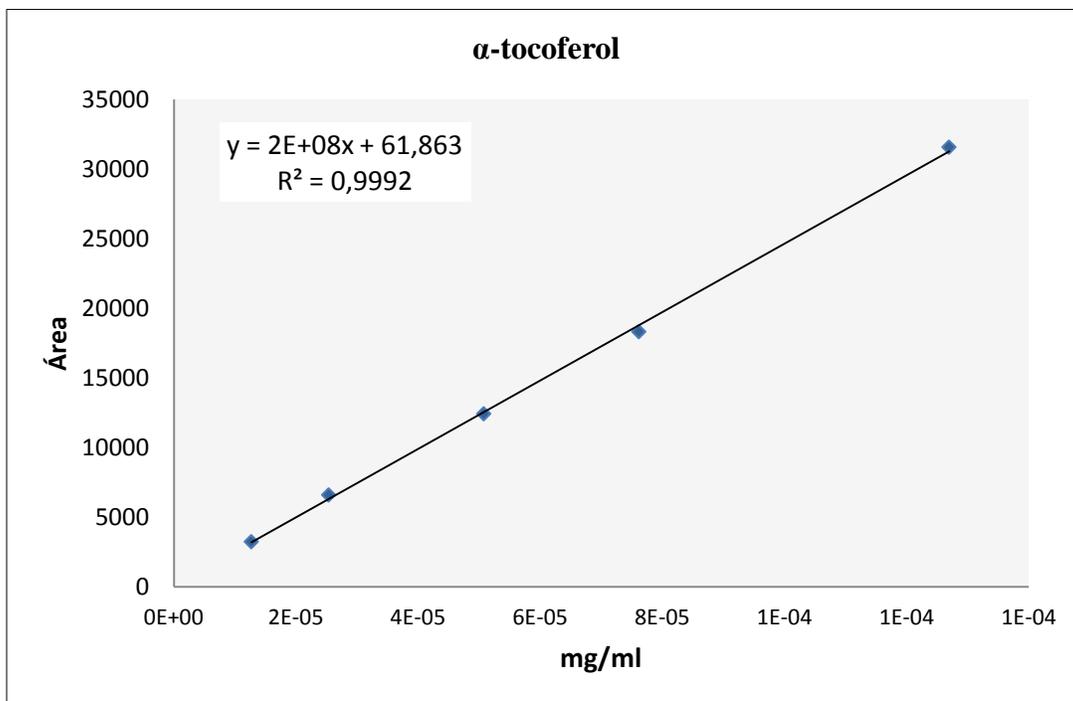


Figura 16. Curva de calibración de α -tocoferol con detector UV/Fluo (330 nm)

Tabla 6

*Áreas correspondientes a diferentes concentraciones de γ -tocoferol
obtenidas del cromatograma del estándar por HPLC*

γ -tocoferol	
Concentración (mg/ml)	Áreas
3,54 E-05	9500
7,08 E-05	18501
1,42 E-04	39440
2,12 E-04	58964
3,54 E-04	100504

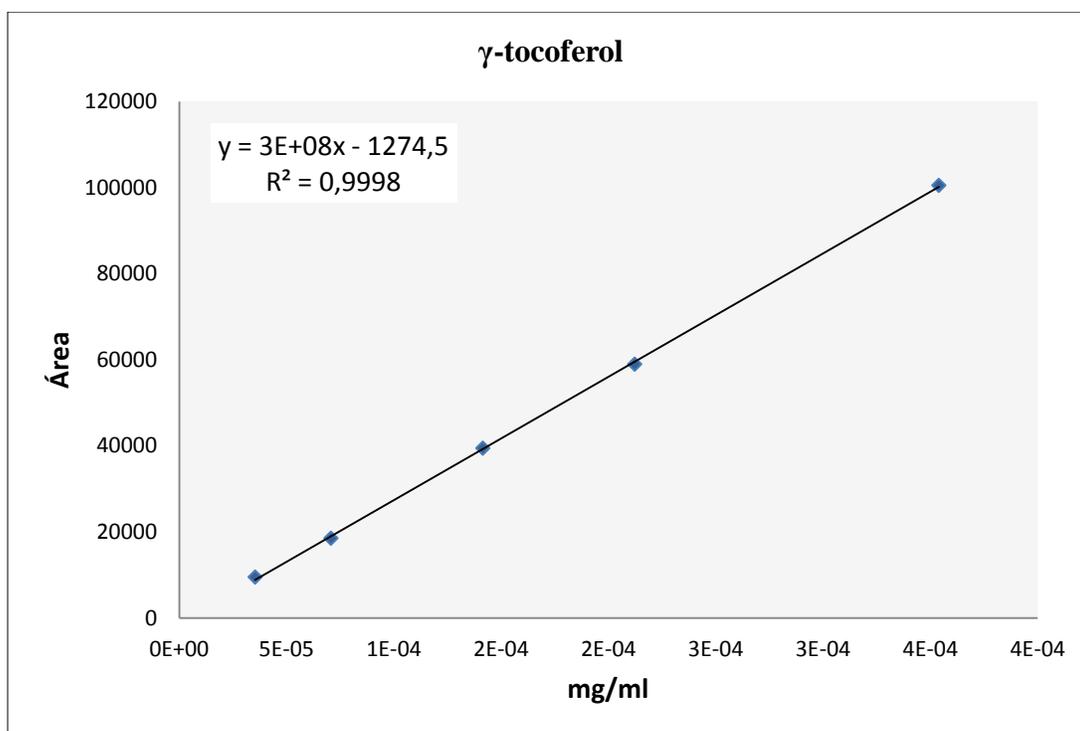


Figura 17. Curva de calibración de γ -tocoferol con detector UV/Fluo (330 nm)

Tabla 7

*Áreas correspondientes a diferentes concentraciones de β -caroteno
obtenidas del cromatograma del estándar por HPLC*

β -caroteno	
Concentración (mg/ml)	Áreas
7,67 E-06	11052
1,53 E-05	25725
3,07 E-05	52003
4,60 E-05	88373
7,67 E-05	146645

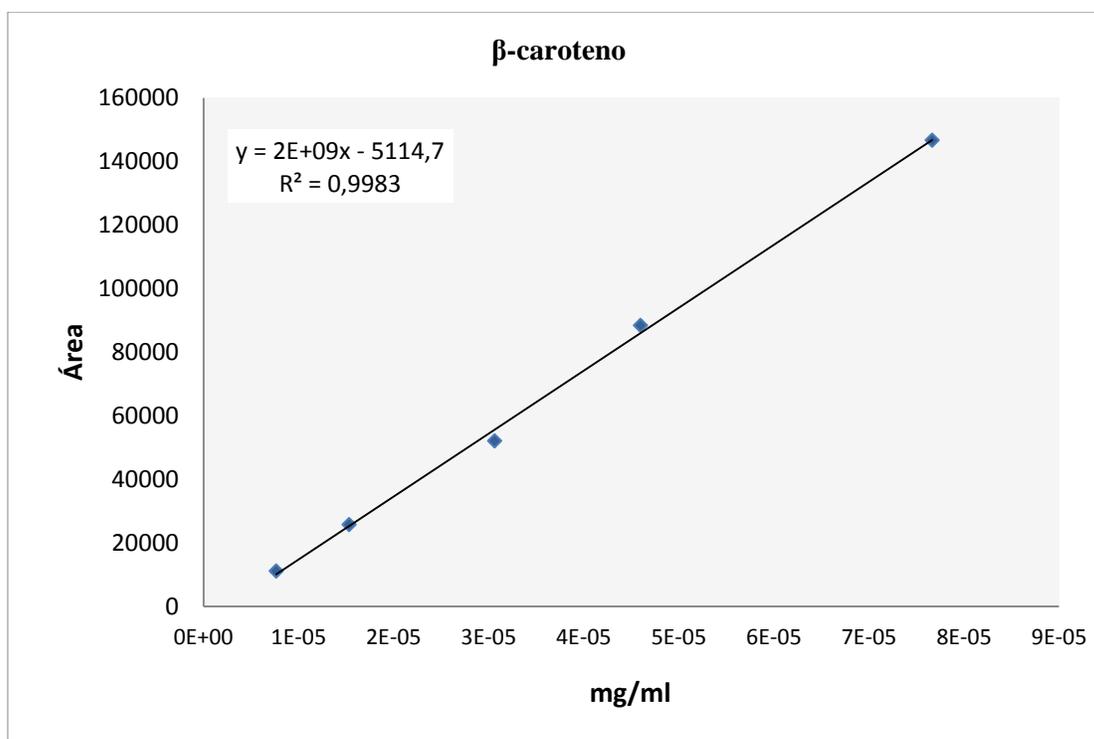


Figura 18. Curva de calibración de β -caroteno con detector UV-Visible/Fluo (445 nm)

Tabla 8

*Áreas correspondientes a diferentes concentraciones de retinol
obtenidas del cromatograma del estándar por HPLC*

Retinol	
Concentración (mg/ml)	Áreas
1,46 E-04	6181
2,93 E-04	18102
5,86 E-04	41865
1,01 E-03	74957
1,46 E-03	112746

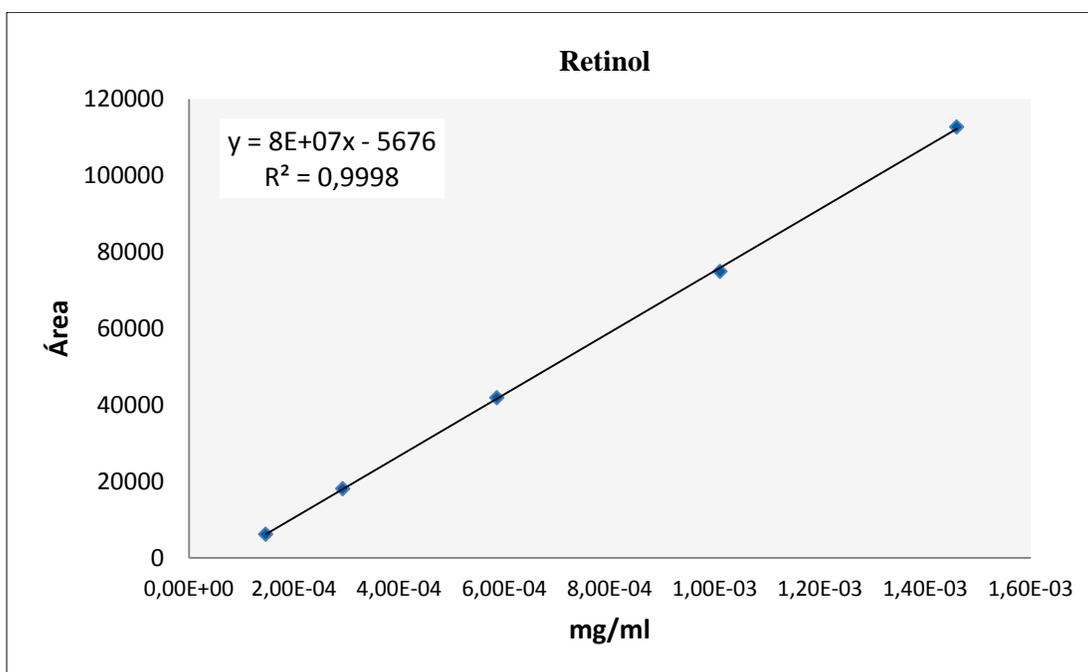


Figura 19. Curva de calibración de retinol con detector UV-Visible/Fluo (325 nm)

Tabla 9

Áreas correspondientes a diferentes concentraciones de luteína obtenidas del cromatograma del estándar por HPLC.

Luteína	
Concentración (mg/ml)	Áreas
1,0 E-05	81920
5,0 E-05	302859
1,0 E-04	640187
1,5 E-04	920404
2,0 E-04	1251070

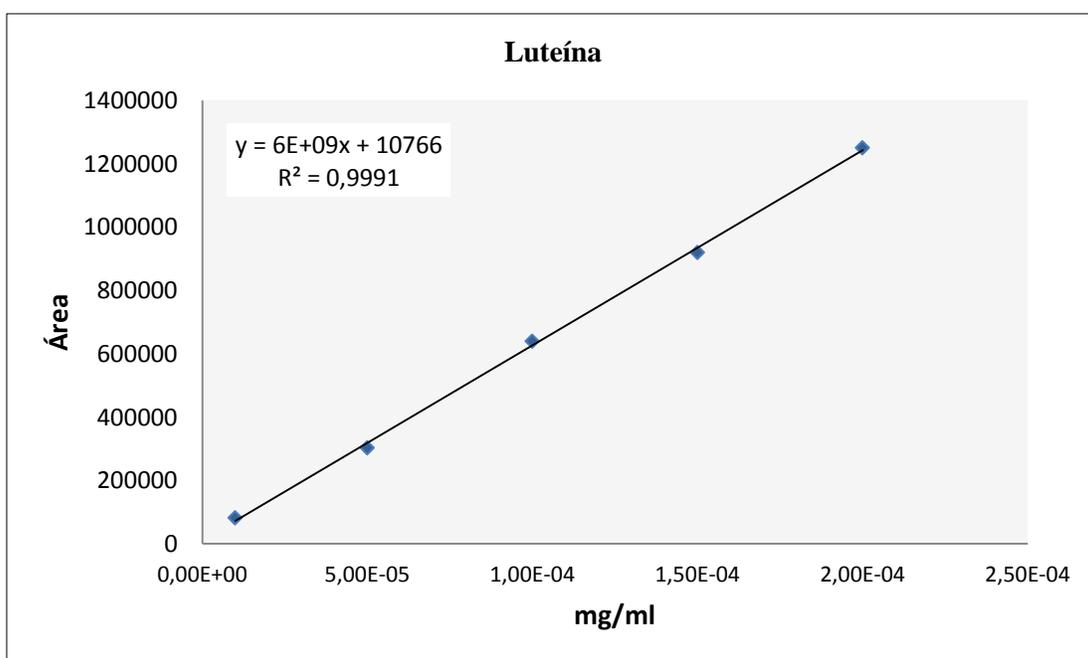


Figura 20. Curva de calibración de luteína con detector UV-Visible/Fluo (470 nm)

Nota: Las curvas de calibración que se incluyen en este apartado deben ser tomadas solo como ejemplo, ya que cada vez que se realizaron estos ensayos, se efectuaron las curvas de calibración correspondientes para ese momento.

6.1.2. Contenido de los antioxidantes.

Los resultados correspondientes a los cinco antioxidantes determinados para cada animal por HPLC con detector UV-Visible/Fluo, expresados en $\mu\text{g/g}$ de carne fresca, se presentan en la Tabla 20 del Anexo y los promedios en la Tabla 10. En todos los casos las muestras se analizaron por duplicado.

Tabla 10

Promedios de los contenidos de antioxidantes determinados para las dos muestras de LD de cada animal según la dieta

Dieta	Muestra	Retinol $\mu\text{g/g}$	γ-tocoferol $\mu\text{g/g}$	α-tocoferol $\mu\text{g/g}$	β-caroteno $\mu\text{g/g}$	Luteína $\mu\text{g/g}$
Pasto	1	0,086	0,095	2,529	0,213	0,065
	3	0,105	0,341	2,510	0,034	0,066
	6	0,103	0,217	2,114	0,124	0,033
	8	0,115	0,201	1,840	0,187	0,050
	9	0,061	0,129	2,767	0,120	0,042
	11	0,068	0,221	2,427	0,204	0,071
Grano	2	0,061	0,096	1,733	0,058	0,023
	4	0,049	0,218	1,064	0,021	0,023
	5	0,065	0,317	1,522	0,103	0,046
	7	0,073	0,209	1,281	0,061	0,060
	10	0,087	0,179	1,984	0,072	0,071
	12	0,092	0,233	2,252	0,072	0,023

De acuerdo a datos de la bibliografía, se esperaba que la carne de animales alimentados con pasturas tuviera niveles más elevados de tocoferoles, carotenos y retinol, y efectivamente esto se verificó en todos los casos, excepto para el γ -tocoferol. En la Tabla 11 y en la Figura 21,

se muestran los promedios de los contenidos de los antioxidantes del total de las muestras para cada tratamiento.

Tabla 11

Concentraciones medias de los antioxidantes determinados en músculo LD según la dieta

Dieta	Retinol μg/g	γ-tocoferol μg/g	α-tocoferol μg/g	β-caroteno μg/g	Luteína μg/g
Pasto	0,090± 0,021	0,201±0,086	2,365±0,332	0,147±0,068	0,055±0,015
Grano	0,071±0,016	0,209±0,072	1,639±0,442	0,065±0,027	0,041±0,021

Se indica: Valor±desviación estándar de la media

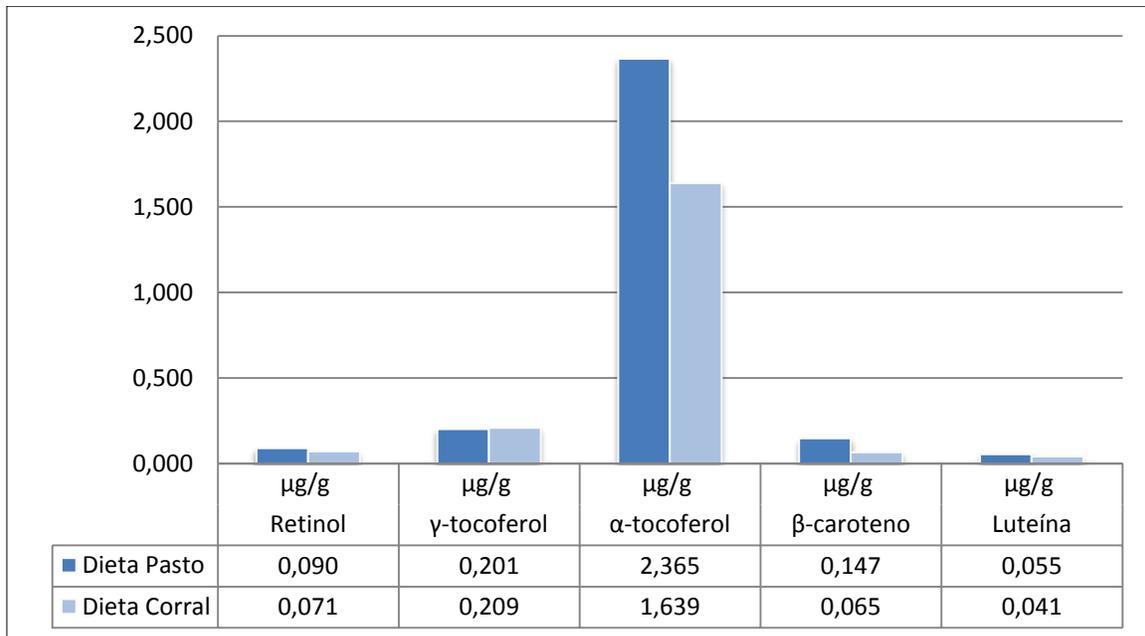


Figura 21. Promedios de los antioxidantes determinados para el total de las muestras de LD según la dieta, pasto o corral².

El α-tocoferol fue la vitamina que más se incorporó en el músculo de los animales para cualquiera de las dos dietas, como se puede observar al graficar los promedios acumulados de los

² Los vocablos grano, corral y concentrado se utilizan de manera indistinta en el texto y en las figuras.

antioxidantes para cada animal (Figura 22), pero la terminación con dieta de pasto, en promedio, aumentó el nivel de esta vitamina 1,4 veces por encima de la dieta de grano.

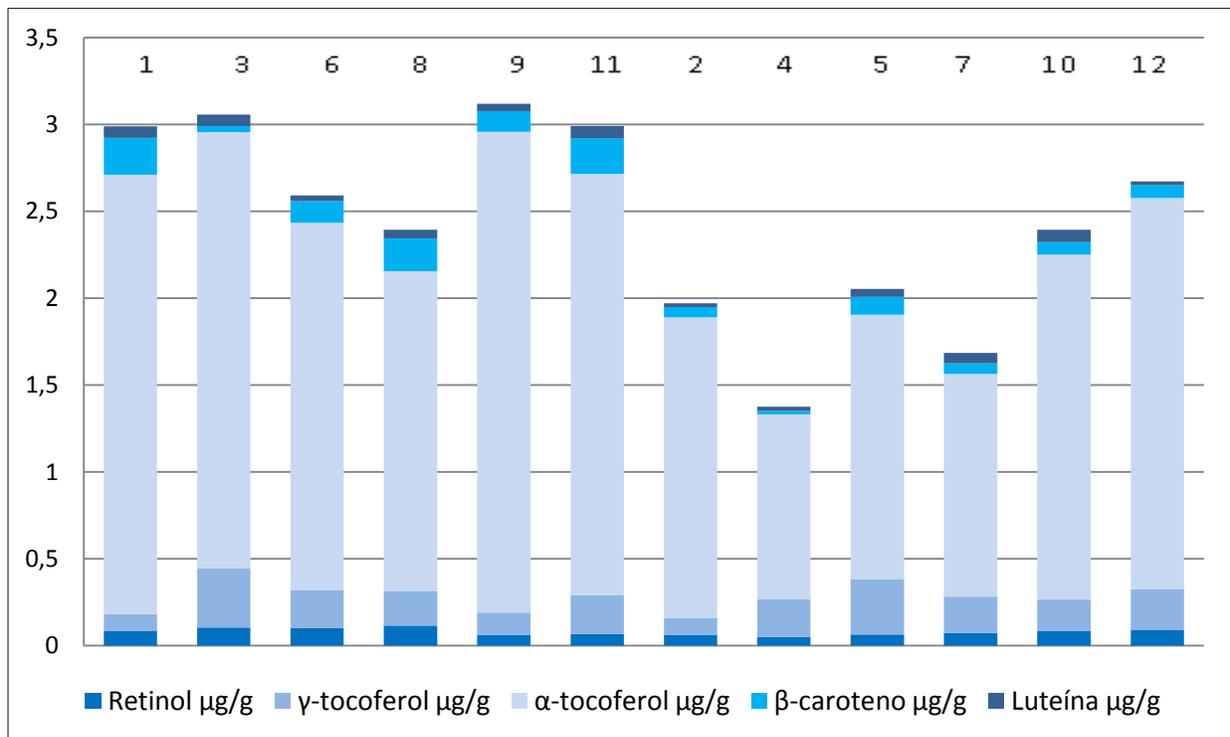


Figura 22. Valores promedio acumulados de los antioxidantes determinados para las dos muestras de LD de cada animal según la dieta. Ref: 1, 3, 6, 8, 9 y 11: alimentación con pasto; 2, 4, 5, 7, 10 y 12: alimentación con grano.

Este resultado concuerda con trabajos previos que han informado incrementos comprendidos entre 1,4 y 2,6 veces, dependiendo del tipo de forraje suministrado, para animales engordados en pasturas de Argentina y Uruguay (Realini et al., 2004; Descalzo et al., 2005; Insani et al., 2008; Descalzo et al., 2008).

