

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA



Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica



Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria.

PROYECTO FIN DE CARRERA

“DURACIÓN DEL TRANSPORTE PREVIO AL SACRIFICIO EN PORCINO. EFECTO SOBRE PARÁMETROS INDICADORES DE ESTRÉS “

Alumna: Marta García Celdrán.

Titulación: Ingeniero Agrónomo.

Directores: D^a. Eva Armero Ibáñez.

D. Guillermo Ramis Vidal.

Cartagena, Junio del 2008.

1.- ANTECEDENTES.....	1
1.1. Producción.....	2
1.1.1. Producción de cerdo de cebo en la Unión Europea y en España....	2
1.1.2. Sistemas de producción porcina en España y razas asociadas.....	4
1.2. Bienestar animal.....	6
1.2.1. Indicadores de bienestar animal.....	7
1.2.1.1. Indicadores de estrés a corto plazo.....	7
1.2.1.2. Indicadores de estrés a largo plazo.....	12
1.2.2. Bienestar animal en el transporte del porcino.....	14
1.2.3. Bienestar en el sacrificio.....	21
1.2.4. Relación entre métodos de aturdimiento y la calidad de la carne.....	23
1.2.5. Efecto del gen del Halotano.....	25
 2.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	 32
2.1. Justificación.....	33
2.2. Objetivos.....	34
 3.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	 35
3.1. Material animal.....	36
3.2. Determinación del pH.....	38
3.3. Pedidas por oreo.....	38
3.4. Determinación de la relación neutrofilos/ linfocitos.....	38
3.5. Diagnóstico del gen del Halotano.....	39
3.6. Determinación de la Proteína de Fase Aguda (PFA) en suero sanguíneo...43	
3.6.1. Determinación de la Proteína C- Reactiva (CRP) y Amiloide.....	44
3.6.2. Determinación de Haptoglobina.....	45
3.7. Análisis estadísticos.....	46

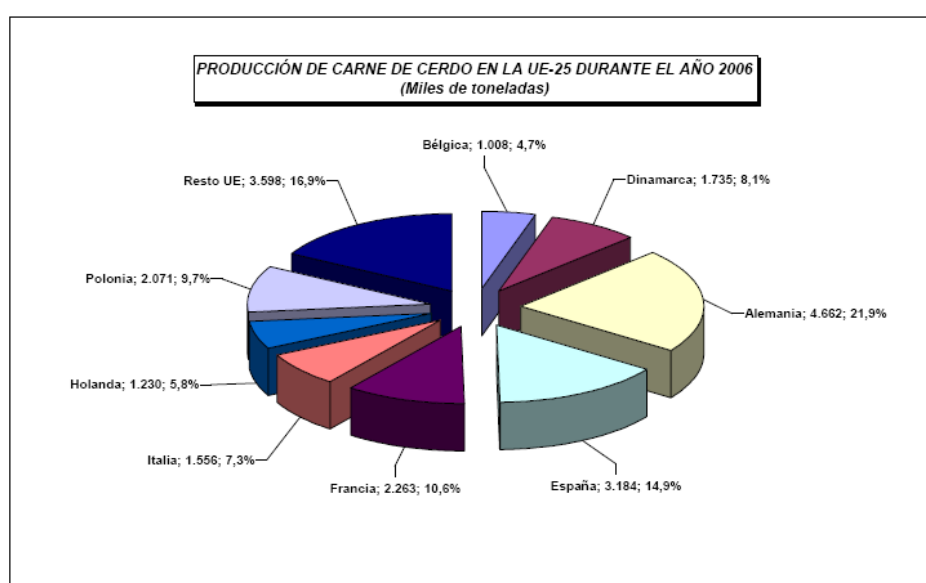
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
4.1. Frecuencia del gen del Halotano.....	48
4.2. Efecto de la duración del transporte, del sexo y del gen del halotano sobre la clasificación de la canal.....	50
4.3. Calidad de canal.....	50
4.3.1. Efecto de la duración del transporte.....	50
4.3.2. Efecto del sexo, del gen del halotano y de la clasificación de la canal.....	51
4.4. Calidad de carne.....	52
4.4.1. Efecto de la duración del transporte.....	53
4.4.2. Efecto del sexo.....	55
4.4.3. Efecto del gen del Halotano.....	56
4.4.4. Efecto de la clasificación de la canal.....	56
4.5. Relación neutrofilos/ linfocitos.....	57
4.5.1. Efecto de la duración del transporte.....	59
4.5.2. Efecto del sexo.....	59
4.5.3. Efecto del gen del Halotano.....	60
4.5.4. Efecto de la clasificación de la canal.....	60
4.6. Proteínas de fase aguda.....	61
4.6.1. Proteína C- reactiva.....	62
4.6.2. Amiloide A-sérico.....	63
4.6.3. Haptoglobina.....	64
5.- CONCLUSIONES.....	66
6.- BIBLIOGRAFÍA.....	67