Los dos tratamientos, pasto y corral, se compararon en cuanto su efecto sobre estas cinco variables. Para comprobarlo, se realizaron pruebas t verificando en forma previa el supuesto de homogeneidad de las varianzas. La hipótesis que se planteó como alternativa, en cada caso, fue que la media de los resultados para la dieta de pasturas era mayor que para la dieta de grano.

Los niveles de α -tocoferol resultantes para ambos tratamientos, pasto y corral, fueron $2,365\pm 0,332$ y $1,639\pm 0,442$ $\mu\text{g/g}$, respectivamente. Estos datos corroboraron que la alimentación con pasturas induce de manera significativa una mayor incorporación de α -tocoferol ($p=0,009$) en el músculo LD en comparación con la dieta de concentrado. En cambio, las concentraciones de γ -tocoferol determinadas fueron prácticamente las mismas para ambas dietas ($0,201\pm 0,086$ $\mu\text{g/g}$ para la dieta de pasto y $0,209\pm 0,072$ $\mu\text{g/g}$ para la de grano), sin diferencias significativas entre los tratamientos ($p=0,867$). Como puede observarse, los niveles del isómero α fueron alrededor de diez veces más altos que los del isómero γ , resultado acorde con las evidencias de que el α -tocoferol, en mamíferos, es retenido con preferencia por la captación selectiva de la proteína de transferencia de α -tocoferol (α -TTP) en el hígado (Traber, 2007).

Aunque el α -tocoferol fue el antioxidante del músculo cuantitativamente más incorporado en ambos tratamientos dietéticos en este estudio, la incorporación de β -caroteno, también fue significativamente mayor para los animales terminados con dieta de pasto ($p=0,031$) respecto de los terminados con dieta de corral ($0,147\pm 0,068$ $\mu\text{g/g}$ para pasto y $0,065\pm 0,027$ $\mu\text{g/g}$ para corral). Es posible que el nivel de β -caroteno, unas 15 veces menor para la dieta de pasto que los del α -tocoferol, se hayan debido a una menor disponibilidad dietaria del antioxidante, pero en este estudio no se analizaron los contenidos de estos compuestos en el forraje.

Los contenidos de retinol y luteína en el tejido muscular fueron algo mayores para los animales alimentados con pasturas: $0,090\pm 0,021$ versus $0,071\pm 0,016$ $\mu\text{g/g}$ para el retinol y $0,055\pm 0,015$ versus $0,041\pm 0,021$ $\mu\text{g/g}$ para la luteína, pero no se evidenciaron diferencias significativas atribuibles a las diferentes dietas ($p=0,126$ y $p=0,230$, respectivamente).

6.2. Capacidad antioxidante (CAO) determinada por el ensayo FRAP

La determinación de la capacidad antioxidante se efectuó con el método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*). La técnica se fundamenta en una reacción redox y mide el poder reductor total de la muestra debida a compuestos antioxidantes presentes capaces de reducir el ion férrico a ferroso. Estos compuestos pueden ser, entre otros, α -tocoferol, vitamina C, trolox, ácido úrico, bilirrubina, compuestos fenólicos y flavonoides, ácidos grasos poliinsaturados, etc. (Benzie & Strain, 1996; Benzie & Strain, 1999; Pulido, Bravo, y Saura-Calixto, 2000; Saura-Calixto & Goñi, 2006).

La cantidad de hierro reducido se determinó por interpolación de los datos obtenidos en el ensayo en una curva de calibración que se construyó empleando diluciones de un estándar de sulfato ferroso 100 mM (Tabla 12 y Figura 23), según se detalla en el apartado 4.2.2. de Materiales y Métodos.

Tabla 12

Curva de calibración de FRAP

Sulfato de Fe (II)	
Concentración (μ M)	Abs (593 nm)
100	0,0510
200	0,1123
400	0,2257
600	0,3656
800	0,5030
1000	0,6842

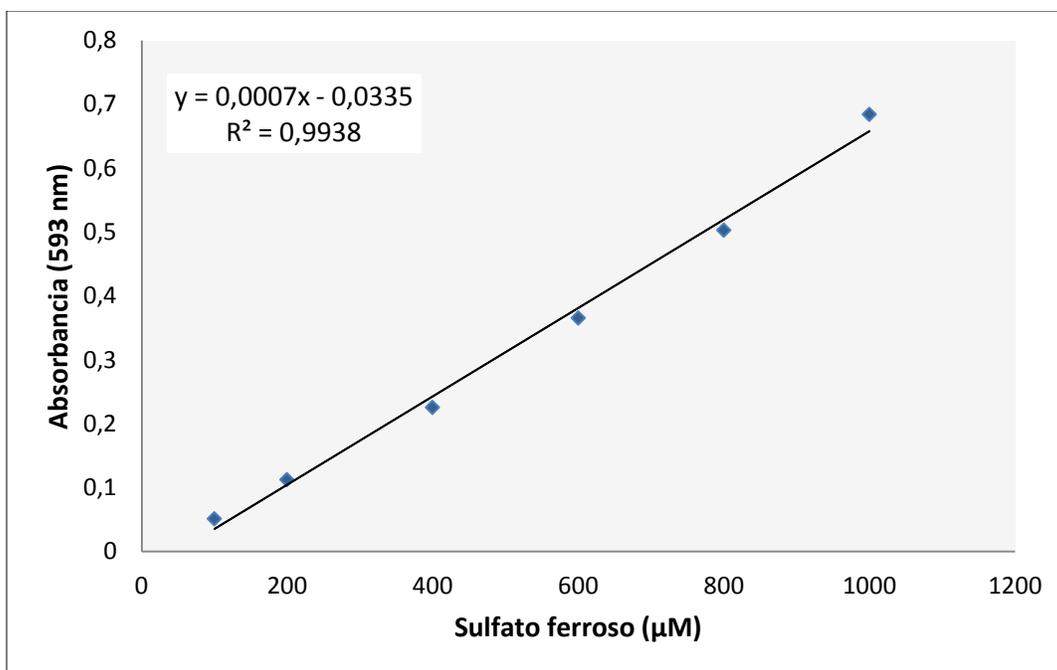


Figura 23. Curva de calibración para la determinación de CAO por el método FRAP.

Los resultados de las muestras de cada animal para la capacidad antioxidante (CAO) determinada utilizando la técnica FRAP en extractos de músculo LD, se muestran en las Tablas 21 y 22 del Anexo, y los promedios, en la Tabla 13. Esta técnica se ensayó en homogenatos musculares extraídos con solvente acuoso y con solvente para lípidos, para ambas dietas.

Tabla 13

Promedios de dos muestras de cada animal para la capacidad antioxidante determinada por la reacción FRAP en extractos acuosos y lipídicos de LD

FRAP			
Dieta	Muestra	Fracción lipídica Equivalentes de Fe (II) (mM/g de músculo)	Fracción acuosa Equivalentes de Fe (II) (mM/g de músculo)
Pasto	1	8,63	13,49
	3	9,70	15,50
	6	6,06	13,95
	8	7,77	11,42
	9	7,53	14,19
	11	8,35	10,97
Grano	2	11,76	16,50
	4	11,80	12,99
	5	8,03	14,10
	7	13,01	13,03
	10	7,55	13,88
	12	7,68	10,84

Los resultados de las medidas de CAO para las dos dietas prácticamente no modificaron la capacidad antioxidante del músculo LD en novillos Angus para un tiempo de reacción de 4 minutos. Los resultados muestran que la mayor capacidad reductora de las muestras de carne estuvo asociada a la fracción acuosa, para ambos tipos de alimentación (Figura 24). Esto supone que la capacidad principal de reducir los iones férricos proviene de antioxidantes hidrófilos (por ej. vitamina C, ácido úrico, péptidos pequeños, flavonoides, etc) presentes en la muestra y que no fueron estudiados en este trabajo. Era de esperar que los valores de CAO en la fracción lipídica de las muestras procedentes de la dieta de pasturas, resultaran más altos que los de la misma fracción proveniente de muestras con dieta de corral debido a la mayor incorporación

evidenciada de antioxidantes liposolubles, en particular de α -tocoferol, pero esto no fue así. Las relaciones entre los valores de FRAP con los antioxidantes incorporados de manera significativa en el tejido muscular (α -tocoferol y β -caroteno), para el mismo conjunto de muestras, fueron evaluadas mediante cálculo de los coeficientes de correlación, no habiéndose encontrado una relación directa entre las variables.

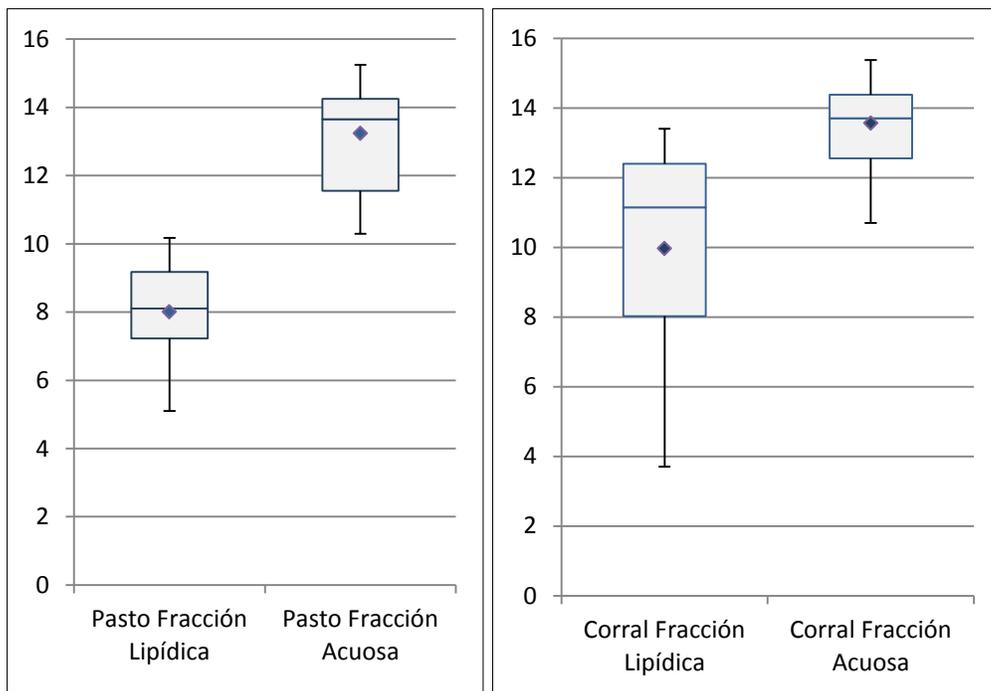


Figura 24. Distribución de la capacidad antioxidante determinada por FRAP en extractos acuosos y lipídicos de muestras de LD según la dieta, expresada en equivalentes de Fe (II) (mM/g de músculo). La línea central indica la mediana.

Los valores promedio de CAO se compararon entre fracciones iguales para los dos tratamientos, no habiéndose evidenciado diferencias significativas entre las fracciones liposolubles ($p=0,123$) y las fracciones hidrosolubles ($p=0,075$). En la Tabla 14 se muestran los valores significativamente mayores de las fracciones hidrosolubles con respecto a las liposolubles para cada tratamiento.

Tabla 14

Capacidad Antioxidante (CAO) promedio determinada por FRAP en homogenatos de carne hidrosolubles y liposolubles

Dieta	CAO	Equivalentes de Fe (II) (mM/g de músculo)
Pasto	Hidrosoluble	13,25 ^a
	Liposoluble	8,09 ^b
Grano	Hidrosoluble	13,56 ^a
	Liposoluble	9,97 ^b

^{a,b} Letras diferentes en la columna indican diferencias significativas (Pasto: $p < 0,001$; Grano: $p = 0,017$)

6.3. Grado de oxidación determinado por TBARS

El grado de oxidación lipídica se determinó por el ensayo del ácido 2-tiobarbitúrico (2-TBA) que mide la cantidad de malondialdehído (MDA) que se produce como resultado de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) (Cortinas et al., 2005; Shahidi & Zhong, 2005; Auqui Silvera, 2014). A mayor cantidad de MDA formado mayor es el grado de oxidación. Se debe tener en cuenta que no todos los productos de la peroxidación generan MDA, y éste, no es un compuesto que se produce exclusivamente a través de la peroxidación de lípidos (Grotto, et al. 2009).

En este trabajo se determinó el grado de oxidación inicial de las muestras sin inducción (TBARS basal) y, de forma inmediata y luego de 30 minutos, de haber inducido el proceso de oxidación. Se utilizó la técnica convencional de precipitación ácida del homogenato de carne y reacción con 2-TBA que desarrolla un compuesto de condensación de color rosa a 530 nm. La curva de calibración se realizó utilizando TEP (1,1,3,3-tetraetoxipropano) como estándar (Figura 25), como se menciona en el ítem 4.2.3.1. (Reacción TBA) de Materiales y Métodos.

Tabla 15

Curva de calibración de TBARS

TEP	
Concentración (M)	Abs (530 nm)
2,0 E-09	0,0455
5,0 E-09	0,0900
1,0 E-08	0,1662
1,5 E-08	0,2615
2,0 E-08	0,3434

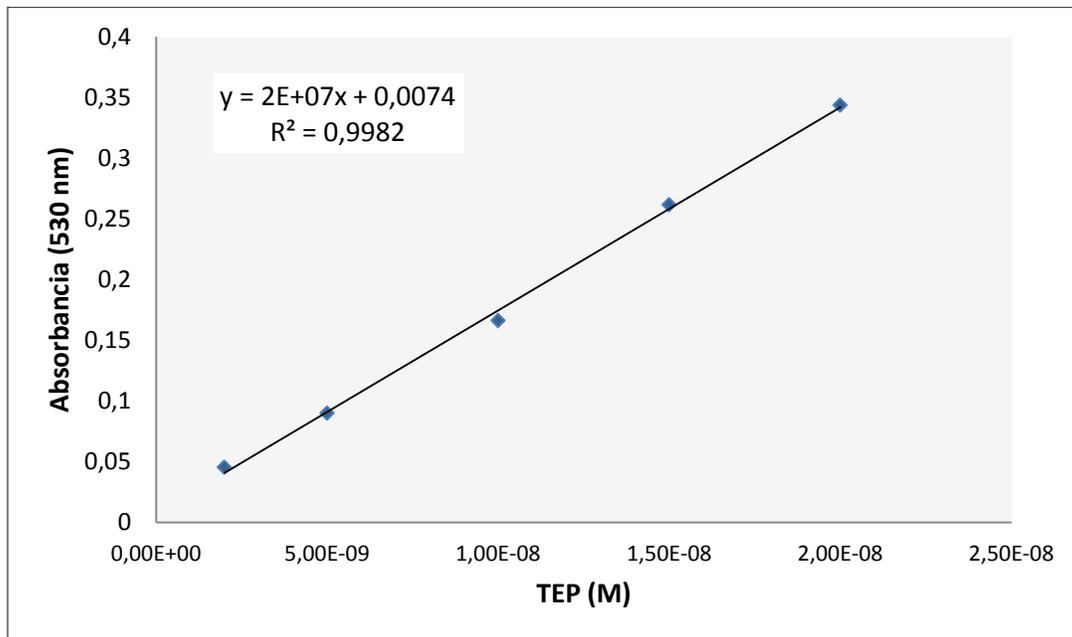


Figura 25. Curva de calibración para la determinación de grado de oxidación por el ensayo de TBARS utilizando TEP como estándar.

Los resultados promedios de dos muestras de cada animal para este ensayo, basal y con inducción con ácido ascórbico, se detallan en la Tabla 16.

Tabla 16

Promedios de dos muestras de cada animal para el grado de oxidación determinado por el ensayo TBARS

		TBARS		
Dieta	Muestra	Basal (mgMDA/Kg)	Inducido 0 min (mgMDA/Kg)	Inducido 30 min (mgMDA/Kg)
Pasto	1	0,093	0,105	0,241
	3	0,154	0,085	0,093
	6	0,253	0,256	0,507
	8	0,123	0,147	0,208
	9	0,114	0,099	0,114
	11	0,143	0,155	0,186
Grano	2	0,093	0,105	0,421
	4	0,358	0,448	0,903
	5	0,143	0,126	0,494
	7	0,273	0,302	0,775
	10	0,122	0,144	0,276
	12	0,214	0,221	0,278

En la Figura 26 se comparan los promedios de los tres ensayos de TBARS para el total de las muestras de cada dieta. Los datos obtenidos indican que el grado de oxidación inicial en las muestras de carne resultó mayor (cerca de 1,4 veces) para los animales alimentados con dieta de corral, relación que se mantuvo prácticamente constante, a tiempo cero, luego de inducir la oxidación en el homogenato. Para ambos casos, TBARS basal e inducido (0 min), los niveles de oxidación de lípidos no fueron significativamente diferentes entre la carne de los animales alimentados a pasto y la de los alimentados con grano ($p=0,282$ y $p=0,192$, respectivamente). Estos resultados no reflejan, en primera instancia, la mayor incorporación de α -tocoferol en la carne de animales con dieta de pasturas, pero luego de inducir una reacción de Fenton con sulfato ferroso y ácido ascórbico durante 30 min, previo a la derivatización con TBA, el grado de

oxidación de los lípidos resultó aproximadamente 2,5 veces menor en el grupo con dieta de pasto en comparación con el de grano.

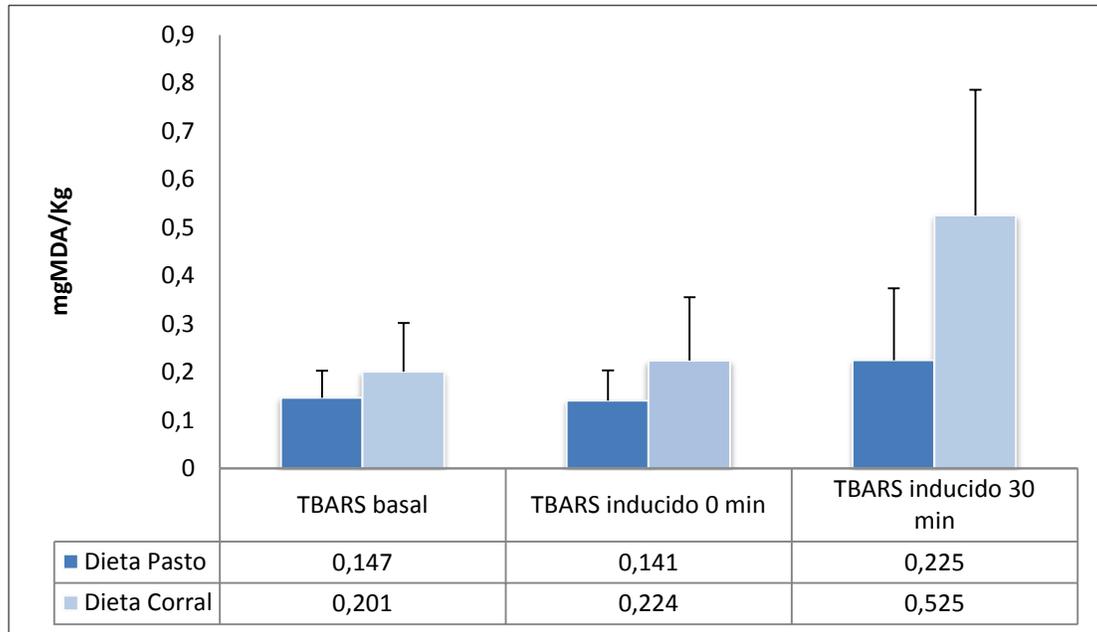


Figura 26. Promedios y desviaciones estándar del grado de oxidación determinado por TBARS, sin y con inducción, para el total de las muestras de LD según la dieta.

Los homogenatos con mayor capacidad antioxidante (CAO), se encuentran menos protegidos frente a la oxidación, lo que puede manifestarse en un aumento del valor de TBARS al inducir este proceso. En este caso, se exacerbó la diferencia para TBARS inducido por 30 min, apareciendo diferencias significativas ($p=0,035$) entre los tratamientos.

Estos resultados no pueden explicarse en base a las diferencias en la capacidad antioxidante, ya que en este trabajo, los valores correspondientes a las muestras de animales con dieta de granos no fueron significativamente diferentes de los de pasto, pero este último grupo evidenció niveles mayores de vitamina E y β -caroteno de forma significativa, lo que podría explicar, en parte, los datos obtenidos.

Al examinar las relaciones entre el contenido de los antioxidantes evaluados y los niveles de TBARS, no se encontró correlación entre estos, excepto, para el contenido de α -tocoferol y los valores de TBARS inducido durante 30 min. El antioxidante correlacionó inversamente con TBARS y, las muestras de animales con dieta de pasturas y las con dieta de granos, se diferenciaron al considerar ambas variables, lo que permite distinguir las muestras de uno y otro grupo (punto de corte 0,24 mg de malondialdehído (MDA)/Kg de carne) (Tabla 17 y Figura 27).

Tabla 17

Correlación de Pearson y prueba de significación para el contenido de α -tocoferol y TBARS con inducción por 30 minutos

		α-tocoferol	TBARS (induc. 30 min)
α- tocoferol	Correlación de Pearson	1	-,887(**)
	Sig. (bilateral)		,000
	N	12	12
TBARS (induc. 30 min)	Correlación de Pearson	-,887(**)	1
	Sig. (bilateral)	,000	
	N	12	12

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

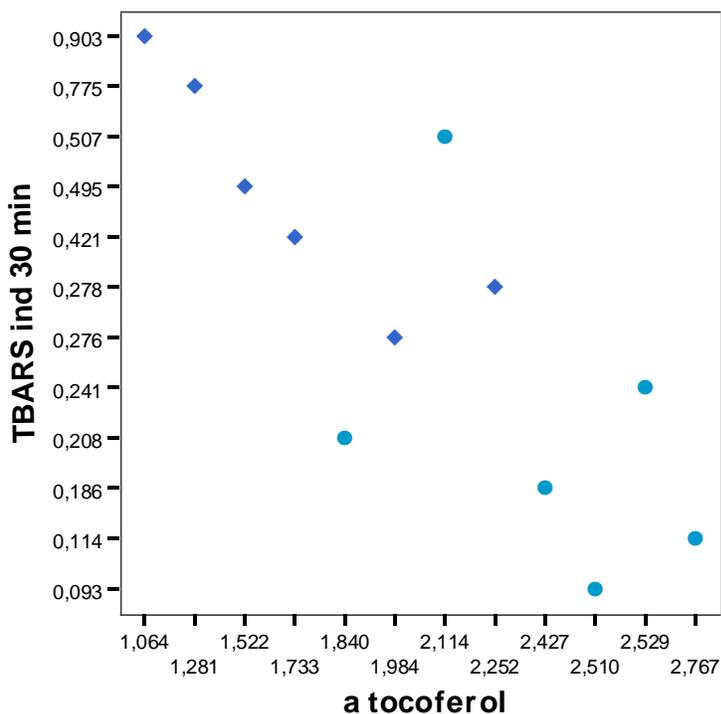


Figura 27. Diagrama de dispersión representando la relación entre el contenido de α -tocoferol y TBARS con inducción por 30 minutos.

Ref : ● muestras con dieta de pasto; ◆ muestras con dieta de granos.

A pesar de lo antedicho, la distribución del α -tocoferol y los valores de TBARS mostraron una alta variabilidad entre animales y con otros estudios. En la literatura disponible los valores de TBARS asociados con concentraciones de vitamina E en carne fresca son diversos así como el efecto de las dietas sobre la oxidación de los lípidos.

6.4. Expresión de genes relacionados con la incorporación de vitaminas antioxidantes en el tejido muscular

Los ensayos de expresión génica se llevaron a cabo en las mismas muestras de músculo bovino LD que se analizaron para sus propiedades bioquímicas.

Los genes candidatos fueron seleccionados en base a las funciones que desempeñan en el transporte y captación de las moléculas antioxidantes analizadas. Las vitaminas E y A y carotenoides se incorporan en el tejido muscular de los mamíferos a través de la dieta, especialmente la de pasturas, mejorando la actividad antioxidante del tejido ya que presentan capacidad para contrarrestar el efecto pro-oxidante de los radicales libres.

La absorción de estas vitaminas, junto con otros componentes hidrófobos de la dieta, se produce en el intestino delgado de los rumiantes donde se incorporan a los quilomicrones que los transportan al hígado. Las vías involucradas en la captación celular están estrechamente relacionadas con el metabolismo de las lipoproteínas (Mardones & Rigotti, 2004).

La proteína de transferencia de α -tocoferol (α -TTP), en las células hepáticas, se une de manera selectiva al α -tocoferol que se incorpora a las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y luego es resecretado al torrente sanguíneo (Mardones & Rigotti, 2004). La unión selectiva de α -TTP al α -tocoferol es la causa de que este isómero sea la forma más abundante de la vitamina E en los tejidos de mamíferos. Independientemente de su acción antioxidante, el α -tocoferol, claramente ha mostrado una influencia reguladora sobre la expresión génica in vivo; afecta la expresión de algunos genes a nivel de la transcripción, entre los que se encuentra α -TTP (Morley, Cross, Cecchini, Nava, Atkinson, & Manor, 2006; Azzi et al., 2016).

La proteína citosólica de unión a α -tocoferol (α -TAP), que pertenece a la misma familia de proteínas de unión a ligandos hidrofóbicos como α -TTP, se une a la vitamina E impidiendo su oxidación. α -TAP actúa como una proteína chaperona, enmascarando el residuo hidroxilo antioxidante de la vitamina E (Azzi et al., 2016).

La vitamina A (retinol, todo *trans*) se almacena en el organismo animal en forma de retinilésteres. El mayor lugar de reserva de esta vitamina es en las células estrelladas del hígado,

donde se asocia con la proteína celular de unión al retinol (CRBP1) la cual funciona como un aceptor intracelular directo para el retinol. La vitamina se secreta desde el hígado hacia la circulación unida a RBP (proteína de unión a retinol) que a su vez se asocia con la proteína transtirretina (TTR) para formar un complejo retinol-RBP-TTR, y se distribuye en los tejidos (Noy, 2015).

La proteína antioxidante 2 (AOXP2) es una clase única de enzima que protege a las células del daño oxidativo mediante la reducción de fosfolípidos y otros hidroperóxidos celulares. La sobreexpresión de AOXP2 en las células confiere protección frente al daño de la membrana (Chowdhury et al., 2009).

La incorporación de antioxidantes liposolubles en el músculo puede ser regulada por proteínas específicas que intervienen en la captación de estas moléculas en las células. Asimismo, se postula como posible, que el cambio del tipo de dieta de los animales pueda modular la expresión de estas proteínas.

6.4.1. Puesta a punto del método.

En una primera etapa, se llevó a cabo la puesta a punto de las condiciones del método utilizado para evaluar la expresión de los genes propuestos (AOXP2: proteína antioxidante 2; α -TAP: proteína asociada a α -tocoferol; α -TTP: proteína de transferencia de α -tocoferol y CRBP1: proteína celular de unión al retinol).

Una vez extraído el ARN total de las muestras, se determinó su concentración y pureza por espectrofotometría y se evaluó su integridad mediante gel de agarosa/formamida.

La concentración y pureza del ARN extraído fueron correctas, obteniéndose valores de la relación A_{260}/A_{280} comprendidos entre 1,8 y 2,0, como indica la bibliografía (Green & Sambrook; 2012).

Con respecto a la integridad del ARN aislado se observó, en algunos casos, que las muestras sufrieron degradación total o parcial, como se muestra en la Figura 28, por lo cual se debió repetir el proceso de extracción para lograr resultados satisfactorios.

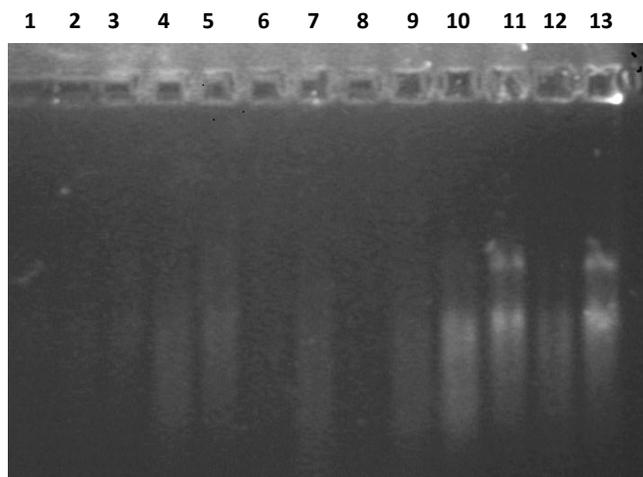


Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa/formamida para control de calidad del ARN total extraído (ARN 28S y 18S). Ref: 1,3,6,8,9,11: muestras con dieta de pasto; 2,4,5,7, 10,12: muestras con dieta de grano; 13: control positivo.

Las RT-PCR se efectuaron para los cuatro conjuntos de cebadores seleccionados. Con el propósito de controlar la expresión endógena de cada una de las muestras, se incluyeron cebadores que amplifican genes constitutivos. En un principio se emplearon β -actina y ARN 18S, detectados ambos por PCR, pero como la visualización en un gel de agarosa fue mejor para el 18S, se optó por utilizar este.

Las amplificaciones de los ADNc resultantes, se realizaron para 28, 30 y 35 ciclos con el fin de determinar el ciclo de ampliación en etapa exponencial que posibilitara la visualización y evaluación de la expresión diferencial de los productos de amplificación de cada gen ensayado. Para el análisis de los datos correspondientes a cada par de cebadores, se seleccionó el número de ciclado y dilución de la muestra, dependiendo de la cantidad de ARN obtenido en cada caso.

Para los genes AOX2 y CRBP1, el ciclado en etapa exponencial para la evaluación de la expresión diferencial fue de 28 ciclos. Para los genes α -TAP y α -TTP fue de 30 y 35 ciclos, respectivamente.

En general, con 35 ciclos, los productos en varias de las muestras resultaron similares y excesivos, excepto para la proteína α -TTP, donde se debió utilizar la reacción de 35 ciclos con la muestra sin diluir, debido a que las PCR de 28 y 30 ciclos no evidenciaron ninguna señal en un gel de agarosa. Mientras tanto, para la proteína AOX2 se lograron distinguir diferencias empleando 28 ciclos con la muestra diluida al medio, para ambos tratamientos.

En la Figura 29 se muestra la imagen de un gel de agarosa correspondiente a la corrida electroforética de las proteínas AOX2 y α -TTP para una PCR de 28 ciclos.

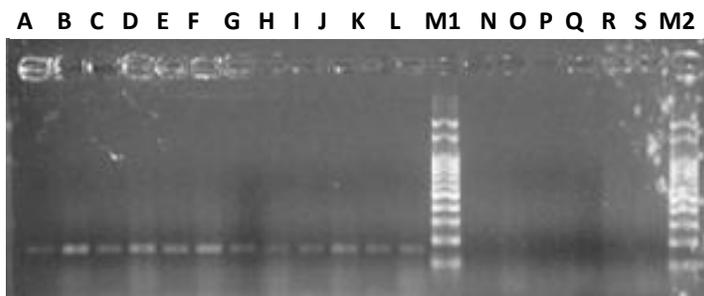


Figura 29. Electroforesis en gel de agarosa 1,8% de los productos de RT-PCR para AOX2 (proteína antioxidante 2) y α -TTP (proteína de transferencia de α -tocoferol). Ref: Letras A-F: muestras de carne 1 a 6 para AOX2 dilución 1/10; Letras G-L: muestras de carne 1 a 6 para AOX dilución 1/2; Letras N-S: muestras de carne 1 a 6 para α -TTP sin diluir; M1 y M2: marcador de PM.

6.4.2. Evaluación de las muestras.

Los productos de RT-PCR para los genes candidatos examinados por electroforesis en gel de agarosa se muestran en la Figura 30.

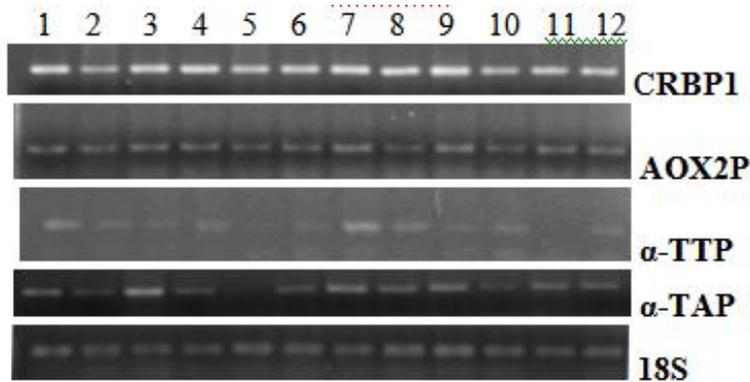


Figura 30. Electroforesis en gel de agarosa 1,8% de los productos de RT-PCR para CRBP1 (proteína celular de unión al retinol), AOX2P (proteína antioxidante 2), α -TTP (proteína de transferencia de α -tocoferol), α -TAP (proteína asociada a α -tocoferol) y 18S (subunidad ribosomal 18 S, gen de expresión constitutiva). Ref: Números 1, 3, 6, 8, 9 y 11: carne con dieta de pasto. Números 2, 4, 5, 7, 10 y 12: carne con dieta de granos.

Los resultados de los productos amplificados para cada par de cebadores (CRBP1, AOX2P, α -TAP y α -TTP) y para el ARN 18S, en muestras de LD para las dos dietas, se visualizaron mediante gel de agarosa, y la expresión semicuantitativa de cada ARNm, se determinó con el programa ImageJ®. Estos resultados se muestran en la Tabla 23 del Anexo.

Los datos presentados en la Tabla 18, son relaciones entre valor de cada imagen obtenida con el programa ImageJ® con respecto al valor de la imagen del gen constitutivo 18 S de cada muestra. En la tabla 19 se muestran los promedios de estas relaciones para cada dieta.

Tabla 18

Expresión semicuantitativa de ARNm de genes candidatos asociados a la captación de vitaminas en muestras de LD

Dieta	Muestra	CRBP1/18S	α-TTP/18S	AOXP2/18S	α-TAP/18S
Pasto	1	1,2885	0,4894	0,9398	0,7031
	3	1,5927	0,4567	1,3987	1,1465
	6	1,2044	0,3994	1,1981	0,5405
	8	1,0176	0,7632	0,8504	0,6290
	9	0,8957	0,2384	1,0015	0,6316
	11	0,9914	0,0000	1,2090	0,9550
Grano	2	0,8122	0,6111	1,2959	0,9223
	4	1,6136	1,0504	1,6659	1,0514
	5	0,6512	0,6370	0,7009	0,6161
	7	1,8330	1,9889	1,8067	1,6129
	10	0,7476	1,1875	0,9266	1,5702
	12	0,9339	0,5082	1,1991	1,5767

Como se puede observar en la Tabla 19 y en la Figura 30, la expresión semicuantitativa promedio del ARNm de la proteína de unión a retinol (CRBP1) fue similar para ambos tratamientos, apenas mayor para la dieta de pasturas. Este resultado estaría en concordancia con los niveles de retinol encontrados en las muestras de tejido muscular, algo mayores para los animales alimentados con pasturas ($0,090 \pm 0,021 \mu\text{g/g}$) con respecto a los alimentados con grano ($0,071 \pm 0,016 \mu\text{g/g}$), pero sin diferencias significativas.

Tabla 19

Expresión semicuantitativa promedio de ARNm de genes candidatos asociados a la captación de vitaminas en muestras de LD en relación a la dieta

Relación	CRBP1/18S	α-TTP/18S	AOX/18S	α-TAP/18S
Dieta Pasto	1,1650	0,3912	1,0996	0,7676
Dieta Grano	1,0986	0,9972	1,2658	1,2249
Valor p	0,779	0,036	0,406	0,049

La expresión promedio del ARNm para la proteína antioxidante 2 (AOXP2) no resultó estadísticamente afectada por las dietas. Se ha observado que AOXP2 es altamente inducible por el estrés oxidativo, por lo tanto, sería dable esperar que a mayor grado de oxidación determinado por TBARS, se demostrara una expresión aumentada de la proteína. Ya se vio que las muestras procedentes de animales con dieta de pasturas presentaron valores de TBARS basal algo, pero no significativamente, inferiores a los animales con dieta de grano y que esa diferencia se hacía significativa al inducir la reacción de peroxidación. De acuerdo a esto, concuerda la expresión promedio numéricamente superior, aunque no significativa, del ARNm de AOXP2 para la dieta de grano. Por otra parte, la expresión de AOXP2 no mostró correlación con las medidas de capacidad antioxidante (CAO), que a su vez, no resultó prácticamente modificada en relación a las dietas.

Con respecto a las proteínas relacionadas con el transporte y captación del α -tocoferol, (α -TAP y α -TTP) fueron significativamente moduladas por la dieta. Los resultados obtenidos muestran que la expresión de los ARNm de estas proteínas resultó inferior en las muestras con dieta de pasto en comparación con las de grano.

Al examinar las relaciones entre la expresión de los ARNm de α -TTP y α -TAP con los niveles de α -tocoferol, los de TBARS inducido durante 30 minutos y la capacidad antioxidante (CAO) medida por FRAP, no se halló correlación entre éstos y α -TAP, mientras que para α -TTP se encontró correlación con el antioxidante y el estado de oxidación, pero no con CAO. La correlación entre α -tocoferol y α -TTP fue negativa ($r = -0,721$, $p < 0,01$) y entre TBARS y α -TTP fue positiva ($r = 0,655$, $p < 0,05$), lo que sugiere que el antioxidante influenció la expresión de α -TTP a nivel músculo.

7. Discusión

La alimentación tiene un efecto regulador sobre los procesos biológicos en el músculo que se refleja directamente en la calidad de la carne (Andersen et al., 2005). Los sistemas pastoriles producen carnes con características diferentes a los intensivos. Varios estudios indican que la alimentación con pasturas y suplementos ricos en antioxidantes, son los medios más importantes para mejorar la actividad antioxidante en los tejidos musculares (Arnold et al., 1993; Liu et al., 1995; Lynch et al., 1999).

Los polifenoles, las vitaminas E y C y los carotenoides, son componentes naturales de los pastos frescos y pueden servir para preservar de la oxidación a los lípidos y proteínas de los tejidos (Mercier et al., 2004; Yang et al., 2002b; Descalzo et al., 2005; Insani et al., 2008) lo que influye, luego, sobre aspectos organolépticos y la vida útil de la carne (Morrissey, Buckley, Sheehy, & Monahan, 1994; Yang et al., 2002a; Realini et al., 2004; Descalzo et al., 2005). En consecuencia, las pasturas frescas pueden conferir a la carne mayor capacidad antioxidante y generar un producto más estable frente al deterioro oxidativo.

El conocimiento de los mecanismos mediante los cuales estas vitaminas son incorporadas en los tejidos y de la modulación de éstos por efecto de factores nutricionales, genéticos y ambientales, dará la posibilidad de proponer estrategias para enriquecer los alimentos de origen animal en dichos compuestos y así lograr productos con características distintivas. La expresión de genes asociados con el transporte de dichas vitaminas en los tejidos animales, y el estudio de los factores que la regulan, constituyen un punto de partida para la investigación de posibles marcadores de calidad de vitaminas antioxidantes en carne.

En este trabajo, las muestras de músculo *Longissimus dorsi* proveniente de bovinos terminados en un sistema extensivo de pasturas presentaron niveles más altos de vitamina E (α -

tocoferol) y de β -caroteno que las muestras de los animales terminados con una dieta de granos, en concordancia con los resultados de otros estudios. Se ha demostrado ampliamente que los animales terminados con dieta de pasturas incorporan cantidades mayores de vitamina E en el músculo (Yang et al., 2002b; Realini et al., 2004; Descalzo et al., 2005; Nuernberg et al., 2005; Insani et al., 2008; De La Fuente et al., 2009) lo que puede deberse a la mayor concentración de este antioxidante hallada en los pastos. Se ha determinado que el contenido de vitamina E era de 5 a 10 veces mayor en los forrajes verdes que en los cereales (Gatellier et al., 2004). Elevadas concentraciones de α -tocoferol en el músculo, que actúa *post mortem*, aumenta la estabilidad oxidativa de la carne vacuna (Faustman, Cassens, Schaefer, Buege, Williams, & Scheller, 1989; Liu et al., 1995; Daley, 2010).

Esto es de suma importancia, ya que numerosos trabajos han demostrado que las dietas de pasto en comparación con las de concentrado, modifican el perfil de los ácidos grasos y, en general, aumentan de forma significativa el porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) que se incorporan en la grasa intramuscular, lo que implica un mayor riesgo de oxidación de los lípidos y de generación de sabores y olores desagradables en la carne durante su almacenamiento (Yang et al., 2002a; Realini et al., 2004; Descalzo et al., 2005; Gatellier et al., 2005; Nuernberg, et al., 2005; García, Pensel, Sancho, Latimori, Kloster, Amigone, & Casal, 2008; Wood, Enser, Fisher, Nute, Sheard, Richardson, ... & Whittington, 2008; De La Fuente et al., 2009). La vitamina E reduce la oxidación de los lípidos mejorando características de la carne que hacen a su calidad, como el color, el sabor, la textura y el valor nutricional, así como el aumento de la vida en el estante (Morrissey et al., 1994). Para que la vitamina pueda proteger a la carne fresca de la oxidación de los lípidos y las proteínas, es necesario un depósito mínimo en los tejidos (Descalzo et al., 2005). Faustman et al. (1989) postularon que el nivel crítico que evita el

deterioro del color de la carne de vacuno fresca es 3 μg de α -tocoferol por g de tejido. En el mismo sentido, para lograr una carne bovina con mayor estabilidad del color y de los lípidos en el tiempo, Arnold et al. (1993), propusieron como concentraciones umbrales 3,3 $\mu\text{g/g}$ para el músculo *Longissimus lumborum* y 3,8 $\mu\text{g/g}$ para el *Gluteus medius*. Mahecha et al. (2009) mencionan alrededor de 3,5 $\mu\text{g/g}$ de peso fresco en músculo *Longissimus* como suficiente para estabilizar significativamente los lípidos cuando la carne se almacena en condiciones comercialmente relevantes.

El valor promedio encontrado de vitamina E en este trabajo, 2,36 $\mu\text{g/g}$ (Tabla N°11) para la carne de pasturas, resultó menor que los informados en la mayoría de los estudios previos: 4,5 $\mu\text{g/g}$, Yang et al. (2002b); 3,91 $\mu\text{g/g}$, Realini et al. (2004); 4,6 $\mu\text{g/g}$, Descalzo et al. (2005); 3,08 $\mu\text{g/g}$, Descalzo et al. (2008); 4,07 $\mu\text{g/g}$, De La Fuente (2009), pero fue similar al hallado (2,06 $\mu\text{g/g}$) por Insani et al. (2008). La carne procedente de animales con dieta de grano presentó un promedio de α -tocoferol 1,4 veces menor que la de pasto (1,63 $\mu\text{g/g}$), (Figura N°21), prácticamente coincidente con los resultados de Yang et al. (2002b) y Descalzo et al. (2008), en tanto que Insani et al. (2008) y De La Fuente et al. (2009) encontraron valores menores (0,79 y 0,75 $\mu\text{g/g}$, respectivamente). A su vez, Realini et al. (2004) y Descalzo et al. (2007), informaron valores más altos (2,92 y 2,2 $\mu\text{g/g}$).

La variabilidad de estos resultados pueden obedecer a variaciones en el tipo y calidad de forraje suministrado, el uso de suplementos, la composición del concentrado, el tiempo de aplicación del tratamiento, así como también el tejido muscular y las razas de los animales estudiados, condiciones que no fueron idénticas entre experimentos y con las de este estudio.

De acuerdo a la necesidad de un nivel mínimo de α -tocoferol para proteger la carne de la oxidación lipídica, las muestras de carne de pasturas analizadas en el presente trabajo no

alcanzaron el umbral de vitamina E recomendado como para estar protegidas del deterioro oxidativo durante el almacenamiento.

En general, el ganado que se alimenta en pasturas de buena calidad puede alcanzar una alta concentración de α -tocoferol muscular (Yang et al., 2002a; Mercier et al., 2004; Descalzo & Sancho, 2008;), por lo tanto, concentraciones bajas de este antioxidante podrían atribuirse a una inferior calidad de la pradera consumida por el ganado durante el período de terminación (150 días en este estudio).

Con respecto al γ -tocoferol, no se observó un efecto de la dieta en los niveles del antioxidante, cuya asimilación en el músculo resultó ser diez veces menor (0,20 $\mu\text{g/g}$), (Tabla N°11), que para el isómero alfa, para ambos tratamientos. Este resultado concuerda con las evidencias de que el α -tocoferol, en mamíferos, es retenido con preferencia por la captación selectiva en el hígado de la proteína de transferencia de α -tocoferol (α -TTP) que lo incorpora a las lipoproteínas de la sangre desde donde se distribuye a los tejidos (Qian, Morley, Wilson, Nava, Atkinson, & Manor, 2005). Esta es la causa de que este isómero sea la forma más abundante de la vitamina E en el músculo, a pesar de que la cantidad relativa del γ -tocoferol en la dieta pueda ser mayor (Traber, 2007). Además, los isómeros no alfa de la vitamina E, se metabolizan activamente. Se ha observado que se secretan por orina más metabolitos de γ -tocoferol que de α -tocoferol, lo que sugiere que la necesidad del primero para el organismo es menor (Traber, Elsner & Brigelius-Flohe, 1998).