1. Antecedentes

1.1. Producción.

1.1.1. Producción de cerdo de cebo en la Unión Europea y en España.

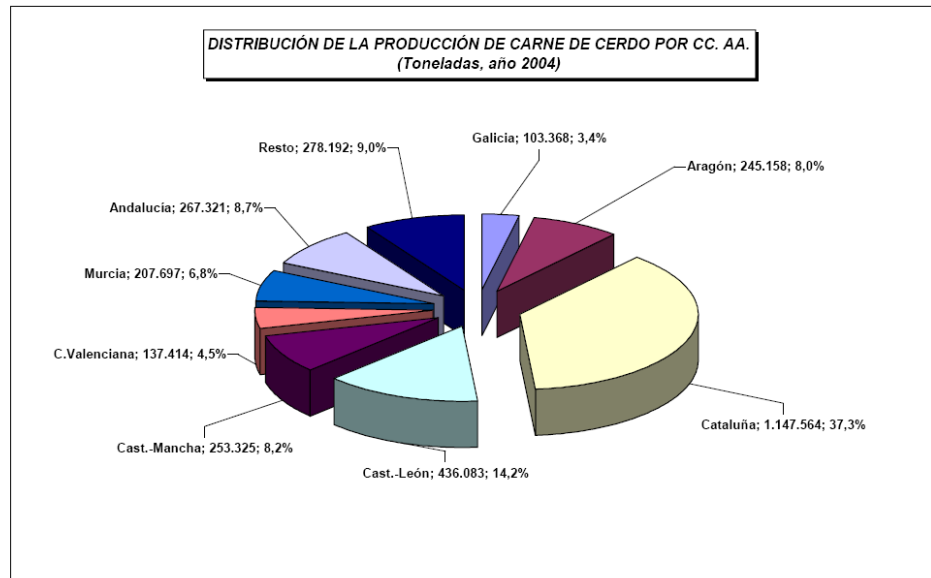
La actividad ganadera aporta en España en torno a un 40% de la producción final agraria (Fuente M.A.P.A 2006). Dentro de la ganadería el sector porcino es el primero de nuestro país con una producción anual que supone más de 4.000 millones de euros al año, lo que le coloca como el segundo productor de Europa de los 27 por debajo solo de Alemania (Figura1).



Fuente : Comisión de la Unión Europea.
Elaboración : S.G. Mercados Exteriores y Producciones Porcina, Avícola y Otras.

Figura1: Producción de carne de cerdo en la UE.

Dentro de España, la Región de Murcia es la sexta comunidad autónoma en términos de producción de carne de cerdo (Figura 2). La distribución del ganado porcino en la región de Murcia se caracteriza por la alta concentración de los animales de la especie en un reducido número de municipios siendo Lorca, Murcia y Fuente Álamo los que albergan la mayor parte de los efectivos de porcino. Además, hay que tener en cuenta que la Región de Murcia es una comunidad uniprovincial, situándose, en la segunda provincia con mayor censo porcino después de Lleida, y la tercera en producción de carne tras Barcelona y Girona (MAPA, 2003).



Fuente : S.G. Estadísticas Agroalimentarias.
Elaboración : S.G. Mercados Exteriores y Producciones Porcina, Avícola y Otras.

Figura 2: Distribución de la producción de carne de cerdo por CC.AA.

Dentro de la Región de Murcia en contribución a la Producción Final Ganadera de las distintas especies se obtiene en el año 2003 una aportación del porcino del 61,5%, de la carne de ovino y de caprino del 15,1%, de la carne de pollo 6,9%, de la carne de vacuno 5,7%, de la leche de cabra 2,5% y de la leche de vaca 2,4% (figura 3).

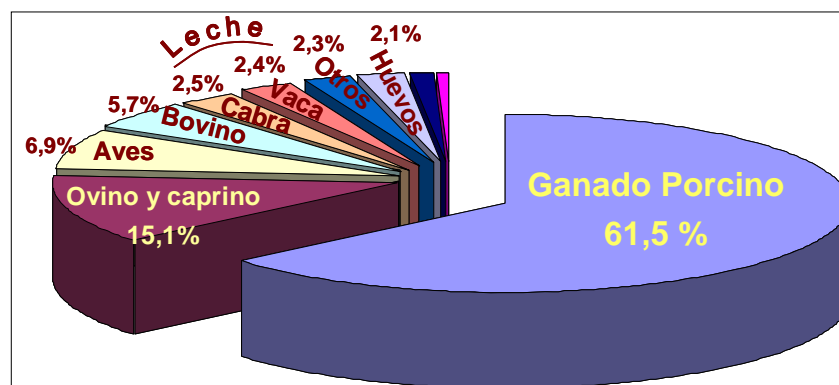


Figura 3. Contribución a la PFG en la Región de Murcia de las especies ganaderas en el año 2003.

1.1.2. Sistemas de producción porcina en España y razas asociadas.

Clásicamente, se consideran tres sistemas de explotación: Intensivo, extensivo y semi-extensivo, dentro de cada uno de ellos caben numerosas variantes o modalidades que responden a necesidades o finalidades concretas.

Sistema extensivo: Constituye un sistema tradicional de manejo basado en el aprovechamiento de los recursos naturales que, con nuevas aportaciones, ha permanecido a través del tiempo gracias a la adaptabilidad de determinadas razas. La explotación extensiva se caracteriza por utilizar animales de biotipos ambientales, normalmente razas rústicas y autóctonas, con un limitado poder de transformación y bajos índices reproductivos, no seleccionados para una única aptitud, en un medio desfavorable para el cultivo agrícola rentable y del que dependen en gran medida para su alimentación, con unas exigencias mínimas de capital y mano de obra especializada.

En España este sistema de explotación se lleva a cabo para el cerdo Ibérico, raza autóctona del suroeste peninsular (Castilla-León, Extremadura y norte de Andalucía) que transforma los productos que le ofrece su ecosistema de dehesa en carne de alta calidad. La dehesa se caracteriza por la coexistencia de encina, alcornoques y pastizales de gramíneas y leguminosas. La explotación se divide en cuatro fases, denominadas de cría (período de lactancia), recría, premontanera y montanera (aprovechamiento por parte del ganado porcino de las bellotas producidas por las especies forestales de la dehesa) o cebo.

El censo de cerdo ibérico representó en el año 2004 el 10,4% del censo nacional porcino (MAPA, 2004) concentrándose en Extremadura (54,2%, destaca Badajoz con el 47,3%) y Andalucía (36,9%). En Extremadura el 92,9% de su censo porcino es ibérico y en Andalucía lo es el 35,9%. Dentro de Castilla-León, hay que destacar Salamanca, donde se concentra el 97 % del censo y se produce el jamón curado con Denominación de Origen Protegida de Guijuelo.

1. Antecedentes.

Sistema intensivo: Supone una forma de explotación altamente tecnificada dirigida a situar al ganado en condiciones tales que permitan obtener de él altos rendimientos productivos en el menor tiempo posible. Se caracteriza por un control completo sobre los animales seleccionados para una determinada aptitud, aportando los medios necesarios como alimentación, mano de obra, instalaciones, etc para posibilitar maximizar las producciones.

El sistema de producción porcino mayoritario en España es intensivo, forma de producir que en principio puede considerarse estresante para los animales en cuanto son sometidos a ambientes inadecuados o se les priva de satisfacer necesidades determinadas. Las razas porcinas utilizadas en España en sistemas intensivos son importadas, si bien ya dentro del país pueden ser sometidas a un proceso de selección. En la producción porcina intensiva es frecuente usar hembras cruzadas y a veces también machos cruzados para aprovechar las ventajas que presentan esos animales cruzados y, por otro lado, porque de esta forma se abaratan los elevados costes de la mejora genética. Aunque en los cruces pueden usarse dos o tres razas, el cruce con tres razas es el más extendido en España. Las razas más usadas suelen ser Landrace y Large White (razas mejoradas de aptitud mixta) para producir hembra híbrida y como macho finalizador se usa un macho conformado como el Blanco Belga (raza especializada en producción muscular) y también cruces de razas conformadas (Pietrain, Blanco Belga, razas sintéticas formadas a partir de varias razas) con Duroc o Large White para evitar problemas asociados al estrés porcino.



Foto1: Pietrain, Large White y Landrace.

1.1. Bienestar animal.

El término de bienestar animal es difícil de definir. Es todo lo relativo al confort animal, y que está más allá de la mera falta de enfermedad, abarcando el completo estado de bienestar físico. Es la realidad que considera al animal en un estado de armonía en su ambiente y la forma por la cual reacciona frente a los problemas del medio, teniendo en cuenta su confort, su alojamiento, trato, cuidado, nutrición, prevención de enfermedades, cuidado responsable, manejo y eutanasia humanitaria cuando corresponda.