Pocas investigaciones han informado sobre la variación del γ -tocoferol en el tejido muscular de bovinos en relación a diferentes dietas. Mahecha et al. (2009) determinaron este antioxidante en músculo *Longissimus* de toros Simmental con distintas dietas de concentrado. El grupo control recibió una dieta semejante a la de grano de este trabajo, pero el valor promedio de

γ -tocoferol para la carne fresca fue mucho menor (0,035 $\mu\text{g/g}$). Pouzo et al. (2016) informaron los contenidos de este antioxidante en el músculo *Longissimus thoracis* de novillos Angus alimentados con cuatro dietas de terminación, con concentraciones crecientes de γ -tocoferol: pasturas sin suplementar, pasturas suplementadas con grano de maíz partido y con dos porcentajes diferentes de semillas de lino, y en todos los casos, con el agregado de 0,5 Kg/día de salvado de trigo. Estos autores hallaron que los promedios de las concentraciones de γ -tocoferol para 0 y 5 días de exposición aeróbica de la carne fueron 0,12 $\mu\text{g/g}$ para la dieta de pasturas y 0,13 $\mu\text{g/g}$ para la dieta suplementada con granos de maíz. Estos valores son inferiores a los encontrados en este trabajo (Tabla N°11), pero de forma análoga, sin diferencias significativas entre tratamientos.

El principal carotenoide absorbido en el intestino del ganado bovino es el β -caroteno (Pouzo, et al., 2016). En el presente estudio, la cantidad incorporada en el músculo resultó 16 veces menor que la de α -tocoferol para la dieta de pasturas (Figura N°21), aunque como era de esperar, el forraje consumido por los animales proporcionó suficiente antioxidante como para permitir su incorporación significativamente mayor en el tejido muscular. Las muestras de pasturas tenían más de dos veces de β -caroteno que las muestras de concentrado (0,147 $\mu\text{g/g}$ y 0,065 $\mu\text{g/g}$, respectivamente), (Figura N°21), relación menor que las indicadas en otras investigaciones. Las concentraciones promedio de β -caroteno en carne fresca de novillos terminados en pasturas y con grano informadas por Descalzo et al. (2005), fueron 0,45 $\mu\text{g/g}$ y 0,06 $\mu\text{g/g}$, respectivamente, demostrando un incremento siete veces mayor para la alimentación a pasto, presumiblemente debido al contenido más elevado de β -caroteno en las pasturas frescas en comparación con el cereal (Daley, 2010). Insani et al. (2008) hallaron valores aun mayores (0,74 $\mu\text{g/g}$ para pasto y 0,17 $\mu\text{g/g}$ para grano), mientras que Yang et al. (2002b), encontraron niveles

menores (0,16 $\mu\text{g/g}$ y 0,01 $\mu\text{g/g}$, respectivamente) y los que más se asemejan a los de este trabajo. Walshe, Sheehan, Delahunty, Morrissey, & Kerry (2006) informaron concentraciones de 0,152 $\mu\text{g/g}$ y 0,116 $\mu\text{g/g}$ de β -caroteno en músculos LD de novillos criados con dieta orgánica y convencional, respectivamente. En la misma investigación citada anteriormente de Pouzo et al. (2016), independientemente de la dieta o del período de maduración de la carne, el promedio general de β -caroteno fue 0,18 $\mu\text{g/g}$.

En general, cuando el ganado vacuno es criado en sistemas de pasturas, los niveles musculares de β -caroteno muestran una alta variabilidad entre experimentos (Yang et al., 2002b; Descalzo et al., 2007; Insani et al., 2008). La especie de vegetal, la naturaleza estacional del crecimiento, la madurez fisiológica, los cambios estacionales, los métodos de cosecha y de manipulación como el secado, tienen impactos significativos en el contenido de carotenoides del forraje (Daley, 2010; Pouzo et al., 2016). En el proceso de elaboración de ensilados alrededor del 80% del contenido de carotenoides se destruye (Daley, 2010). Aparte de esta conocida variación, es difícil medir la ingesta diaria del ganado engordado en pasturas (Yang et al., 2002b). Por consiguiente, los menores niveles de β -caroteno incorporados en el músculo con respecto a los informados en otros estudios, pueden haberse debido a una menor oferta dietética de este compuesto, aunque en este trabajo no se evaluó el contenido en carotenoides (β -caroteno y luteína) de las dietas. Además, Descalzo & Sancho (2008) basándose en la disparidad de los promedios de los coeficientes de variación para los niveles de β -caroteno hallados en distintas investigaciones (entre 11 y 64%), postulan que la incorporación de este antioxidante en el tejido muscular no depende sólo del suministro dietario y el tipo de músculo, sino también, de la capacidad de absorción individual. En este sentido, se ha determinado que en el rumen de los bovinos una cantidad apreciable de β -caroteno se degrada por acción de deshidrogenasas

bacterianas con porcentajes variables de desaparición, así como también, la tasa de conversión de β -caroteno a retinol en el intestino varía ampliamente entre individuos, aunque la coingesta de grasa en la dieta mejora notablemente la absorción intestinal de los carotenoides ya que proporciona los componentes lipídicos para el ensamblado de los quilomicrones (Torre y Caja, 1998; Harrison, 2012).

El retinol (vitamina A) y la luteína fueron los antioxidantes menos incorporados en el tejido muscular y, como era de esperar de acuerdo a los niveles encontrados, sin diferencias significativas entre las dietas. De la misma manera que para el γ -tocoferol, parece que la información disponible sobre el contenido de retinol y luteína en carne de vacuno es escasa como para compararla con los resultados promedio de este estudio que fueron: 0,090 $\mu\text{g/g}$ de retinol para la dieta de pasto y 0,071 $\mu\text{g/g}$ para la de grano, y 0,055 versus 0,041 $\mu\text{g/g}$, respectivamente, de luteína. Pouzo et al (2016) encontraron valores promedio para el retinol que estaban en el mismo orden que los hallados en el presente trabajo, 0,07 $\mu\text{g/g}$ de retinol en animales alimentados en pasturas sin suplementar y 0,09 $\mu\text{g/g}$ para pasturas suplementadas con granos de maíz. Walshe et al. (2006) tampoco observaron diferencias significativas en los contenidos de retinol en muestras de *L. dorsi* de animales alimentados con una dieta orgánica, cuya composición no declaran, y otra convencional. Los promedios que obtuvieron fueron 0,112 $\mu\text{g/g}$ y 0,115 $\mu\text{g/g}$ de tejido, respectivamente. Mahecha et al. (2009), en la investigación citada anteriormente, informaron un promedio más bajo, 0,027 $\mu\text{g/g}$ para la dieta control, similar a la de grano de este trabajo.

En cuanto a la luteína, se ha estudiado sobre todo su relación con el rendimiento en la producción y la calidad de la leche. Se ha establecido que la concentración de los carotenoides de la leche, incluida la luteína, depende de la composición de la dieta y puede ser asociada a

recursos forrajeros más frescos, mientras que el alimento secado o ensilado es bajo en carotenoides (Xu et al., 2014). De forma análoga se podría haber especulado un rol de la luteína como indicador tisular de la dieta suministrada a los animales, como ocurre con el nivel de este antioxidante en la leche que aumenta linealmente al incrementarse su contenido en el alimento (Xu et al., 2014), pero para ello tendría que haberse hallado una concentración significativamente mayor en el músculo para la dieta de pasturas. Pouzo et al (2016) informaron valores promedio de luteína en músculo *L. thoracis* (0,029 µg/g para una dieta de pasturas y 0,026 µg/g para una dieta suplementada con granos de maíz) menores que los hallados en este trabajo, pero asimismo, no significativamente diferentes.

Si bien los carotenoides, sus retinoides derivados y formas menores de la vitamina E incorporadas en el músculo se encuentran en, al menos, un orden por debajo de los niveles de α -tocoferol *in vivo*, deben ser tenidos en cuenta porque ejercen actividades biológicas que previenen el daño tisular. En particular, el γ -tocoferol tiene la capacidad de proteger contra los radicales libres a base de nitrógeno, mientras que el α -tocoferol no la posee, y el β -caroteno coopera con los tocoferoles en la eliminación de radicales de lípidos en el interior de las membranas (Descalzo & Sancho, 2008).

De acuerdo a lo expuesto se puede decir que, en general, las dietas tuvieron efecto sobre el contenido de antioxidantes en el músculo LD. Con el fin de determinar si estos resultados se relacionaban con la capacidad antioxidante (CAO) de la carne fresca, se realizó el ensayo FRAP en fracciones acuosas y lipídicas de extractos musculares. Los resultados obtenidos mostraron que las dietas prácticamente no modificaron la CAO para un tiempo de reacción de 4 minutos (Tabla N°14).

De igual modo que en este estudio, Mahecha et al. (2010) informaron que el estado antioxidante del músculo de toros Simmental medido por FRAP y TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity*), ambos basados en una reacción redox similar (Huang et al., 2005), no se vio afectada significativamente por las dietas. Los ensayos se realizaron a distintos tiempos (5, 30 y 60 minutos), no obstante, fallaron en mostrar un efecto de la dieta con el aumento del tiempo de reacción. La dieta control consistía en ensilado de maíz con concentrado enriquecido en ácidos grasos n-6, y la otra, en ensilado de pasto suplementado con concentrado enriquecido en ácidos grasos n-3.

Solo Descalzo et al. (2007) han informado un efecto significativo de la dieta sobre el potencial de reducción muscular del hierro férrico, medido también por FRAP a los 4 minutos de reacción, que resultó ser mayor para la carne fresca producida en pasturas. Los autores no diferenciaron antioxidantes liposolubles de hidrosolubles, y de la descripción de la técnica empleada, se desprende que concuerda con el FRAP acuoso del presente estudio.

Mahecha et al. (2011), evaluaron el efecto de la dieta sobre la capacidad antioxidante de extractos hidrofílicos y lipofílicos provenientes de músculo *Longissimus* de bovinos. Los antioxidantes fueron evaluados en carne fresca y almacenada utilizando FRAP y TEAC a diferentes tiempos de reacción. Los resultados mostraron que no hubo un efecto significativo de la dieta en la capacidad antioxidante, sin embargo, se observó un aumento de la CAO con el tiempo de reacción para ambos extractos y ensayos. Estos autores manifiestan la necesidad de medir FRAP y TEAC en un tiempo al menos de 30 minutos, debido a que las medidas a los 5 minutos resultaron ser solo un 50% de los valores finales obtenidos a los 60 minutos, mientras que a los 30 minutos estuvieron entre el 72 y el 83%.

En el presente trabajo se realizó FRAP con 4 minutos de reacción, tiempo normalmente utilizado para este ensayo, pero según Huang et al. (2005) y Mahecha et al. (2011), insuficiente para que se complete la reacción que es función de los antioxidantes individuales presentes en la muestra, y puedan ponerse en evidencia las diferencias entre los tratamientos. Por lo tanto, es probable que el tiempo de medida haya contribuido al hecho de no haber hallado diferencias significativas en la capacidad antioxidante entre las dietas.

Es importante tener en cuenta que los ensayos de capacidad antioxidante en músculo dan una idea general de la contribución cuantitativa de todas las sustancias antioxidantes para la defensa antioxidante (Mahecha et al., 2011). Desde esa perspectiva, y considerando los valores de los antioxidantes individuales medidos en este estudio, se esperaba un efecto de la dieta sobre la actividad antioxidante debido a que el α -tocoferol y el β -caroteno mostraron efectos significativos de la alimentación, aunque el retinol, el γ -tocoferol y la luteína, no lo hayan evidenciado. Así que, los valores de FRAP se correlacionaron con los de α -tocoferol y los de β -caroteno para el mismo conjunto de muestras, pero no se observó correlación entre estos antioxidantes y la CAO.

Por el contrario, Descalzo et al. (2007) encontraron una correlación positiva entre FRAP y el nivel de α -tocoferol en muestras de músculo *Psoas major* obtenidas de pasturas naturales, las que también presentaron mayores contenidos de α -tocoferol y β -caroteno, igual que en este estudio, y además ácido ascórbico, que las procedentes de dieta de grano. En otro trabajo, Pouzo et al. (2016), informaron que la actividad antioxidante determinada por FRAP en extractos acuosos de carne de vacuno se vio afectada por la dieta de forma independiente de la maduración de la carne o períodos de exposición aeróbicos, y la menor capacidad antioxidante, fue coincidente con los niveles más bajos de α -tocoferol en el músculo.

En la presente investigación, en cambio, se observaron diferencias significativas en la capacidad antioxidante entre los extractos hidrosolubles y liposolubles de cada dieta (Tabla N°14), resultando más altos los valores de los primeros, de forma similar a los resultados obtenidos por Mahecha et al. (2010) y Mahecha et al. (2011). Esto estaría indicando que el potencial redox muscular es el origen de esta mayor capacidad antioxidante y que antioxidantes hidrófilos, como polifenoles, ubiquinoles, ácido ascórbico, tioles celulares y enzimas endógenas, están presentes en cantidades más altas que los antioxidantes lipófilos, como los tocoferoles y carotenoides. El glutatión constituye el principal tampón redox en los tejidos animales (Pensel et al., 2002), y en la investigación mencionada anteriormente de Descalzo et al. (2007), se demostró que la actividad antioxidante de las muestras de *Psoas major* era preferentemente ocasionada por un mayor potencial de reducción debido al glutatión, en vez de por la capacidad de eliminación de radicales de los homogenatos de tejido. Pero estos autores, también demostraron que el glutatión es incapaz de reducir iones férrico usando el método FRAP, en consecuencia, en este caso no puede ser considerado como contribuyente de los resultados del ensayo. Esto muestra que no todos los antioxidantes coinciden en la capacidad de reducir un compuesto determinado, y que no debe utilizarse una sola técnica de medición para evaluar el estado antioxidante/oxidativo general del músculo (Descalzo et al., 2007). Además, estos mismos autores, informaron sobre la contribución del ácido ascórbico endógeno a la capacidad antioxidante, vitamina no cuantificada en este trabajo y que podría estar influyendo en los resultados obtenidos.

La capacidad de reducción de una muestra es un parámetro importante pero solo refleja un aspecto de la capacidad antioxidante total que abarca la capacidad quelante de metales, la capacidad de eliminación de ROS y de inhibición de enzimas oxidativas. Ninguno de los ensayos

disponibles mide la biodisponibilidad, la estabilidad *in vivo*, la retención de antioxidantes por los tejidos, ni la reactividad *in situ* (Huang et al., 2005). No obstante, Pouzo et al. (2016) consideran que la capacidad antioxidante medida mediante FRAP, probablemente sea complementaria a la acción de los antioxidantes solubles en lípidos, basándose en la correlación positiva que Descalzo et al. (2007) hallaron entre esta técnica y el nivel de α -tocoferol. De este modo, los autores, tomaron las medidas de FRAP como un indicador de la capacidad antioxidante total de los homogenatos de carne. En este trabajo, al no haberse encontrado correlación entre los contenidos de α -tocoferol y FRAP, esta última medida no puede ser considerada como tal. La discusión de los efectos de la dieta sobre la capacidad antioxidante total sólo es valiosa en conjugación con antioxidantes individuales y otros parámetros en el músculo de la carne (Mahecha et al, 2011).

Con respecto al estado de oxidación basal de los músculos LD determinado por el ensayo de TBARS, la carne procedente de la dieta de pasturas mostró promedios menores en el grado de oxidación de los lípidos que la de los animales alimentados con dieta de grano (0,14 versus 0,20 mgMDA/Kg), (Figura N°26). Se observó un resultado similar cuando el proceso de oxidación se indujo con ácido ascórbico y Fe (II) en el punto de partida (tiempo 0). En ambos casos las diferencias halladas no fueron significativas.

La característica del hierro como potencial prooxidante de los lípidos se utilizó para evaluar la resistencia de los músculos frente a la oxidación una vez convertidos en carne. Un ensayo de inducción de la oxidación *in vitro* con hierro agregado, tiene la utilidad de determinar el grado de las defensas antioxidantes globales de un tejido (Mercier et al., 2004). Dicho ensayo permitió detectar un efecto de la dieta al inducir la oxidación por espacio de 30 minutos. Las muestras provenientes de pasturas presentaron valores de TBARS significativamente menores que las de corral (0,22 y 0,52 mgMDA/Kg, respectivamente), (Figura N°26).

Este resultado concuerda con la investigación de Mahecha et al. (2010), en que las muestras de *longissimus* de toros Holstein con dos dietas diferentes exhibieron en promedio una peroxidación lipídica basal similar (23,4 y 23,9 mMMDA/g), que prácticamente se mantuvo hasta los 15 minutos de inducción de la reacción. Estos autores efectuaron las medidas a diferentes tiempos, dado que TBARS resultó ser dependiente del tiempo de reacción, observando que a los 30 minutos los valores fueron 28% más altos. Sin embargo, a diferencia del presente trabajo, los valores significativamente mayores de TBARS fueron para una dieta de ensilado de pasto y los menores para una dieta con maíz. Mahecha et al. (2009) ya habían encontrado diferencias en la peroxidación de lípidos musculares entre grupos dietarios, aunque ocurrieron más rápidamente (a los 15 minutos), y además, las diferencias entre los grupos fueron más altas (52%) luego de 120 minutos de reacción.

En este trabajo, los valores de TBARS para 30 minutos resultaron superiores en un 35% para la dieta de pasturas y en un 62% para la de grano, respecto de los iniciales. Como era de esperar, los antioxidantes de pasturas naturales protegieron más la carne de la lipoperoxidación.

En contraste, varias investigaciones mostraron un efecto significativo de las dietas sobre los valores basales de TBARS sin y con inducción (tiempo 0) del proceso de oxidación. Mercier et al. (2004) estudiaron el efecto de dietas de terminación, en pasturas y mixtas de grano y pasto, sobre la oxidación de los lípidos en músculo de LD de vacas Charolais. La oxidación fue determinada a diferentes tiempos (0, ½, 2 y 5 horas) e inducida con hierro ferroso y peróxido de hidrógeno. La dieta modificó considerablemente los valores de TBARS que fueron significativamente más bajos para las muestras de pasto que para las mixtas, cualquiera fuera la duración de la oxidación. Descalzo et al. (2005) encontraron diferencias significativas en el grado de oxidación de los lípidos, a tiempo inicial, entre la carne de novillos cruza producida en

pasturas y la producida con granos (0,09 y 0,28 mgMDA/Kg, respectivamente). Las muestras de pasto, estaban tres veces menos oxidadas que las de grano ($P < 0,0001$). Asimismo, O'Sullivan, A., O'Sullivan, K., Galvin, Moloney, Troy, & Kerry (2002) informaron que la carne de animales alimentados con ensilado de pasto tenía menor peroxidación lipídica que la de los animales alimentados con ensilado de maíz o una mezcla 60:40 de ensilado de maíz y de ensilado de pasto.

En el mismo sentido, Realini et al. (2004) encontraron que los valores iniciales de TBARS para la carne de animales Hereford terminados en pasturas eran menores ($p < 0,01$) que para los terminados con dieta de concentrado que contenía, entre otros, ensilado y granos de maíz. Gatellier et al. (2005) compararon el efecto de la dieta de terminación durante 100 días (pasturas o dieta mixta con maíz ensilado y heno) sobre el color y la estabilidad de los lípidos en músculo LD de vacas y novillos/as Charolais. La dieta tuvo un efecto importante en la estabilidad de los lípidos y la carne de animales de pastoreo mostró niveles de TBARS significativamente más bajos que la carne de animales terminados con dieta mixta. Insani et al. (2008), evaluaron la oxidación de lípidos en filetes de *Psoas mayor* de novillos cruza. Un grupo de animales fue alimentado en pastoreo y otro grupo fue terminado en el sistema de engorde a corral (dieta de grano) durante 110 días previos a la faena. Las muestras mostraron diferencias en el inicio de la oxidación resultando valores mayores de TBARS para la dieta de granos.

El efecto de mayor estabilidad oxidativa observada para la carne procedente de dietas de pasturas ha sido explicada, en parte, por el mayor contenido de α -tocoferol (Faustman et al., 1989; Gatellier, Hamelin, Durand, & Renner, 2001; Mercier et al., 2004; Descalzo et al., 2005; Gatellier et al., 2005; De La Fuente et al., 2009; Pouzo et al., 2016), y de α -tocoferol y β -caroteno (Yang et al., 2002b; Gatellier et al., 2004; Descalzo et al., 2005; Insani et al., 2008;

Descalzo & Sancho, 2008), que se incorpora en el tejido muscular. Sin embargo, la mayoría de estos estudios no han mostrado diferencias en los valores de TBARS asociados con concentraciones de vitamina E en la carne fresca (Descalzo & Sancho, 2008).

En el presente estudio, la cantidad incorporada de vitamina E en el músculo para ambas dietas resultó menor que el umbral propuesto ($>3 \mu\text{g/g}$) por varios autores, como se mencionó antes, necesario para proporcionar suficiente protección frente al deterioro oxidativo de la carne. Pese a que, según Descalzo y Sancho (2008), los valores de oxidación medidos por TBARS son difíciles de relacionar con la cantidad de α -tocoferol en la carne fresca, en este trabajo se halló una correlación negativa alta ($r = -0,887$, $p < 0,01$) entre esta vitamina y los valores de TBARS inducido por 30 minutos, por consiguiente, el α -tocoferol sería uno de los factores que está influyendo en la resistencia a la oxidación. De acuerdo a esto, como la incorporación de vitamina E fue significativamente más alta para la carne de pasturas, es posible que la cantidad incorporada pueda evitar la oxidación de los lípidos durante el almacenamiento de la carne.

Algunas investigaciones previas, hallaron una correlación negativa entre el contenido de α -tocoferol y el nivel de TBARS en la carne bovina (Pensel et al., 2002; Descalzo et al., 2005; Gatellier et al., 2005; Wood et al., 2008). Descalzo et al. (2005) encontraron, además, que el β -caroteno correlacionó inversamente con TBARS. Ambos antioxidantes (α -tocoferol y β -caroteno), mostraron el mismo valor de corte discriminando los animales alimentados con pasto de los alimentados con grano. Por el contrario, Mahecha et al. (2010) informaron que el β -caroteno exhibió una correlación positiva significativa con la peroxidación lipídica, para valores elevados del antioxidante ($2\mu\text{g/g}$). Estos autores suponen que posiblemente el β -caroteno puede funcionar como antioxidante en condiciones de baja acumulación de sustancias reactivas, pero que su función puede cambiar a pro-oxidante, o puede ser degradado a TBARS, cuando se halla en altas concentraciones.

En el presente trabajo también se pudieron diferenciar las muestras de pasturas de las de grano al correlacionar α -tocoferol frente a TBARS, sin embargo, no se halló correlación entre β -caroteno y TBARS. A pesar de esto, el β -caroteno se incorporó en mayor nivel en el músculo de bovinos terminados con dieta de pasto y puede llegar a desempeñar un papel aditivo al de la vitamina E en la mejora de la estabilidad lipídica de la carne (Descalzo et al., 2005; Insani et al., 2008).

Además del contenido de estos antioxidantes, no se puede dejar de considerar a algunos otros factores que influyen en la estabilidad oxidativa del tejido muscular, no analizados en este trabajo. Por ejemplo, la proporción de ácidos grasos poliinsaturados, en particular la relación del α -tocoferol con AGPI de cadena larga (>18:2) que intervienen en el equilibrio entre los compuestos pro-oxidantes/antioxidantes (Descalzo et al., 2005; Mahecha et al., 2009; Luciano et al., 2011) y otros antioxidantes naturales que serían más abundantes en las pasturas que en los cereales como los ubiquinoles, los flavonoides y la vitamina C, entre otros (Gatellier et al., 2005). En especial, esta última, interviene en la regeneración de la forma oxidada de la vitamina E y su presencia en el lado citoplasmático de las membranas celulares, cerca de las moléculas de tocoferol, podría contribuir a mantener el estado antioxidante dentro del tejido (Descalzo & Sancho, 2008). Ya se había especulado con la posibilidad de una acción complementaria entre antioxidantes hidrofílicos y el α -tocoferol para disminuir la oxidación de los lípidos a nivel de las membranas y de este modo lograr una mayor estabilidad oxidativa en la carne de vacuno alimentado con pastos.

Los ensayos de expresión de genes se llevaron a cabo en las mismas muestras de músculo *L. dorsi* que fueron analizadas para las determinaciones bioquímicas antes detalladas. Se realizaron RT-PCRs para cada conjunto de cebadores correspondientes a los genes candidatos elegidos, incluyendo al ARN 18S como control de la expresión endógena.

Los genes candidatos fueron seleccionados en función de los roles que desempeñan las proteínas codificadas por ellos en el transporte y captación de las vitaminas analizadas (α -tocoferol y retinol) y de una proteína enzimática que cumple funciones en la defensa antioxidante. La proteína de transferencia del α -tocoferol (α -TTP), se expresa fundamentalmente en el citosol de los hepatocitos pero, también, se ha detectado en varios tejidos (Lim & Traber, 2007). Su función es regular los niveles de α -tocoferol en el plasma y en los tejidos periféricos (Azzi, et al., 2004; Koh et al., 2013). La proteína se encarga de unir de forma selectiva al α -tocoferol para ser secretado, a continuación, en las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Las VLDL enriquecidas en α -tocoferol ingresan en la circulación donde se convierten en lipoproteínas de baja densidad (LDL) que liberan el antioxidante en los tejidos periféricos (Azzi, et al., 2004; Döring et al., 2004; Koh et al., 2013).

Luego de que el α -tocoferol ingresa en las células de los tejidos periféricos, es unido selectivamente por la proteína asociada al α -tocoferol (α -TAP). Esta proteína citosólica muestra, igual que α -TTP, una alta afinidad por el α -tocoferol por sobre los otros isómeros de la vitamina. La función de α -TAP en el transporte intracelular del α -tocoferol aun no está totalmente esclarecida, pero al parecer actúa como un factor de transcripción dependiente de la vitamina (Azzi et al., 2004; Yamauchi et al., 2001; Döring et al., 2004).

Asimismo, la elección del gen CRBP1 (proteína celular de unión al retinol) estuvo basada en su función de captación del retinol por los tejidos extrahepáticos una vez que este ha sido absorbido en el intestino e incorporado, luego, en el hígado por medio de los quilomicrones remanentes (Harrison, 2012; Doldo et al., 2014; Kono & Arai, 2015). El hígado secreta retinol en la circulación acompañado con otras proteínas (RBP: proteína de unión a retinol y TTR: transtirretina) y de esta manera es transportado hacia los tejidos periféricos que expresan CRBP1,

la proteína más generalizada de unión a retinol, entre otras clases de proteínas de unión a retinoides (Doldo et al., 2014; Noy, 2015).

El cuarto gen candidato, AOX2 (proteína antioxidante similar a la glutatión peroxidasa no dependiente de selenio), corresponde a una enzima de la familia de las peroxidases que se expresa en todos los órganos de los mamíferos. La función de la proteína es la reparación de las membranas celulares dañadas a través de la reducción de fosfolípidos peroxidados para lo cual utiliza glutatión como donador de electrones (Manevich & Fisher, 2005; Chowdhury et al., 2009).

Las señales de los ARNm fueron similares para las proteínas CRBP1 y AOX2, para ambas dietas, mientras que las expresiones de α -TTP y α -TAP fueron significativamente más bajas en las muestras de pasturas en comparación con las de grano (Tabla N°19).

La expresión del ARNm de CRBP1 no mostró un efecto de la dieta lo que está de acuerdo con los niveles de retinol encontrados en las muestras de tejido muscular, algo mayores para los animales alimentados con pasturas con respecto a los alimentados con grano pero sin diferencias significativas.

Estudios en cultivos celulares han mostrado que el retinol libre o sus productos metabolizados, son transportados a través de las células independientemente del ensamblado y secreción en las lipoproteínas. Gran parte del retinol absorbido de la dieta se secreta en la linfa en forma esterificada, sin embargo, una cantidad significativa también es secretada en la circulación portal como retinol libre (Harrison, 2012). Luego de la captación celular, el retinol libre es secuestrado inmediatamente mediante la unión a las proteínas celulares CRBP1 y CRBP2, dependiendo del tejido. Ambas pertenecen a una familia de proteínas de unión a lípidos (las

lipocalinas) y comparten propiedades estructurales, genéticas y bioquímicas considerables, aunque el patrón de expresión celular es diferente (Harrison, 2012; Kono & Arai, 2015).

La generalidad de las investigaciones se han llevado a cabo en células intestinales que expresan mayoritariamente CRBP2. Estudios *in vitro* indicaron que CRBP2 puede desempeñar varias funciones en el tráfico de retinol. Aparentemente, puede unirse de manera específica a transportadores en la membrana del borde en cepillo para facilitar su difusión, puede actuar como reservorio para mantener las concentraciones de retinoides libres muy bajas y así proteger las células de sus propiedades detergentes y puede presentar retinoides a diferentes enzimas para su metabolismo directo (Harrison, 2012). En estudios realizados en células Caco-2, la expresión del ARNm de CRBP2 demostró un aumento (2 a 3 veces) después del tratamiento de las células diferenciadas con ácido retinoico, pero más importante aún, esto se tradujo en un aumento en la absorción y la esterificación intracelular del retinol radiomarcado. Por otra parte, la absorción y la esterificación también se incrementaron después de la expresión de CRBP2 en estas células. Estos estudios indican que los cambios en la expresión de CRBP2 son el resultado en la modulación del metabolismo del retinol (Harrison, 2012; Reboul, 2013).

Investigaciones recientes han recabado evidencias de funciones semejantes para CRBP1. Berry et al. (2012) al investigar la participación de CRBP1 en la captación extracelular de RBP-retinol mediada por el receptor STRA6 en células de hepatocarcinoma HepG2, encontraron que la sobreexpresión, tanto de STRA6 como de CRBP1, aumentó la tasa de absorción de vitamina A. En ratones con deficiencia de CRBP1, disminuyó la capacidad de las células estrelladas hepáticas para captar el retinol entrante y mantener las reservas de ésteres de retinilo (Doldo et al., 2014). Dada la similitud estructural y funcional entre CRBP1 y CRBP2, en este trabajo, se había especulado que la expresión del ARNm de CRBP1 en el tejido muscular podría tener una

modulación análoga a la evidenciada por CRBP2, pero los resultados obtenidos no permiten hacer afirmaciones al respecto.

La expresión del ARNm de AOX2 tampoco fue estadísticamente afectada por las dietas, aunque resultó algo superior para los animales con dieta de grano. De acuerdo a la literatura, esta es la única variante de la enzima que se expresa de manera ubicua en los mamíferos y presenta actividades de glutatión peroxidasa y de fosfolipasa A2, capaz de reducir hidroperóxidos lipídicos, cumpliendo una función de reparador de membranas (Manevich & Fisher, 2005). Además, se ha informado que es altamente inducible por el estrés oxidativo. Se ha demostrado que la sobreexpresión de AOX2 confiere protección frente al daño de la membrana asociado con la peroxidación de fosfolípidos, mientras que se produce peroxidación lipídica y apoptosis cuando la expresión de AOX2 se bloquea con un oligonucleótido antisentido. Consistentes con un papel clave para AOX2 en la defensa antioxidante, ratones en los que se había suprimido el gen, exhibieron una mayor sensibilidad al estrés oxidativo, mientras que los que sobreexpresaron AOX2, eran más resistentes a la exposición al oxígeno que los de tipo salvaje. La expresión del ARNm y de la proteína, fueron inducidos por peróxido de hidrógeno y paraquat en una línea celular epitelial de pulmón de rata y por la hiperoxia en pulmones de este animal, aunque el mecanismo que subyace a esta respuesta sigue siendo poco claro (Chowdhury et al., 2009). Estos autores aclaran que se sabe relativamente poco sobre el control de la expresión del ARNm de AOX2 y que el estrés oxidativo puede referirse a un amplio espectro de condiciones que cambian el estado redox celular, tales como el aumento de la producción de distintas especies de radicales libres dentro de la célula o el tratamiento con compuestos pro-oxidantes que son tío reactivo e imitan el daño oxidativo. El tipo y magnitud del estrés puede así ser de importancia en

la regulación de la expresión del gen en los tejidos donde las concentraciones de peróxido de hidrógeno se elevan, tal como se ha demostrado en algunos tumores.

Es probable que las diferencias en el estado redox y el grado de oxidación influenciados por las dietas en el presente estudio, no hayan sido suficientes como para modular la expresión del ARNm de AOX2 de manera significativa. En consecuencia, el resultado obtenido estaría en concordancia con el mayor estado de oxidación, aunque no significativo, determinado por TBARS para el grupo con dieta de grano. Cabe aclarar que, tanto para CRBP1 como para AOX2, no se pueden contrastar los resultados hallados con los de otros trabajos porque no existen investigaciones sobre la expresión de estos genes en condiciones similares.

Como ya se mencionó, las dietas tuvieron efecto sobre la expresión de los ARNm de las proteínas relacionadas con el transporte y metabolismo del α -tocoferol (α -TTP y α -TAP), resultando significativamente menor en ambos casos para la dieta de pasturas.

Al parecer, tampoco hay trabajos acerca de la regulación por la dieta de la expresión de estos genes en muestras de músculo bovino obtenidas en condiciones de producción. Los datos disponibles en la bibliografía se refieren, casi exclusivamente, a la expresión de α -TTP en distintas líneas celulares humanas, de ratas y ratones, aunque últimamente se cuenta con algunos datos en otros animales, como ovejas y cerdos, en situación de producción.

La proteína α -TTP se localiza principalmente en el citosol de los hepatocitos, así que la mayoría de las investigaciones se han llevado a cabo en este tipo celular. Al momento de plantear este trabajo, no se disponía de información probatoria sobre la expresión de α -TTP en tejido muscular, en consecuencia, se esperaba que no hubiera expresión del ARNm en relación con la dieta.

Recientemente se ha comprobado que α -TTP también se expresa, aunque en niveles mucho más bajos que en el hígado, en el corazón, bazo, pulmón y riñón, incluido el músculo esquelético en ovejas (Zuo, Luo, Liu, Jia, Zhang, Jiao, & Chang, 2014) y en ratones (Takahashi, Takisawa, Shimokado, Kono, Arai, & Ishigami, 2016). En concordancia con esto, han aparecido publicaciones que sientan las bases para ensayos sobre la incorporación y metabolismo de la vitamina E en tejidos distintos del hepático. Aunque el rol potencial de α -TTP en la modulación de la función celular en cualquiera de estos tejidos queda por determinar, es razonable especular que las funciones de α -TTP en éstos, sean las mismas que desempeña en el hígado (Zuo et al., 2014). Se ha demostrado que α -TTP une selectivamente α -tocoferol regulando sus niveles en la circulación y el estado de este antioxidante en los tejidos periféricos (Koh et al., 2013). Por otro lado, a pesar del papel central que juega α -TTP en el adecuado mantenimiento de la vitamina E, la regulación de su expresión en respuesta a la ingesta dietaria de la vitamina permanece incierta (Liu, Luo, Yue, Ge, Yuan, Yan, & Ji; 2012).

Ulatowski, Dreussi, Noy, Barnholtz-Sloan, Klein, & Manor (2012), demostraron que la expresión génica humana de α -TTP es regulada transcripcionalmente. La regulación de la expresión del ARNm de α -TTP se ha investigado en experimentos con animales en condiciones cambiantes de vitamina E, de estrés oxidativo, de malnutrición, de diabetes y de suministro de dietas suplementadas con ácido linoleico conjugado (CLA). Se han aportado evidencias que la expresión de α -TTP y el estado de la vitamina E se ven afectados por el estrés oxidativo. Varios estudios han demostrado los efectos de la dieta, o los niveles de vitamina E, en la expresión de α -TTP hepática pero con resultados contradictorios, lo que ha llevado a considerar que la regulación de la expresión es afectada por el tipo y duración del estrés oxidativo (Ulatowski et al., 2012).

En el estudio de Koh et al. (2013), el α -tocoferol no activó la transcripción del ARNm de α -TTP humana en hepatocitos inmortalizados, mientras que un estudio anterior mostró que la expresión de α -TTP fue inducida por el α -tocoferol (Ulatowski et al., 2012).

Shaw & Huang (1998) observaron que los niveles hepáticos de α -TTP en ratas con una dieta deficiente en vitamina E durante 12 semanas disminuyeron, en comparación con aquellas alimentadas con una dieta control. A su vez, al cotejar el grupo control con los animales alimentados con una dieta con suficiente vitamina E, no se observó cambio en la expresión de α -TTP.

Los resultados de Fechner, Schlame, Guthmann, Stevens, & Rüstow (1998) mostraron que los α y δ -tocoferoles fueron capaces de inducir la expresión del ARNm de α -TTP en hígado de rata, mientras que una dieta deficiente en estos isómeros no cambió la expresión, pero luego de realimentar los animales con una dieta que contenía α o δ , o ambos tocoferoles, se produjo un aumento constante (aprox. 7 veces) en la expresión de α -TTP.

Bella, Schock, Lim, Leonard, Berry, Cross, & Traber (2006) demostraron que los cambios en los niveles hepáticos de α -TTP fueron mínimos en respuesta a los contenidos de vitamina E en la dieta y al estrés oxidativo. Liu et al. (2012) estudiaron en el hígado de ovejas la expresión de ARNm y de proteína α -TTP, por qRT-PCR y *Western blotting*, en respuesta a diferentes concentraciones de vitamina E en la dieta. Los niveles crecientes de α -tocoferol dietarios no afectaron la expresión del ARNm de α -TTP de forma significativa, mientras que los grupos de ovinos alimentados con bajo nivel de la vitamina, presentaron significativamente mayor cantidad de α -TTP en comparación con los grupos alimentados con elevado contenido de vitamina E.

Lauridsen, Theil, & Jensen (2013) evaluaron los efectos de aumentar la cantidad de α -tocoferol y la variación en la composición de ácidos grasos de la dieta, durante un período de cuatro semanas, sobre la expresión hepática de genes implicados en la transferencia de α -tocoferol y en la oxidación de los ácidos grasos en cerdos. Los resultados mostraron que la composición en ácidos grasos de la dieta modificó la expresión de α -TTP, mientras que los niveles de vitamina E de la dieta no tuvieron influencia en la expresión hepática del gen.

Liu, Luo, Zuo, Jia, Zhang, Chang, & Jiao (2014) investigaron la expresión del ARNm de α -TTP en plasma e hígado de ovejas alimentadas con una dieta control y cuatro dietas con diferentes concentraciones de α -tocoferol durante 120 días. El efecto de la suplementación con vitamina E fue evidenciado por cambios significativos en las concentraciones de este antioxidante en el plasma y el hígado. Sin embargo, la dieta no afectó a la expresión de α -TTP determinada por qRT-PCR y *Western-blot*, a excepción de los grupos suplementados con alto contenido de vitamina E, lo que incrementó significativamente la expresión a nivel de la proteína. Estos autores, también encontraron que α -TTP se expresó en el citoplasma de las células del corazón, bazo, pulmón y riñón, pero no en los tejidos musculares estriados y testiculares.

Ayuso, Óvilo, Fernández, Nuñez, Isabel, Daza, López-Bote, & Rey (2015) basándose en que las vitaminas A y E se han reportado como antagonistas, estudiaron la deposición de éstas en los tejidos y la expresión de seis genes candidatos seleccionados según sus roles en el metabolismo del retinol y del α -tocoferol, entre ellos, α -TTP. Los análisis de expresión se llevaron a cabo en tejido hepático y adiposo de cerdos alimentados con una dieta enriquecida en vitamina A suministrada durante toda su vida y dos dietas restringidas en esta vitamina que se proporcionaron a partir de edades diferentes. La concentración de retinol en los tejidos reflejó el

nivel de vitamina A en la dieta y la expresión de los genes relacionados con el metabolismo del antioxidante se vio afectado por el tratamiento dietético. Por otra parte, aunque la expresión de los genes relacionados con el α -tocoferol no fueron estadísticamente afectados por las dietas, la expresión de α -TTP se vio disminuida por el tiempo de tratamiento mostrando un patrón opuesto al observado para los genes relacionados con la vitamina A.

Todos los estudios citados fueron realizados en tejido hepático, y algunos en plasma o tejido adiposo, y la disparidad de los resultados reportados, sugiere un mecanismo complejo de regulación de la expresión de α -TTP. Una posible explicación para los resultados inconsistentes es que la actividad de transferencia del α -tocoferol *in vitro* no resume correctamente los hallazgos sobre las funciones fisiológicas de α -TTP. Esto podría implicar alguna otra actividad no conocida de α -TTP, y los mecanismos subyacentes de secreción de α -tocoferol dependientes de α -TTP, podrían involucrar otros componentes celulares (Morley, Panagabko, Shineman, Mani, Stocker, Atkinson, & Manor; 2004).

Las investigaciones que informan sobre la expresión de α -TTP en diferentes tejidos no hepáticos son las de, Zuo et al. (2014) y González-Calvo, Joy, Alberti, Ripoll, Molino, Serrano, & Calvo (2014).

Zuo et al. (2014) determinaron los efectos de la vitamina E de la dieta en los niveles de ARNm de α -TTP por qRT-PCR en tejidos extrahepáticos (corazón, bazo, pulmón, riñón y en los músculos *L. dorsi* y glúteo) de ovejas. Además, utilizaron la técnica inmunohistoquímica para detectar la proteína α -TTP en estos tejidos, confirmando que se expresa en otros tejidos distintos del hepático, sin embargo, los niveles de expresión fueron de una magnitud más baja que los hallados en el hígado. Los resultados mostraron que los niveles de vitamina E influyeron sobre la expresión de α -TTP en algunos tejidos y, en otros, aun con un nivel de suplementación de

vitamina importante, no hubo respuesta. Los niveles de ARNm en el riñón y en los músculos *L. dorsi* y glúteo no fueron afectados por la vitamina de la dieta. Los autores concluyeron que el efecto fue evidentemente específico del tejido, pero que las razones de estas diferencias no estaban claras.

González-Calvo et al. (2014) investigaron cómo diferentes períodos de terminación con dietas suplementadas con α -tocoferol (10, 20 y 30 días) y una dieta de pastoreo en alfalfa, afectaba los niveles de expresión de ARNm de 18 genes relacionados con el metabolismo de la vitamina E en músculo *Longissimus thoracis* (LT) y en la grasa subcutánea de corderos. También determinaron el contenido de vitamina E en los músculos encontrando diferencias significativas entre los tratamientos para LT. El ARNm de α -TTP, detectado por qPCR, se halló en niveles muy bajos en LT mientras que los niveles más altos se detectaron en la grasa subcutánea. La expresión de cuatro genes en LT, diferentes a los del presente trabajo, fue significativamente modulada por el sistema de alimentación. Estos genes estaban relacionados con la captación, transporte o regulación del α -tocoferol en el músculo, pero en el caso de α -TTP los niveles de vitamina E en la dieta no afectaron la expresión de ARNm en LT.

De la comparación de los resultados de estos dos últimos estudios con los del presente trabajo, surge nuevamente la disparidad en la expresión del ARNm de α -TTP sin una tendencia definida. Sin embargo, Kim, Arai, Arita, Sato, Ogihara, Inoue, Mino, & Tamai (1998), informaron que el aumento de la ingesta de α -tocoferol disminuyó el nivel de ARNm de α -TTP en hígado de ratas y, en aquellas que fueron alimentadas con dietas deficientes en vitamina E, se incrementó la expresión. Estos autores concluyeron que la síntesis de α -TTP puede ser regulada por el estado nutricional de la vitamina E. La dirección del cambio fue similar al del presente trabajo, pero Zuo et al. (2014), establecieron que el α -tocoferol de la dieta modula la expresión

de este gen de manera específica según el tejido, por lo que los resultados tampoco se podrían cotejar con las investigaciones realizadas en tejidos diferentes del *L. dorsalis* y quizás, también, entre especies distintas.

Por otro lado, parece ser que el estrés oxidativo puede modular la expresión de α -TTP. Se informó que la hipoxia disminuyó la expresión de α -TTP en el hígado de rata (Ban, Takitani, Kim, Murata, Morinobu, Ogihara, & Tamai; 2002) y, al inducir estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno en hepatocitos y neuronas del cerebelo, aumentó la expresión de α -TTP aproximadamente dos veces, efecto que fue atenuado por el agregado de α -tocoferol (Ulatowski & Manor, 2010).

Ulatowski et al. (2012) demostraron que el estrés oxidativo facilitó la expresión α -TTP, tanto en los niveles de ARNm como de proteína y aumentó la actividad transcripcional del promotor endógeno de α -TTP. Estos autores indujeron el estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno y con hipoxia, observándose un incremento en la expresión de α -TTP de aproximadamente dos veces, en el primer caso, y de cuatro veces en el segundo.

Asimismo, los resultados del presente trabajo mostraron que α -TTP correlacionó de forma directa con el grado de oxidación lipídica al inducir por 30 minutos una reacción de Fenton, e inversamente, con los niveles de α -tocoferol incorporados en el músculo LD. Como la vitamina E es un antioxidante bien conocido, una ingesta o incorporación más baja de la vitamina en el tejido muscular podría incrementar el estrés oxidativo lo que induciría un aumento en la expresión del ARNm de α -TTP, y de forma opuesta, una mayor incorporación de la vitamina podría minimizar el estrés oxidativo y promover una disminución de la expresión, tendencia observada en este estudio. Es posible que las respuestas al estrés oxidativo del gen α -

TTP sean más relevantes en este tipo de tejido, donde los niveles de α -TTP son significativamente más bajos que en el hígado (Ulatowski et al., 2012).

Como se cree que el estado de la vitamina E influye en el riesgo de enfermedades con un componente de estrés oxidativo, se ha sugerido que la regulación de la expresión de α -TTP por éste, puede representar un mecanismo importante de retroalimentación fisiológica en el que el aumento de los niveles de α -TTP en respuesta al estrés oxidativo, resulten en el aumento de la biodisponibilidad del antioxidante para prevenir un mayor daño oxidativo (Ulatowski et al., 2012).

Se ha postulado que otros mecanismos podrían estar involucrados en la regulación de α -TTP, como el nivel de insaturación de los lípidos tisulares (Lauridsen et al., 2013) y la influencia de la no ingesta de alimentos, a partir de observar que el ayuno claramente aumentó la expresión de ARNm de α -TTP en el hígado de ratones (Takahashi et al., 2016). Además, Koh et al. (2013) demostraron que los receptores nucleares X (LXR) del hígado, que juegan un rol importante en el metabolismo del colesterol y la lipogénesis, regulan la transcripción de α -TTP por medio de la interacción directa con el promotor del gen, para modular el estado del α -tocoferol a través de la inducción de la expresión de α -TTP en condiciones de deficiencia de vitamina E.

En síntesis, la información disponible es insuficiente para una comprensión completa de los mecanismos y factores que regulan los niveles de ARNm de α -TTP, aunque según este trabajo, parece ser que los niveles de vitamina E y el estado oxidativo del músculo pueden modular su expresión. Dado que los resultados de varios son contradictorios y que, de los cuatro genes candidatos seleccionados en este trabajo, al parecer solo α -TTP podría potencialmente ser utilizado como marcador de dieta, se justifican más investigaciones sobre el rol funcional de α -TTP en la absorción y distribución de la vitamina E en el tejido muscular.

En cuanto a la expresión de α -TAP, esta fue significativamente menor en la carne de pasturas, aunque no se encontró correlación con los niveles de α -tocoferol incorporados en el músculo, ni con la capacidad antioxidante, ni con el estado de oxidación. La proteína α -TAP presenta homología estructural y una alta afinidad por el α -tocoferol igual que α -TTP, cumpliendo funciones en el transporte intracelular del α -tocoferol e impidiendo, a la vez, la oxidación química de la vitamina, pero el papel que desempeña está aun menos claro que para α -TTP (Azzi et al., 2016). Se ha demostrado que α -TAP transporta tocotrienoles, tocoferoles, así como algunos derivados de éstos, con diferentes afinidades. En apoyo a la hipótesis del transporte, se ha observado que la sobreexpresión de α -TAP incrementa la absorción de α -tocoferol y del derivado α -tocoferil succinato. Además de la vitamina E, α -TAP se une a varios otros lípidos naturales (escualeno y varios fosfolípidos) con afinidad relativamente alta. Queda por demostrar si el transporte y unión de la vitamina E representa su rol más importante *in vivo*, o si otras funciones como la modulación de la actividad de PI3K (fosfatidilinositol-3-quinasa), de la proliferación celular, de la expresión génica, de la escualeno epoxidasa y de la HMG-CoA reductasa (hidroximetilglutaril-CoA reductasa), son las funciones fisiológicas de esta proteína (Zingg, 2007).

Estudios realizados en ratones α -TAP *knockout*, sugieren que esta mantiene el nivel de colesterol en el plasma en estado estacionario durante el ayuno mediante la compensación de la disminución de la actividad de las enzimas escualeno epoxidasa y de la HMG-CoA reductasa. El ayuno está asociado con una reducción de la absorción de vitamina E de la dieta, y una elevada síntesis *de novo* de colesterol puede aumentar los requerimientos de vitamina E, lo que sugiere que la regulación de α -TAP puede desempeñar un doble papel en el aumento de la biosíntesis de colesterol y en el transporte y retención de suficiente vitamina E en los tejidos durante

condiciones de suministro limitado o ante el aumento del consumo (Zingg, Kempna, Paris, Reiter, Villacorta, Cipollone, Munteanu, ... & Ricciarelli, 2008).

Se puede suponer que la expresión celular de α -TAP determina, al menos en parte, los niveles de tocoferol en los tejidos porque influye en la absorción, la retención, el metabolismo y la exportación de la vitamina (Zingg et al., 2008). Los datos hallados en este trabajo mostraron que es posible que una mayor oferta dietética de vitamina E en el tratamiento con pasturas con respecto al de grano, haya sido lo que disminuyó la síntesis de ARNm de α -TTP con el fin de reducir la captación de α -tocoferol por el tejido muscular. Dada la similitud estructural entre α -TTP y α -TAP y la alta afinidad de ambas por el α -tocoferol, podría suponer que la expresión disminuida de esta última se relacione con la menor expresión de α -TTP, ya que no con los niveles de la vitamina.

En función de los resultados obtenidos por la técnica de PCR a tiempo final, es posible decir que la puesta a punto para la detección de CRBP1, AOX2, α -TTP y α -TAP a nivel de ARNm a partir de muestras de tejido muscular de bovinos, permitió obtener diferencias claras en la expresión de dichos genes. Los cebadores seleccionados posibilitaron alcanzar resultados satisfactorios con los cuatro genes, utilizando solamente una temperatura de anillamiento. Un inconveniente que se presentó en este trabajo fue determinar el número de ciclos apropiado para cada gen particular, por lo que no se pudo utilizar un mismo programa de PCR para todos simultáneamente.

Si bien la técnica resultó aplicable, una de las principales desventajas del ensayo de RT-PCR radica en la falta de objetividad de los resultados, ya que la visualización de los productos de amplificación por electroforesis en gel de agarosa, en muchos casos, es dudosa o difícil de aseverar por el analista y deben de ser repetidos para su confirmación. Por otra parte, en el

método de RT-PCR real time (qRT-PCR) la detección del producto amplificado es independiente del operador y se puede realizar mediante la excitación de fluorocromos, de forma fácil y repetitiva, por lo que sería recomendable realizar más estudios utilizando este método. Es importante mencionar que qRT-PCR no requiere la utilización de bromuro de etidio, un componente altamente cancerígeno (Nanni, 2007).

8. Conclusiones

En las condiciones en que se llevó a cabo esta investigación, los bovinos terminados en pasturas naturales incorporaron en general, en el músculo *L. dorsi*, mayores niveles de los antioxidantes ensayados que los animales terminados con una dieta de grano.

La incorporación de α -tocoferol y β -caroteno en el tejido muscular fue modulada por la dieta, resultando los niveles de ambos significativamente más elevados para la dieta de pasto, mientras que no se observó un efecto de la dieta en los contenidos de γ -tocoferol, retinol y luteína.

La dieta no modificó sustancialmente la capacidad antioxidante (CAO) del músculo LD medida por FRAP y pareció estar asociada al potencial redox muscular, más que a la incorporación diferencial de antioxidantes liposolubles. La alimentación con pasturas aparentó proveer de otros compuestos de naturaleza hidrofílica que podrían actuar de forma complementaria con los antioxidantes incorporados.

El estado oxidativo basal de las muestras de LD determinado por TBARS no fue prácticamente modificado por los tratamientos, pero la dieta de pasturas mejoró la resistencia a la oxidación de la carne, lo que se evidenció al inducir una reacción de Fenton durante 30 minutos.

No se encontró una relación entre la capacidad antioxidante y el estado oxidativo del músculo, mientras que este último y el contenido tisular de α -tocoferol, mostraron una relación inversa permitiendo diferenciar las muestras según los tratamientos. La carne procedente de la

dieta de pasturas al parecer incorporó suficiente vitamina E como para estar más protegida contra el deterioro oxidativo en comparación con la de grano.

La expresión de los genes candidatos a nivel de ARNm relacionados con la captación de retinol y el estado oxidativo, CRBP1 y AOX2, no fue modulada por la dieta. En cambio, la expresión de α -TAP y α -TTP, asociados con el transporte específico de α -tocoferol, resultó modulada por la dieta, sin embargo, solo se halló relación entre la vitamina, el estado oxidativo y la expresión de α -TTP, sugiriendo que únicamente este último podría ser un potencial indicador de dieta.

Los ensayos de transcripción podrían indicar que, en condiciones de producción, el α -tocoferol se transfiere a los tejidos y que la presencia del isómero alfa dentro de las células podría modular su propio suministro a través de la expresión de transportadores específicos, en función de la oferta de esta vitamina en la dieta. Sin embargo, para esclarecer esta función reguladora a través de sus efectos biológicos, se deberían realizar análisis cuantitativos por PCR en tiempo real en estos genes relacionados con la incorporación de α -tocoferol en el tejido muscular.

9. Referencias

- AgroFy News. Noticias de hacienda. Exportaciones argentinas de carne vacuna cayeron 20% (25 de abril de 2016). Recuperado de <http://news.agrofy.com.ar/noticia/157552/exportaciones-argentinas-carne-vacuna-cayeron-20>.
- Alves Rodrigues, A. & Shao, A. (2004). The science behind lutein. *Toxicology Letters*, 150, 57–83.
- Andersen, H.J., Oksbjerg, N., Young, J.F. & Therkildsen, M. (2005). Feeding and meat quality- A future approach. *Meat Science*, 70(3), 543–554.
- Antolovich, M., Prenzler, P., Patsalides, E., Mc Donald, S. & Robards K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. Critical Review. *Analyst*, 127, 183-198.
- Argentina. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVYA). Guía para cuidado y uso de animales de experimentación. (2013) versión 1, 90 pp. Morón, Buenos Aires. Recuperado de <http://inta.gob.ar/documentos/manuales-sobre-cuidado-y-supervisacion-y-uso-de-animales>
- Argentina. Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI). (2005). Es saludable comer carne vacuna. Saber Como [en línea], N° 29, junio 2005. Recuperado de <http://www.inti.gob.ar/sabercomo/sc29/inti10.php>
- Argentina. Ministerio de Agroindustria. Presidencia de la Nación. Indicadores bovinos anuales 1990-2015. Recuperado de <http://www.agroindustria.gob.ar/site/ganaderia/bovinos/02-Informacion%20sectorial/01=Indicadores/index.php>
- Argentina. Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva. Plan Argentina innovadora 2020. (2013). Producción animal tradicional (producción de carne en bovinos, aves y cerdos). Buenos Aires: Pordomingo, A. Recuperado de http://www.argentinainnovadora2020.mincyt.gob.ar/?wpfb_dl=52
- Argentina. Ministerio de Salud de la Nación. Guías Alimentarias para la población Argentina. Buenos Aires, 2016. Recuperado de http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000817cnt-2016-04_Guia_Alimentaria_completa_web.pdf
- Argentina. SENASA-SIGSA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, Sistema Integrado de Gestión de Sanidad Animal.). (2016). Indicadores ganaderos. Distribución de existencias bovinas por categoría, abril de 2016. Recuperado de <http://www.senasa.gov.ar/cadena-animal/bovinos-y-bubalinos/informacion/informes-y-estadisticas>
- Armenteros, M., Ventanas, S., Morcuende, D., Estévez, M. y Ventanas J. (2012). Empleo de antioxidantes naturales en productos cárnicos. Aditivos. *Eurocarne*, 207, 63-73.

- Arnold, R.N., Arp, S.C., Scheller, K.K., Williams, S.N., & Schaefer, D.M. (1993). Tissue equilibration and subcellular distribution of vitamin E relative to myoglobin and lipid oxidation in displayed beef. *J. Anim.Sci.*, 71, 105-118.
- Auqui Silvera, S. M. (2014). Estrategias productivas y alimentarias para mejorar la calidad de la canal y de la carne del chato murciano (Tesis doctoral). Universidad de Murcia, España. Recuperada de <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/277256/TSMAS.pdf>
- Ayuso, M., Óvilo, C., Fernández, A., Nuñez, Y., Isabel, B., Daza, A., López-Bote, C.J. & Rey, A.I. (2015). Effects of dietary vitamin A supplementation or restriction and its timing on retinol and α -tocopherol accumulation and gene expression in heavy pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 202, 62-74.
- Azzi, A., Gysin, R., Kempná, P., Munteanu, A., Negis, Y., Villacorta, Lu., Visarius, T., & Zingg, J.M. (2004). Vitamin E mediates cell signaling and regulation of gene expression. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1031, 86–95. doi: 10.1196/annals.1331.009.
- Azzi, A., Meydani, S.N., Meydani, M., & Zingg, J.M. (2016). The rise, the fall and the renaissance of vitamin E. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 595, 100-108.
- Ban, R., Takitani, K., Kim, H.S., Murata, T., Morinobu, T., Ogihara, T., & Tamai, H. (2002). Alpha-tocopherol transfer protein expression in rat liver exposed to hyperoxia. *Free Radical Research*, 36(9), 933-938.
- Barua, A.B., Furr, H.C., Olson, J.A. & Van Breemen, R. B. (2000). Vitamin A and carotenoids. En: De Leenheer, A.P., Lambert, W.E., Van Bocxlaer, J.F. (eds.), *Modern Chromatographic Analysis of Vitamins*. (3th rev. ed. and expanded) Chap. 1. Belgium: University of Ghent. ISBN: 0-8247-0316-2.
- Bella, D.L., Schock, B.C., Lim, Y., Leonard, S.W., Berry, C., Cross, C.E., & Traber, M. (2006). Regulation of the α -tocopherol transfer protein in mice: lack of response to dietary vitamin E or oxidative stress. *Lipids*, 41, 105–112.
- Benzie, I.F.F. & Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- Benzie, I.F.F., & Strain, J.J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. In L. Parker & A. N. Glazer (Eds.). *Methods in Enzymology*, 299, 15–27. New York, Academic Press.
- Berlett, B.S. & Stadtman, E.R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. Minireview. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(33), 20313–20316.
- Bernard, C., Cassar-Malek, I., Dubroeuq, H., Hocquette, J.F., Le Cunff, M., & Renand, G. (2007). New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 5229-5237. DOI: 10.1021/jf063372l.

- Berry, D.C., O'Byrne, S.M., Vreeland, A.C., Blaner, W.S., & Noy, N. (2012). Cross talk between signaling and vitamin A transport by the retinol-binding protein receptor STRA6. *Molecular and Cellular Biology*, 32(15), 3164–3175.
- Braghieri, A., Cifuni, G.S., Girolami, A., Riviezzi, A.M., Marsico, I. y Napolitano, F. (2005). Chemical, physical and sensory properties of meat from pure and crossbred Podolian bulls at different ageing times. *Meat Science*, 69, 681-689.
- Buckley, D.J., Morrissey, P.A. & Gray, J.I. (1995). Influence of dietary vitamin E on the oxidative stability and quality of pig meat. *Journal of Animal Science*, 73(10), 3122-3130.
- Burri, B.J. & Clifford, A.J. (2004). Carotenoid and retinoid metabolism: insights from isotope studies. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 430, 110–119.
- Burton, G.W., Ingold, K.U. (1984). β -carotene: an unusual type of antioxidant. *Science*, 224(4649), 569-573. doi:10.1126/science.6710156.
- Burton, G.W. (1989). Antioxidant action of carotenoids. *Journal of Nutrition*, 119(1), 109-111.
- Burton, G.W., Daroszewski, J., Nickerson, J.G., Johnston, J.B., Mogg, T.J., & Nikiforov, G.B. (2014). β -carotene autooxidation: oxygen copolymerization, non-vitamin A products, and immunological activity. *Can. J. Chem.*, 92, 305-316. URL: x.doi.org/10.1139/cjc-2013-0494
- Buttriss, J.L. & Diplock, A.T. (1984). High-performance liquid chromatography methods for vitamin e in tissues. In L. Parker & A. N. Glazer (Eds.). *Methods in Enzymol.*, 105, 131-138. New York, Academic Press.
- Carreras Ferrer, I. (2004). Influencias de la suplementación de antioxidantes y de la administración de enrofloxacin en la calidad y seguridad de la carne de ave (Tesis doctoral). ISBN: 84-689-3090-3. Universitat de Girona, España. Recuperada de <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/8035/Ticf.pdf;jsessionid=51B0B35C6430328698B346C9134B3303.tdx1?sequence=1>
- Carrillo, J.A., He, Y., Li, Y., Liu, J., Erdman, R.A., Sonstegard, T.S., & Song, J. (2016). Integrated metabolomic and transcriptome analyses reveal finishing forage affects metabolic pathways related to beef quality and animal welfare. *Nature, Scientific Reports*, 16 pp. doi: 10.1038/srep25948.
- Cassar-Malek, I., Jurie, C., Bernard, C., Barnola, I., Micol, D., Hocquette, J.F. (2009). Pasture-feeding of charolais steers influences skeletal muscle metabolism and gene expression. *J. Physiol. Pharmacol*, 60(Suppl 3), 83-90.
- Cascone, A. (2005). Study and prevention of lipid oxidation in meat (Tesis doctoral). Universidad de Nápoles, Nápoles, Italia. Recuperada de: http://www.fedoa.unina.it/951/1/Tesi_Cascone_Annunziata.pdf

- Cecarini, V., Gee, J., Fioretti, E., Amici, M., Angeletti, M., Eleuteri, A.M. y Keller J.N. (2007). Protein oxidation and cellular homeostasis: emphasis on metabolism. *Biochimica et Biophysica, acta* 1773, 93-104.
- Céspedes Miranda, E. y Castillo Herrera, J. (2008). La peroxidación lipídica en el diagnóstico del estrés oxidativo del paciente hipertenso. ¿Realidad o mito?. La Habana, Cuba. Recuperado de http://www.bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol27_2_08/ibi03208.htm
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162, 156-159.
- Chowdhury, I., Mo, Y., Gao, L., Kazi, A., Fisher, A.B., & Feinstein, S.I. (2009). Oxidant stress stimulates expression of the human peroxiredoxin 6 (Prdx6) gene by a transcriptional mechanism involving an antioxidant response element. *Free Radic Biol Med.* 46(2), 146-153. DOI: 10.1016/reeradbiomed.2008.09.027.
- Cifuni, G.F., Napolitano, F., Riviezzi, A.M., Braghieri, A. y Girolami, A. (2004). Fatty acid profile, cholesterol content and tenderness of meat from Podolian young bulls. *Meat Science*, 67(2), 289-297.
- Código Alimentario Argentino. Act. 10-2014. Cap. VI. Alimentos cárneos y afines. Art. 247. [consultado 10 mayo 2016]. Recuperado de http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp
- Cortinas, L., Barroeta, A., Villaverde, C., Galobart, J., Guardiola, F. & Baucells, M.D. (2005). Influence of the dietary polyunsaturation level on chicken meat quality: lipid oxidation. *Poultry Science*, 84, 48–55.
- Cottica, S.M., Sawaya, A.C.H.F., Eberlin, M.N., Franco, S.L., Zeoulae, L.M. y Visentainer J.V. (2011). Antioxidant activity and composition of propolis obtained by different methods of extraction. *J. Braz. Chem. Soc.*, 00, 1-7.
- Daley, C.A., Abbot, A., Doyle, P.S., Nader, G.A. y Larson, S. (2010). A review of fatty acid profiles and antioxidant content in grass-fed and grain-fed beef. *Nutrition Journal*, 9(10). Recuperado de <http://www.nutritionj.com/content/9/1/10>
- De la Fuente, J., Díaz, M.T., Álvarez, I., Oliver, M.A., Font i Furnols, M., Sañudo, C., Campo, M.M., Montossi, F., Nute, G.R., & Cañeque, V. (2009). Fatty acid and vitamin E composition of intramuscular fat in cattle reared in different production systems. *Meat Science*, 82, 331-337.
- Descalzo, A.M., Insani, E.M., Biolatto, A., Sancho, A.M., García, P.T., Pensel, N.A. y Josifovich, J.A. (2005). Influence of pasture or grain-based diets supplemented with vitamin E on antioxidant/oxidative balance of argentine beef. *Meat Science*, 70, 35-44.

- Descalzo, A.M., Rossetti, L., Grigioni, G., Irurueta, M., Sancho, A. M., Carrete, J., y Pensel, N. A. (2007). Antioxidant status and odour profile in argentine beef from pasture or grain-fed cattle. *Meat Science*, 75, 299–307.
- Descalzo, A.M., Rosetti, L., Sancho, A.M., García, P.T., Biolatto, A., Carduza, F., Grigioni, G.M. (2008). Antioxidant consumption and development of oxidation during ageing of buffalo meat produced in Argentina. *Meat Science*, 79(3), 582-588.
- Descalzo, A.M. y Sancho, A.M. (2008). A review of natural antioxidants and their effects on oxidative status, odor and quality of fresh beef produced in Argentina. *Meat Science*, 79, 423–436. DOI:10.1016/j.meatsci.2007.12.006.
- Descalzo, A.M., Nanni, M., Gasparovic, A.M., Rosetti, L., Islas-Trejo, A., Medrano, J.F. y Pordomingo, A. (2011). Natural antioxidants incorporated into *Longissimus dorsi* muscles of pasture or grain fed steers and their relation to gene expression. *Proceedings USB of 57th International Congress of Meat Science and Technology*, 1, 113-116. Ghent, Belgium. ISBN 978-1-62276-056-5.
- Doldo, E., Costanza, G., Agostinelli, S., Tarquini, Ch., Ferlosio, A., Arcuri, G., Passeri, D., Scioli, M.G., & Orlandi, A. (2015). Vitamin A, cancer, treatment and prevention: the new role of cellular retinol binding proteins. *Biomed Research International*, Vol 2015, Article ID 624627, 14 pp. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1155/2015/624627>
- Döring, F., Rimbach, G., & Lodge, J. (2004). *In silico* search for single nucleotide polymorphisms in genes important in vitamin E homeostasis. *Life*, 56(10), 615-620. DOI: 10.1080/15216540400020346.
- Dunne, P.G., Monahan, F.J., O'Mara, F.P., Moloney, A.P. (2005). Colour stability, under simulated retail display conditions, of *M. longissimus dorsi* and *M. semimembranosus* from steers given long-term daily exercise and supplemented with vitamin E. *Meat Science*, 71, 480–489.
- Estévez, M. (2011). Protein carbonyls in meat systems: a review. *Meat Science*, 89, 259-279.
- FAO/INFOODS (International Network of Food Data Systems). Latin American food composition tables. Argentina, Tablas nacionales de composición de alimentos (2010). Recuperado de <http://www.fao.org/infoods/infoods/tables-and-databases/latin-america/en/>
- Faustman, C., Cassens, R.G., Schaefer, D.M., Buege, D.R., Williams, S.N., & Scheller, K.K. (1989). Improvement of pigment and lipid stability in Holstein steer beef by dietary supplementation on vitamin E. *Journal of Food Science*, 54(4), 858–862.
- Faustman, C., Chan, W.K.M., Schaefer, D.M., & Havens, A. (1998). Beef Color Update: The Role for Vitamin E. *J. Anim. Sci.*, 76, 1019-1026.

- Faustman, C., Sun, Q., Mancini, R. & Suman, S.P. (2010). Myoglobin and lipid oxidation interactions: mechanistic bases and control. Review Article. *Meat Science*, 86(1), 86–94.
- Fechner, H., Schlame, M., Guthmann, F., Stevens, P.A., & Rüstow, B. (1998). Alpha- and delta-tocopherol induce expression of hepatic alpha-tocopherol-transfer-protein mRNA. *Biochem. J.*, 331(Pt 2), 577-581.
- Fenaille, F., Mottier, P., Turesky, R.J., Ali, S. & Guy, P.A. (2001) Comparison of analytical techniques to quantify malondialdehyde in milk powders. *J. Chromatogr. A.* 6; 921(2), 237-245.
- Fernández, J., Pérez-Álvarez, J.A. & Fernández-López, J.A. (1997). Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry*, 59(3), 345-353.
- García, P.T. (2003). Limitaciones al consumo de carne bovina: factores de riesgo. *Revista Americana y FIFRA*, 7(34), 51-54.
- García, P.T., Pensel, N. A., Latimori, N. J., Kloster, A.M., Amigone, M. A. & Casal, J. J. (2005). Intramuscular lipids from steers under different grass and grain dietary regimen. *Fleischwirtschaft International*, 1, 27–31.
- García, P.T., Pensel, N.A., Sancho, A.M., Latimori, N.J., Kloster, A.M., Amigone, M.A., Casal, J.J. (2008). Beef lipids in relation to animal breed and nutrition in Argentina. *Meat Science*, 79, 500-508.
- García, P.T. (agosto, 2015). Sistema de Producción y calidad nutricional de carnes. En I Congreso Latinoamericano del Foro de la Alimentación, la Nutrición y la Salud (FANUS). XXXVIII Reunión del Capítulo Argentino de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición (CASLAN) y V Congreso de Alimentos del Siglo XXI: “Hacia una mejora de la calidad de los alimentos para una nutrición sustentable”. 3 al 5 de agosto de 2015. Buenos Aires, Argentina.
- Gatellier, P., Hamelin, C., Durand, Y., & Renerre, M. (2001). Effect of a dietary vitamin E supplementation on colour stability and lipid oxidation of air- and modified atmosphere-packaged beef. *Meat Science* 59, 133–140.
- Gatellier, P., Mercier, Y., & Renerre, M. (2004). Effect of diet finishing mode (pasture or mixed diet) on antioxidant status of Charolais bovine meat. *Meat Science*, 67, 385–394.
- Gatellier, P., Mercier, Y., Juin, H. y Renerre, M. (2005). Effect of finishing mode (pasture- or mixed-diet) on lipid composition, colour stability and lipid oxidation in meat from Charolais cattle. *Meat Science*, 69, 175-186.
- Gaviraghi, A., Deriu, F., Soggiu, A., Greppi, G.F., Bonizzi, L. y Roncada, P. (2009) Evaluation of post-mortem change in bovine fed with different diet supplementation. *Annual*

National Conference Italian Proteomic Association (ITPA): University Milano-Bicocca, 4, 217-218. Abstract recuperado de <http://hdl.handle.net/2434/65719>

- González-Calvo, L., Joy, M., Alberti, C., Ripoll, G., Molino, F., Serrano, M., & Calvo, J.H. (2014). Effect of finishing period length with α -tocopherol supplementation on the expression of vitamin E-related genes in the muscle and subcutaneous fat of light lambs. *Gene*, 552, 225-233.
- González-San José, M.L., Muñiz Rodríguez, P. y Valls Bellés, V. (2001). Actividad antioxidante de la cerveza: estudios in vitro e in vivo. *Centro de Información Cerveza y Salud*, 8, 1-57. Universidad de Burgos, Universidad de Valencia, España. Recuperado de http://www.cervezaysalud.es/wp-content/uploads/2015/05/Estudio_8.pdf
- Grau, A., Guardiola, F., Boatella, J., Barroeta, A. y Codony, R. (2000). Measurement of 2-thiobarbituric acid values in dark chicken meat through derivative spectrophotometry: influence of various parameters. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 1155-1159.
- Gray, J.I., Gomaa, E.A., & Buckley, D.J. (1996). Oxidative quality and shelf life of meats. *Meat Science*, 43, s111–s123.
- Green, M.R. & Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (4th ed.). Vol 1, chap 6. Laurel Hollow, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Grotto, D., Santa María, L., Valentini, J., Paniz, C., Schmitt, G. y García, S.C. (2009). Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. Review. *Quimica Nova*, 32(1), 169-174.
- Guerrero, A., Valero, M.V., Campo, M.M. y Sañudo, C. (2013). Some factors that affect ruminant meat quality: from the farm to the fork. Review. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 35(4), 335-347. Doi: 0.4025/actascianimsci.v35i4.21756. Recuperado de <http://www.uem.br/acta>
- Guillemin, N., Jurie, C., Renand, G., Hocquette, J.F., Micol, D., Lepetit, J., Levéziel, H., & Picard, B. (2012). Different phenotypic and proteomic markers explain variability of beef tenderness across muscles. *Int. J. Biol.*, 4, 26-38.
- Halliwell, B., Murcia, M.A., Chivico, S., Auroma, O.I. (1995). Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work?. *Crit. Rev. Food Sc. Nutr.*, 35, 7-20.
- Halliwell, B. (2006). Update on Reactive Species and Antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141, 312–322.
- Harrison, E.H. (2012). Mechanisms involved in the intestinal absorption of dietary vitamin A and provitamin A carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1821, 70–77.

- Hocquette, J.F., Lehnert, S., Barends, W., Cassar-Malek, I., & Picard, B. (2007). Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality. *Animal*, 1, 159-173.
- Hocquette, J.F., Cassar-Malek, I., Bernard-Capel, C., & Picard, B. (2009). Functional genomics and new markers for beef production-minireview. *Animal Science Papers and Reports*, 27(4), 273-280. Institute of Genetics and Animal Breeding, Jastrzębiec, Poland.
- Hocquette, J.F., Bernard-Capel, C., Vidal, V., Jesson, B., Levéziel, H., Renand, G., & Cassar-Malek, I. (2012). The GENOTEND chip: a new tool to analyse gene expression in muscles of beef cattle for beef quality prediction. *BMC Veterinary Research*, 8, 135, 10 pp. <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/8/135>
- Hongbao, M., Young, J. & Shen, Ch. (2008). RNA, DNA and protein isolation using TRIZOL reagent. *Nature and Science*, 6(3), 66-75.
- Houben, J.H., Van Dijk, A., Eikelenboom, G., & Hoving-Bolink, A.H. (2000). Effect of dietary vitamin E supplementation, fat level and packaging on colour stability and lipid oxidation in minced beef. *Meat Science*, 55, 331–336.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. Review. *J. Agric. Food Chem.*, 53(6), 1841-1856.
- Hur, S.J., Park, G.B. & Joo, S.T. (2007). Formation of cholesterol oxidation products (COPs) in animal products. *Food Control*, 18, 939–947.
- ImageJ® 1.46. Image Processing and Analysis in Java. Recuperado de <http://rsbweb.nih.gov/ij/>
- Insani, E.M., Eyherabide, A., Grigioni, G., Sancho, A.M., Pensel, N.A. y Descalzo, A.M. (2008). Oxidative stability and its relationship with natural antioxidants during refrigerated retail display of beef produced in Argentina. *Meat Science*, 79, 444–452.
- Instituto de Promoción de la Carne Vacuna Argentina (IPCVA). (Abril 2016). Área de Información Económica y Estadística. Informe de Faena y Producción 1° trimestre 2016. Recuperado de http://www.ipcva.com.ar/documentos/1537_1463760955_informemensualdeexportacionesabril2016.pdf.
- Instituto de Promoción de la Carne Vacuna Argentina (IPCVA). (2014). Área de Información Económica y Estadística. Informe de Mercados Internacionales de Carne Bovina. Recuperado de http://www.ipcva.com.ar/documentos/1309_1402323969_informedemercadosinternacionalesdecarnenovina2013.pdf.
- Jia, X., Veiseth-Kent, E., Grove, H., Kuziora, P., Aass, L., Hildrum, K.I., & Hollung, K. (2009). Peroxiredoxin-6-A potential protein marker for meat tenderness in bovine longissimus thoracis muscle. *J. Anim. Sci.*, 87, 2391-2399. doi:10.2527/jas.2009-1792.

- Johnson, E.J. (2005). Obesity, lutein metabolism, and age-related macular degeneration: a web of connections. *Nutrition Reviews*, 63(1), 9-15.
- Kanner, J. (1994). Oxidative processes in meat and meat products: quality implications. *Meat Science*, 36, 169-189.
- Kerry, J.P., Buckley, D.J., Morrissey, P.A., O'Sullivan, K., & Lynch, P.B. (1999). Endogenous and exogenous α -tocopherol supplementation: effects on lipid stability (TBARS) and warmed-over flavour (WOF) in porcine M. *Longissimus dorsi* roasts held in aerobic and vacuum packs. *Food Research International*, 31(3), 211-216.
- Kim, H.S., Arai, H., Arita, M., Sato, Y., Ogihara, T., Inoue, K., Mino, M., & Tamai, H. (1998). Effect of α -tocopherol status on α -tocopherol transfer protein expression and its messenger RNA level in rat liver. *Free Radic Res*, 28, 87-92.
- Koh, M., Takitani, K., Miyazaki, H., Yamaoka, S. & Tamai, H. (2013). Liver X receptor up-regulates α -tocopherol transfer protein expression and α -tocopherol status. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24, 2158–2167.
- Kono, N. & Arai, H. (2015). Intracellular transport of fat-soluble vitamins A and E. *Traffic*, 16, 19-34. doi:10.1111/tra.12231.
- Lauridsen, Ch., Theil, P.K., & Jensen, S.K. (2013). Composition of α -tocopherol and fatty acids in porcine tissues after dietary supplementation with vitamin E and different fat sources. *Animal Feed Science and Technology*, 179, 93-102.
- Lim, Y. & Traber, M. (2007). Alpha-tocopherol transfer protein (α -TTP): insights from alpha-tocopherol transfer protein knockout mice. *Nutrition Research and Practice*, 1(4), 247-253.
- Linden, S. (2003). α -Tocopherol, β -carotin und L- Ascorbinsäure in der Rindermast (Tesis doctoral). Universidad de Hamburgo, Alemania. 242 pp.
- Liu, Q., Lanari, M.C. & Schaefer, D.M. (1995). A review of dietary vitamin E supplementation for improvement of beef quality. *Journal of Animal Science*, 73, 3131-3140.
- Liu, K., Luo, H., Yue, D., Ge, S., Yuan, F., Yan, L. & Ji, H. (2012). Molecular cloning and characterization of the sheep alpha-TTP gene and its expression in response to different vitamin e status. *Gene*, 494, 225-230.
- Liu, K., Luo, H., Zuo, Z., Jia, H., Zhang, Y., Chang, Y., & Jiao, L. (2014). Regulation of sheep α -TTP by dietary vitamin E and preparation of monoclonal antibody for sheep α -TTP. *Gene*, 540, 110-116.
- Londoño, J. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. *Desarrollo y transversalidad*, Cap. 9 Pt. III, 129-162, Medellín, Colombia, Corporación

- Loaysa Carrión, S. (2011). Control de calidad de la carne de bovino en el mercado municipal de la ciudad de Piñas provincia de El Oro (Tesis de grado). Universidad Nacional de Loja, Ecuador. Recuperada de <http://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/5387>
- Luciano, G, Moloney, A.P., Priolo, A., Röhrle, F.T., Vasta, V., Biondi, L., López-Andrés, P., Grasso, S., & Monahan, F.J. (2011). Vitamin E and polyunsaturated fatty acids in bovine muscle and the oxidative stability of beef from cattle receiving grass or concentrate-based rations. *J. Anim. Sci.*, 89, 3759-3768. doi:10.2527/jas.2010-3795.
- Lynch, M.P., Kerry, J.P., Buckley, D.J., Faustman, C. & Morrissey, P.A. (1999). Effect of dietary vitamin E supplementation on the colour and lipid stability of fresh, frozen and vacuum-packaged beef. *Meat Science*, 52, 95-99.
- Mahecha, L., Nuernberg, K., Nuernberg, G., Ender, K., Hagemann, E. & Dannenberger D. (2009). Effects of diet and storage on fatty acid profile, micronutrients and quality of muscle from German Simmental bulls. *Meat Science*, 82, 365–371.
- Mahecha, L., Dannenberger, D., Nuernberg, K., Nuernberg, G., Hagemann, E. & Martin, J. (2010). Relationship between lipid peroxidation and antioxidant status in the muscle of german Holstein bulls fed n-3 and n-6 PUFA-enriched diets. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 8407–8413.
- Mahecha, L., Nuernberg, K., Nuernberg, G., Martin, J., Hubbermann, E.M., Knoeller, S., Claeys, E., De Smet, S., & Dannenberger, D. (2011). Antioxidant enzyme activities and antioxidant capacity in *Longissimus* muscle from bulls fed diets rich in polyunsaturated fatty acids. *Food Chem.*, 127,379-386.
- Magalhães, L.M., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, J.L. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. Review. *Anal Chim Acta*, 613, 1-19.
- Manevich, Y. & Fisher, A.B. (2005). Peroxiredoxin 6, a 1-Cys peroxiredoxin, functions in antioxidant defense and lung phospholipid metabolism. *Free Radic Biol Med.*, 38(11), 1422-1432.
- Mardones, P. & Rigotti, A. (2004). Cellular mechanisms of vitamin E uptake: relevance in α -tocopherol metabolism and potential implications for disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15, 252-260. doi:10.1016/j.jnutbio.2004.02.006.
- Mercier, Y., Gatellier, P., & Renner, M. (2004). Lipid and protein oxidation in vitro, and antioxidant potential in meat from Charolais cows finished on pasture or mixed diet. *Meat Science*, 66, 467–473.

- Morley, S., Panagabko, C., Shineman, D., Mani, B., Stocker, A., Atkinson, J., & Manor, D. (2004). Molecular determinants of heritable vitamin E deficiency. *Biochemistry*, 43(14), 4143-4149.
- Morley, S., Cross, V., Cecchini, M., Nava, P., Atkinson, J., & Manor, D. (2006). Utility of a Fluorescent vitamin E analogue as a probe for tocopherol transfer protein activity. *Biochemistry*, 45(4), 1075-1081.
- Morrissey, P.A., Buckley, D.J., Sheehy, P.J.A., & Monahan, F.J. (1994). Vitamin E and meat quality. *Proceedings of the Nutrition Society*, 53, 289–295.
- Morrissey, P.A., Sheehy, P.J.A., Galvin, K., Kerry, J.P. & Buckley, D.J. (1998). Lipid stability in meat and meat products. *Meat Science*, 49, Supl. I, S73-S86.
- Nanni, M. (2007) Desarrollo de una nueva tecnología diagnóstica para la detección del Virus de la Fiebre Aftosa y su importancia en la infección aguda (Tesis doctoral). Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). GenBank. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- Nuernberg, K., Dannenberger, D., Nuernberg, G., Ender, K., Voigt, J., Scollan, N.D., Wood, J.D., Nute, G.R., & Richardson, R.I. (2005). Effect of a grass-based and a concentrate feeding system on meat quality characteristics and fatty acid composition of longissimus muscle in different cattle breeds. *Livestock Production Science*, 94, 137-147.
- Noy, N. (2015). Signaling by retinol and its serum binding protein. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*, 93, 3–7.
- O’Sullivan, A., O’Sullivan, K., Galvin, K., Moloney, A. P., Troy, D. J., & Kerry, J. P. (2002). Grass silage versus maize silage effects on retail packaged beef quality. *Journal of Animal Science*, 80, 1556–1563.
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Deemer, E.K. (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *J Agric Food Chem.*, 50(11), 3122-3128.
- Ouali, A., Herrera-Mendez, C.H., Coulis, G., Becila, S., Boudjellal, A., Aubry, L. & Sentandreu, M.A. (2006). Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Science*, 74, 44-58.
- Peng, Ch.L., Lin, Z.F., Su, Y.Z., Lin, G.Z., Dou, H.Y., & Zhao, Ch.X. (2006). The antioxidative function of lutein: electron spin resonance studies and chemical detection. *Functional Plant Biology*, 33(9) 839–846. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1071/FP06013>

- Pensel, N.A., Insani, E.M., Descalzo, A.M. y Rossetti, L. (2002). Antioxidantes. Estudios de Calidad. *Idia XXI*, 2(2), 151-156. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina. Recuperado de: www.produccion-animal.com.ar/...tecnica/.../66-antioxidantes.pdf
- Pereira, A.S.C., Sobral, P.J.A., Leme, P.R. & Silva, S.L. (2008). Physical and chemical characteristics of frozen ground beef and aged beef meat from *Bos indicus* steers supplemented with α -tocopherol acetate. *Ital. J. Food Sci.*, 3(20), 419-425.
- Pérez Jiménez, J. (2007) Efecto de fibra antioxidante de uva en el status antioxidante y parámetros de riesgo cardiovascular en humanos (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Madrid, España. Recuperada de: https://repositorio.uam.es/bitstream/.../6494_perez_jimenez_jara.pdf
- Pighin, D., Pazos, A., Chamorro, V., Paschetta, F., Cunzolo, S., Godoy, F., Messina, V., Pordomingo, A. y Grigione, G. (2016). A contribution of beef to human health: a review of the role of the animal production systems. *The Scientific World Journal*, 2016, 1-10. Hindawi Publishing Corporation. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8681491>
- Ponti, D. (2016). Principales Indicadores del Sector Bovino. Indicadores bovinos mensuales, abril 2016. Ministerio de Agroindustria. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, Argentina. Dirección Nacional de Estudios y Análisis Económico del Sector Pecuario. Recuperado de: <http://www.senasa.gov.ar/cadena-animal/bovinos-y-bubalinos/informacion/informes-y-estadisticas>
- Pordomingo, A. (2009). Argentinean beef systems. *Stockman Grassfarmer Magazine*, 3, 1–8.
- Pouzo, L.B., Descalzo, A.M., Zaritzky, N.E., Rossetti, L., & Pavan, E. (2016). Antioxidant status, lipid and color stability of aged beef from grazing steers supplemented with corn grain and increasing levels of flaxseed. *Meat Science*, 111, 1–8.
- PricewaterhouseCoopers International Limited. PwC Argentina Research & Knowledge Center. (2012). Ganadería Bovina. Análisis sectorial N°4, 26 pp. Rosario, Argentina. Recuperado de: www.pwc.com/ar
- Prior, R.L., Wu, X. & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4290-4302.
- Pulido, R., Bravo, L. & Saura-Calixto F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/ antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3396-3402.
- Qiagen. RNA protocols. Chap. 3, pp 45-67. Recuperado de: www.qiagen.com/literature/.../1017778_benchguide_chap_3.pdf

- Qian, J., Morley, S., Wilson, K., Nava, P., Atkinson, J., & Manor, D. (2005). Intracellular trafficking of vitamin E in hepatocytes: the role of tocopherol transfer protein. *Journal of Lipid Research*, 46, 2072-2082.
- Ramos, M.V. (2010). Comparación de dos sistemas de cromatografía HPLC para la cuantificación de vitaminas antioxidantes en carne. Residencia profesional, Ingeniería en Alimentos. Facultad de Agronomía y Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Morón, Buenos Aires. Director: Descalzo, A.M.
- Realini, C.E., Duckett, S.K., Brito, G.W., Dalla Rizza, M. y De Mattos, D. (2004). Effect of pasture vs. concentrate feeding with or without antioxidants on carcass characteristics, fatty acid composition, and quality of Uruguayan beef. *Meat Science*, 66, 567-577.
- Reboul, E., Thap, S., Tourniaire, F., Andre, M., Juhel, C., Morange, S., Amiot, M.J., Lairon, D., & Borel, P. (2007). Differential effect of dietary antioxidant classes (carotenoids, polyphenols, vitamins C and E) on lutein absorption. *British Journal of Nutrition*, 97, 440-446.
- Reboul, E. & Borel, P. (2011). Proteins involved in uptake, intracellular transport and basolateral secretion of fat-soluble vitamins and carotenoids by mammalian enterocytes. *Progress in Lipid Research*, 50, 388-402.
- Reboul, E. (2013). Absorption of vitamin A and carotenoids by the enterocyte: focus on transport proteins. *Nutrients*, 5, 3563-3581.
- Renand, G., Picard, B., Touraille, C., Berge, P., & Lepetit, J. (2001). Relationships between muscle characteristics and meat quality traits of young Charolais bulls. *Meat Science*, 59, 49-60.
- Renerre, M., Dumon, F. y Gatellier, P. (1996). Antioxidant enzyme activities in beef in relation to oxidation of lipid and myoglobin. *Meat Science*, 43(2), 111-121.
- Rhee, S.G., Chae, H.Z., & Kim, K. (2005). Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med.*, 38(12), 1543-1552.
- Rodríguez-Amaya, D. B., Kimura, M., Godoy, H. T., & Amaya-Farfan, J. (2008). Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 445-463.
- Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual* (3th ed.). Vol. 1, Chap 5, 7 y 8. Laurel Hollow, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sasaki K., Mitsumoto M. y Kawabata K. (2001). Relationship between lipid peroxidation and fat content in Japanese black beef Longissimus muscle during storage. *Meat Science*, 59, 407-410.

- Saura-Calixto, F. & Goñi, I. (2006). Antioxidant capacity of the spanish mediterranean diet. *Food Chemistry*, 94, 442-447.
- Schremmer, B., Manevich, Y., Feinstein, S.I., & Fisher, A.B. (2007). Peroxiredoxins in the lung with emphasis on peroxiredoxin VI. *Subcell Biochem.*, 44, 317-344.
- Schor, A., Cossu, M.E., Picallo, A., Martínez Ferrer J., Grigera Naón J.J. y Colombatto D. (2008). Nutritional and eating quality of Argentinean beef: A review. *Meat Science*, 79, 408–422.
- Scollan, N., Hocquette, J.F., Nuernberg, K., Dannenberger, D., Richardson, I., & Moloney, A. (2006). Innovations in beef production systems that enhance the nutritional and health value of beef lipids and their relationship with meat quality. *Meat Science*, 74, 17-33.
- Serpeloni, J.M., Syllos Cólus, I.M., Singaretti de Oliveira, F., Ferro Aissa, A., Zerlotti Mercadante, A., Pires Bianchi, M.L., Greggi Antunes, L.M.(2014). Diet carotenoid lutein modulates the expression of genes related to oxygen transporters and decreases DNA damage and oxidative stress in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 70, 205–213.
- Shahidi, F. & Zhong, Y. (2005). Lipid Oxidation: measurement methods. En Fereidoon Shahidi ed., *Bailey's industrial oil and fat products*, 6a. Edition (pp. 357-385). Canadá: John Wiley & Sons. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/228050722>
- Shaw, H.M., & Huang, C.J. (1998). Liver α -tocopherol transfer protein and its mRNA are differentially altered by dietary vitamin E deficiency and protein insufficiency in rats. *The Journal of Nutrition*, 128, 2348-2354.
- Spuch, A.R. y Judis, M.A. (2004) Estudio de la calidad nutricional y susceptibilidad oxidativa de *Ciprinus carpio* cultivados en la región centrochaqueña. Facultad de Agroindustrias, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina. Recuperado de <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/com2004/8-Exactas/E-075.pdf>
- Stahl, W., & Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24, 345-351.
- Stahl, W., & Sies, H. (2005). Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1740, 101– 107.
- Stipanuk, M. H. (2000). Biochemical and physiological aspects of human nutrition. Philadelphia: Saunders Company. Cap 25, pag 599-618.
- Sudre, K., Leroux, C., Cassar-Malek, I., Hocquette, J.F., & Martin, P. (2005). Short communication: A collection of bovine cDNA probes for gene expression profiling in muscle. *Molecular and Cellular Probes*, 19(1), 61-70.

- Sujak, A., Okulski, W., & Gruszecki, W. I. (2000). Organisation of xanthophyll pigments lutein and zeaxanthin in lipid membranes formed with dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1509, 255-263.
- Takahashi, k., Takisawa, S., Shimokado, K., Kono, N., Arai, H., & Ishigami, A. (2016). Age-related changes of vitamin E: α -tocopherol levels in plasma and various tissues of mice and hepatic α -tocopherol transfer protein. *Eur. J. Nutr.*, 11 pp. DOI 10.1007/s00394-016-1182-4.
- Teira, G., Perolo, F., Bonato, P. y Tisocco, O. (2006). Calidad de carne bovina. Aspectos nutritivos y organolépticos relacionados con sistemas de alimentación y prácticas de elaboración. *Ciencia, Docencia y Tecnología*, XVII (33), 173-193.
- Terrasa, A. M. (2012). Alternativas tecnológicas aplicables al desarrollo y conservación de productos cárnicos cocidos (patés) durante el almacenamiento refrigerado (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Recuperada de <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/5/>
- Torre, C. y Caja, G. (1998). Utilización de aditivos en rumiantes: vitaminas y aminoácidos protegidos. XIV Curso de Especialización. Avances en Nutrición y Alimentación Animal. Fundación española para el desarrollo de la nutrición animal (FEDNA), 98, Cap IV, 67-94. Disponible en <http://fundacionfedna.org/sites/default/files/98CAPIV.pdf>
- Traber, M.G., Elsner, A., & Brigelius-Flohe, R. (1998). Synthetic as compared with natural vitamin E is preferentially excreted as alpha-CEHC in human urine: studies using deuterated alpha-tocopheryl acetates. *FEBS Lett.*, 437(1-2), 145-148.
- Traber, M.G. (2007). Vitamin E regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Nutr.*, 27, 347-362. doi: 10.1146/annurev.nutr.27.061406.093819. Recuperado de <http://nutr.annualreviews.org>
- Ulatowski, L. & Manor, D. (2010). Expression of the tocopherol transfer protein is regulated by oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 49, S136.
- Ulatowski, L., Dreussi, C., Noy, N., Barnholtz-Sloan, J., Klein, E., & Manor, D. (2012). Expression of the α -tocopherol transfer protein gene is regulated by oxidative stress and common single-nucleotide polymorphisms. *Free Radic Biol Med*, 53, 2318-2326.
- Villamor, E. & Fawzi, W.W. (2005). Effects of Vitamin A Supplementation on Immune Responses and Correlation with Clinical Outcomes. *Clinical Microbiology Reviews*, July 2005, 446-464.
- Walshe, B.E., Sheehan, E.M., Delahunty, C.M., Morrissey, P.A., Kerry, J.P. (2006). Composition, sensory and shelf life stability analyses of Longissimus dorsi muscle from steers reared under organic and conventional production systems. *Meat Science*, 73, 319-325.

- Warren, H.E., Scollan, N.D., Nute, G.R., Hughes, S.I., Wood, J.D., & Richardson, R.I. (2008). Effects of breed and a concentrate or grass silage diet on beef quality in cattle of 3 ages. II: Meat stability and flavor. *Meat Science*, 78, 270-278.
- Williams, P.G. (2007). Nutritional composition of red meat. *Nutrition & Dietetics*, 64, suppl. 4, S113–S119. Recuperado de <http://ro.uow.edu.au/hbspapers/48>. DOI: 10.1111/j.1747-0080.2007.00197.x
- Wood, J.D., Enser, M., Fisher, A.V., Nute, G.R., Sheard, P.R., Richardson, R.I., Hughes, S.I., & Whittington, F.M. (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Science* 78, 343–358.
- Xu , C.Z., Wang, H.F., Yang, J.Y., Wang, J.H., Duan, Z.Y., Wang, C., Liu, J.X., & Lao, Y. (2014). Effects of feeding lutein on production performance, antioxidative status, and milk quality of high-yielding dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 97, 7144–7150. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-8276>
- Yamauchi, J., Iwamoto, T., Kida, S., Masushige, S., Yamada, K., & Esashi, T. (2001). Tocopherol-associated protein is a ligand-dependent transcriptional activator. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 285(2), 295–299. doi:10.1006/bbrc.2001.5162.
- Yang, A., Lanari, M.C., Brewster, M. & Tume, R.K. (2002a). Lipid stability and meat colour of beef from pasture- and grain-fed cattle with or without vitamin E supplement. *Meat Science*, 60, 41–50.
- Yang, A., Brewster, M.J., Lanari, M.C. & Tume, R.K. (2002b). Effect of vitamin E supplementation on α -tocopherol and β -carotene concentrations in tissues from pasture- and grain-fed cattle. *Meat Science*, 60, 35–40.
- Zhang, Z., Han, S., Wang, H., & Wang, T. (2014). Lutein extends the lifespan of *Drosophila melanogaster*. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 58, 153–159.
- Zingg, J.M. (2007). Vitamin E: An overview of major research directions. *Molecular Aspects of Medicine*, 28, 400–422.
- Zingg, J.M., Kempna, P., Paris, M., Reiter, E., Villacorta, L., Cipollone, R., Munteanu, A., De Pascale, C., Menini, S., Cueff , A., Arock, M., Azzi, A., & Ricciarelli, R. (2008). Characterization of three human sec14p-like proteins: a-Tocopherol transport activity and expression pattern in tissues. *Biochimie*, 90, 1703-1715.
- Zuo, Z., Luo, H., Liu, K., Jia, H., Zhang, Y., Jiao, L., & Chang, Y. (2014). Dietary vitamin E affects α -TTP mRNA levels in different tissues of the Tan sheep. *Gene*, 541, 1-7.

10. Anexo

10.1. Resultados

10.1.1. Contenido de vitaminas antioxidantes en LD por HPLC.

Tabla 20

Resultados de las dos muestras de LD de cada animal para los antioxidantes determinados

	Muestra	Retinol µg/g carne	γ-tocoferol µg/g carne	α-tocoferol µg/g carne	β-caroteno µg/g carne	Luteína µg/g carne
Dieta Pasto	1pa	0,07912632	0,09108014	2,05535041	0,17324747	0,05590433
	1pb	0,09347895	0,09912892	3,00289106	0,25358838	0,07382661
	3pa	0,12675263	0,3469338	2,79774878	0,03249495	0,07285501
	3pb	0,08260175	0,33597561	2,22156992	0,03543687	0,05979073
	6pa	0,08710344	0,17566783	1,68610772	0,10293035	0,03114101
	6pb	0,11852522	0,25791231	2,54152354	0,14499684	0,03517377
	8pa	0,10873255	0,20069582	1,79080056	0,17016595	0,04980019
	8pb	0,12168636	0,20069582	1,88964742	0,20454803	0,05028828
	9pa	0,05629073	0,11199602	2,49604364	0,10671511	0,04125866
	9pb	0,06654135	0,14683922	3,03858138	0,13272779	0,04363808
	11pa	0,07132474	0,32974828	2,55525635	0,22441249	0,07530277
	11pb	0,06531686	0,11167603	2,29911731	0,18363997	0,06618163
Dieta Grano	2ca	0,05724598	0,08062936	1,36431318	0,04935027	0,023
	2cb	0,06536915	0,11197009	2,10122883	0,06734533	0,023
	4ca	0,05100351	0,16372822	0,93093984	0,02268182	0,023
	4cb	0,04719474	0,27146341	1,19766748	0,01988889	0,023
	5ca	0,06504737	0,32705575	2,0794561	0,10902525	0,04913303
	5cb	0,0651	0,30616725	0,9645374	0,09753535	0,04272048
	7ca	0,08146491	0,20854143	1,75701707	0,06892424	0,0612855
	7cb	0,06418421	0,20854143	0,80530976	0,05303283	0,0590284
	10ca	0,07270351	0,1639547	1,72691545	0,05727778	0,06298954
	10cb	0,10217544	0,19391986	2,24199675	0,08645455	0,07890882
	12ca	0,09031686	0,2152279	2,08900033	0,07178417	0,023
	12cb	0,09453634	0,25129773	2,41414136	0,07253917	0,023

10.1.2. Capacidad antioxidante (AOC) determinada por el ensayo FRAP.

Tabla 21

Resultados de dos muestras de cada animal para la capacidad antioxidante determinada por FRAP en extracto lipídico de músculo LD

		FRAP	
Dieta	Muestra	Fracción lipídica lectura	Fracción lipídica Eq. de Fe (II) (mM/g de músculo)
Pasto	1a	0,02994	8,7
	1b	0,02942	8,6
	3a	0,03482	9,7
	3b	0,03491	9,7
	6a	0,0128	5,1
	6b	0,02171	7,0
	8a	0,03218	9,1
	8b	0,01889	6,4
	9a	0,02456	7,6
	9b	0,02414	7,5
	11a	0,02301	7,3
11b	0,03363	9,4	
Grano	2a	0,0479	12,4
	2b	0,04178	11,1
	4a	0,04232	11,2
	4b	0,04778	12,4
	5a	0,02586	7,8
	5b	0,02766	8,2
	7a	0,05	12,8
	7b	0,05175	13,2
	10a	0,04301	11,4
	10b	0,005914	3,7
	12a	0,02711	8,1
	12b	0,02308	7,3

Tabla 22

Resultados de dos muestras de cada animal para la capacidad antioxidante total determinada por FRAP en extracto acuoso de músculo LD

FRAP			
Dieta	Muestra	Fracción acuosa lectura	Fracción acuosa Eq. de Fe (II) (mM/g de músculo)
Pasto	1a	0,3816	13,8
	1b	0,3646	13,2
	3a	0,4355	15,7
	3b	0,4219	15,2
	6a	0,3981	14,4
	6b	0,3738	13,5
	8a	0,3158	11,4
	8b	0,3161	11,4
	9a	0,3931	14,2
	9b	0,3919	14,2
	11a	0,3217	11,6
	11b	0,2852	10,3
Grano	2a	0,448	16,2
	2b	0,4652	16,8
	4a	0,366	13,2
	4b	0,3529	12,8
	5a	0,4037	14,6
	5b	0,3766	13,6
	7a	0,3955	14,3
	7b	0,3253	11,8
	10a	0,3858	13,9

10.1.3. Expresión de genes relacionados con la incorporación de vitaminas antioxidantes en el tejido muscular.

Tabla 23

Valores promedios obtenidos de los productos amplificados en muestras de LD para cada par de cebadores y ARNm 18S.

Dieta	Muestra	CRBP1	α-TTP	AOX	α-TAP	18S
Pasto	1	0,8792	0,3340	0,6413	0,4798	0,6824
	3	0,9164	0,2628	0,8048	0,6596	0,5754
	6	0,6601	0,2189	0,6567	0,2963	0,5481
	8	0,7584	0,5688	0,6337	0,4687	0,7452
	9	0,8943	0,2381	1,0000	0,6306	0,9985
	11	0,5947	0,000	0,7251	0,5728	0,5998
Grano	2	0,4431	0,3333	0,7069	0,5031	0,5455
	4	0,7139	0,4647	0,7370	0,4652	0,4424
	5	0,4897	0,4790	0,5271	0,4633	0,7520
	7	0,9216	1,0000	0,9084	0,8109	0,5028
	10	0,4756	0,7555	0,5895	0,9989	0,6362
	12	0,5687	0,3095	0,7302	0,9602	0,6090

10.1.4. Análisis estadístico

α -tocoferol

Pruebas de normalidad

Tipo de dieta		Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
a-tocoferol	Pasto	,939	6	,650
	Corral	,983	6	,967

Estadísticas de grupo

Tipo de dieta		N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
a-tocoferol	Pasto	6	2,364553174	,3322850421	,1356548004
	Corral	6	1,639376962	,4416758483	,1803134100

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
a-tocoferol	Se asumen varianzas iguales	,647	,440	3,214	10	,009	,7251762120	,2256438581	,2224103651	1,2279420589
	No se asumen varianzas iguales			3,214	9,287	,010	,7251762120	,2256438581	,2171265107	1,2332259133

γ-tocoferol

Pruebas de normalidad

Tipo de dieta		Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
g-tocoferol	Pasto	,937	6	,635
	Corral	,962	6	,837

Estadísticas de grupo

Tipo de dieta	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
g-tocoferol Pasto	6	,200695815	,0856771195	,0349775376
g-tocoferol Corral	6	,208541428	,0718983653	,0293523847

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
g-tocoferol	Se asumen varianzas iguales	,145	,712	-,172	10	,867	-,0078456127	,0456616976	-,1095862150	,0938949897
	No se asumen varianzas iguales			-,172	9,708	,867	-,0078456127	,0456616976	-,1100031577	,0943119324

β-caroteno

Pruebas de normalidad

Tipo de dieta	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
b-caroteno Pasto	,896	6	,352
Corral	,937	6	,638

Estadísticas de grupo

Tipo de dieta	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
b-caroteno Pasto	6	,147075350	,0683278654	,0278947342
Corral	6	,064653304	,0265875470	,0108543206

Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
								Inferior	Superior
b-caroteno Se asumen varianzas iguales	5,670	,039	2,754	10	,020	,0824220463	,0299321311	,0157291021	,1491149906
No se asumen varianzas iguales			2,754	6,480	,031	,0824220463	,0299321311	,0104764382	,1543676544

Retinol

Pruebas de normalidad

Tipo de dieta		Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
Retinol	Pasto	,924	6	,533
	Corral	,960	6	,821

Estadísticas de grupo

Tipo de dieta		N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
Retinol	Pasto	6	,089790074	,0215201299	,0087855562
	Corral	6	,071361835	,0163744433	,0066848385

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
Retinol	Se asumen varianzas iguales	,943	,354	1,669	10	,126	,0184282393	,0110396134	-,0061695522	,0430260309
	No se asumen varianzas iguales			1,669	9,336	,128	,0184282393	,0110396134	-,0064087168	,0432651955

Luteína

Pruebas de normalidad

Tipo de dieta		Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
luteína	Pasto	,915	6	,469
	Corral	,829	6	,105

Estadísticas de grupo

Tipo de dieta		N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
luteína	Pasto	6	,054596755	,0150437952	,0061416037
	Corral	6	,041005481	,0212613018	,0086798901

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
luteína	Se asumen varianzas iguales	1,762	,214	1,278	10	,230	,0135912738	,0106329576	-,0101004322	,0372829799
	No se asumen varianzas iguales			1,278	9,003	,233	,0135912738	,0106329576	-,0104608761	,0376434237

FRAP (fracción lipídica)

Pruebas de normalidad

Tipo de dieta		Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
FRAP fraccion lipidica (milimolar)	Pasto	,979	6	,948
	Corral	,814	6	,079

Estadísticas de grupo

Tipo de dieta		N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
FRAP fraccion lipidica (milimolar)	Pasto	6	8,0067	1,22037	,49821
	Corral	6	9,9717	2,47623	1,01092

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
FRAP fraccion lipidica (milimolar)	Se asumen varianzas iguales	13,775	,004	-1,744	10	,112	-1,96500	1,12702	-4,47616	,54616
	No se asumen varianzas iguales			-1,744	7,294	,123	-1,96500	1,12702	-4,60839	,67839

FRAP (fracción acuosa)

Pruebas de normalidad

Tipo de dieta	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
FRAP fraccion Pasto	,925	6	,545
acuosa (milimolar) Corral	,951	6	,749

Estadísticas de grupo

Tipo de dieta	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
FRAP fraccion Pasto	6	13,2533	1,73441	,70807
acuosa (milimolar) Corral	6	13,5567	1,84617	,75370

Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
								Inferior	Superior
FRAP fraccion acuosa (milimolar)	,028	,870	-,293	10	,775	-,30333	1,03413	-2,60752	2,00085
				-,293	9,961	,775	-,30333	1,03413	-2,60873

FRAP (extractos pasto)

Pruebas de normalidad

Extracto (pasto)		Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
mM/g	Hidrofílico	,925	6	,545
	Lipofílico	,979	6	,948

Estadísticas de grupo

Extracto (pasto)		N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
mM/g	Hidrofílico	6	13,2533	1,73441	,70807
	Lipofílico	6	8,0067	1,22037	,49821

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
mM/g	Se asumen varianzas iguales	1,093	,320	6,060	10	,000	5,24667	,86578	3,31758	7,17575
	No se asumen varianzas iguales			6,060	8,976	,000	5,24667	,86578	3,28734	7,20600

FRAP (extractos corral)

Pruebas de normalidad

		Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
Extracto (corral)	mM/g Hidrofilico	,951	6	,749
	Lipofilico	,814	6	,079

Estadísticas de grupo

Extracto (corral)	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
mM/g Hidrofilico	6	13,5567	1,84617	,75370
Lipofilico	6	9,9717	2,47623	1,01092

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
mM/g	Se asumen varianzas iguales	3,175	,105	2,843	10	,017	3,58500	1,26096	,77541	6,39459
	No se asumen varianzas iguales			2,843	9,246	,019	3,58500	1,26096	,74406	6,42594

TBARS basal

Pruebas de normalidad

Tipo de dieta		Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
TBARS basal	Pasto	,845	6	,144
	Corral	,936	6	,626

Estadísticas de grupo

Tipo de dieta		N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
TBARS basal	Pasto	6	,14667	,056358	,023008
	Corral	6	,20050	,101262	,041340

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
TBARS basal	Se asumen varianzas iguales	2,956	,116	-1,138	10	,282	-,053833	,047311	-,159250	,051583
	No se asumen varianzas iguales			-1,138	7,826	,289	-,053833	,047311	-,163356	,055689

TBARS inducido (0 min)

Pruebas de normalidad

Tipo de dieta		Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
TBARS inducido 0 min	Pasto	,852	6	,162
	Corral	,886	6	,298

Estadísticas de grupo

Tipo de dieta		N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
TBARS inducido 0 min	Pasto	6	,14117	,062694	,025595
	Corral	6	,22433	,131479	,053676

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
TBARS inducido 0 min	Se asumen varianzas iguales	2,770	,127	-1,399	10	,192	-,083167	,059466	-,215665	,049332
	No se asumen varianzas iguales			-1,399	7,162	,204	-,083167	,059466	-,223139	,056806

TBARS inducido (30 min)

Pruebas de normalidad

Tipo de dieta		Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
TBARS inducido 30 min	Pasto	,829	6	,105
	Corral	,887	6	,301

Estadísticas de grupo

Tipo de dieta		N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
TBARS inducido 30 min	Pasto	6	,22483	,149221	,060919
	Corral	6	,52460	,260819	,106479

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
TBARS inducido 30 min	Se asumen varianzas iguales	2,832	,123	-2,444	10	,035	-,299767	,122674	-,573102	-,026432
	No se asumen varianzas iguales			-2,444	7,957	,040	-,299767	,122674	-,582923	-,016610

Expresión de genes: CRBP1

Pruebas de Normalidad

Tipo de dieta		Shapiro-Wilk		Sig.
		Estadístico	gl	
RBP1/18s	Pasto	,927	6	,554
	Corral	,831	6	,109

Estadísticas de grupo

Tipo de dieta		N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
RBP1/18s	Pasto	6	1,165050	,2546048	,1039420
	Corral	6	1,098583	,4974107	,2030671

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
RBP1/18s	Se asumen varianzas iguales	5,025	,049	,291	10	,777	,0664667	,2281232	-,4418234	,5747567
	No se asumen varianzas iguales			,291	7,452	,779	,0664667	,2281232	-,4664004	,5993337

Expresión de genes: α -TTP

Pruebas de normalidad

Tipo de dieta	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
TTP/18s Pasto	,975	6	,925
Corral	,859	6	,186

Estadísticas de grupo

Tipo de dieta	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
TTP/18s Pasto	6	,391183	,2564254	,1046852
Corral	6	,997183	,5550588	,2266018

Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
								Inferior	Superior
TTP/18s Se asumen varianzas iguales	2,433	,150	-2,428	10	,036	-,6060000	,2496145	-1,1621757	-,0498243
No se asumen varianzas iguales			-2,428	7,041	,045	-,6060000	,2496145	-1,1955439	-,0164561

Expresión de genes: AOX2

Pruebas de normalidad

Tipo de dieta	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
AOX/18s Pasto	,952	6	,758
Corral	,963	6	,845

Estadísticas de grupo

Tipo de dieta	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
AOX/18s Pasto	6	1,099583	,2041527	,0833450
Corral	6	1,265850	,4224160	,1724506

Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
								Inferior	Superior
AOX/18s Se asumen varianzas iguales	2,386	,153	-,868	10	,406	-,1662667	,1915349	-,5930329	,2604996
No se asumen varianzas iguales			-,868	7,215	,413	-,1662667	,1915349	-,6164539	,2839206

Expresión de genes: α -TAP

Pruebas de normalidad

Tipo de dieta	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
TAP/18s Pasto	,873	6	,239
Corral	,855	6	,173

Estadísticas de grupo

Tipo de dieta	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
TAP/18s Pasto	6	,767617	,2332915	,0952409
Corral	6	1,224933	,4209147	,1718377

Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
								Inferior	Superior
TAP/18s Se asumen varianzas iguales	5,628	,039	-2,328	10	,042	-,4573167	,1964663	-,8950709	-,0195624
No se asumen varianzas iguales			-2,328	7,807	,049	-,4573167	,1964663	-,9123255	-,0023079