El bienestar animal tanto en las explotaciones ganaderas, como en el transporte del ganado y en el sacrificio, es una preocupación creciente en la sociedad actual (Herranz Herranz A; López Colmenero J. 2003) y las normativas europeas son cada vez más exigentes en este sentido (Real Decreto 1135/2002 relativo a las normas mínimas para la protección de cerdo; Reglamento 1/2005 del Consejo, de 22 de diciembre de 2004, relativo a la protección de los animales durante el transporte y las operaciones conexas; Real Decreto 54/1995, de 20 de enero, sobre protección de los animales en el momento de su sacrificio o matanza).

De esta normativa se pueden destacar varios puntos. Desde el punto de vista del manejo de animales, se establece, entre otras cuestiones, la edad de destete, las condiciones para llevar a cabo mutilaciones, o condiciones sobre el tipo de suelos utilizables; además, los animales deben tener acceso permanente a materiales para su manipulación. También se establece de un nivel máximo de ruido y mínimo de luz. Por otra parte, es obligatorio que el personal encargado del cuidado de los animales haya recibido formación específica sobre bienestar animal.

1.2.1. Indicadores de bienestar animal.

La suposición de que el estrés se refiere a un simple fenómeno fisiológico es indeseable, y un solo carácter fisiológico o de comportamiento no puede contestar las cuestiones relativas a la calidad de vida de varios sistemas de producción alternativos, especialmente cuando hay factores estresantes permanentes y sutiles.

Los animales pueden ser estresados tanto físicamente (temperatura, gases nocivos ambientales, hambre, sed, daño, ruido, etc.) como psicológicamente (sujeción, manejo, novedad, etc.). El miedo es el principal estresante psicológico y depende de factores genéticos y de experiencias previas. La duración de la inmovilidad muscular es un buen indicador del bienestar psicológico asociado con el miedo. Las características principales de esta inmovilidad muscular son estrés, ausencia de patologías físicas, movimientos de cabeza, ojos, orejas y patas y sensibilidad a la electricidad.

Para medir el bienestar es preferible usar distintos criterios simultáneamente, tanto fisiológicos e inmunológicos, como aquellos relacionados con la salud, la reproducción, la productividad y el comportamiento (miedo, dolor, frustración). Sin embargo, una dificultad obvia es que la respuesta dependerá del peso dado a cada componente, y otra es que cada componente puede producir diferentes respuestas. Dado que el comportamiento tiene un papel particularmente importante que desempeñar en el bienestar, muchos investigadores usan el comportamiento como el único o el principal indicador de bienestar. Por el contrario, el uso de la reducción en aptitud biológica (mortalidad, retraso reproductivo, reducción en número de hijos, etc.) como criterio de estrés es complicado.

1.2.1.1. Indicadores de estrés a corto plazo.

Los indicadores de problemas de bienestar a corto plazo incluyen el ritmo cardiaco, el ritmo respiratorio, la alteración de la función adrenal, la de la química cerebral y del sistema de defensa. Los indicadores de estrés a corto plazo más aceptados son:

1. Hormonas adrenales: adrenalina, Cortisol y corticoresterona

Mösti y Palm. (2002) y Mormede y col. (2007) consideran las hormonas adrenales como indicadores de estrés a corto plazo, pudiendo ser medidas en sangre, saliva y orina. La medición en sangre no resulta adecuada debido a que la toma de muestra induce estrés y puede alterar los resultados, siendo la más conveniente la orina por ser la principal vía de excreción además de almacenar las hormonas sintetizadas entre micciones.

La adrenalina es una hormona vasoactiva secretada en situaciones de alerta por las glándulas adrenales. Entre los efectos fisiológicos que produce está el aumento, a través de su acción en hígado y músculos, de la concentración de glucosa en sangre. Esto se produce porque la adrenalina moviliza las reservas de glucógeno hepático y también las musculares. Otras funciones son aumentar la tensión arterial, aumentar el ritmo cardíaco, dilatar la pupila para tener una mejor visión y aumentar la respiración, por lo que se ha usado como medicamento contra el asma. Puede estimular al cerebro para que produzca dopamina, hormona responsable de la sensación de bienestar, pudiendo crear adicción.

El cortisol es el principal glucocorticoide (hormonas formadas por otras hormonas) segregado por la corteza suprarrenal humana y el esteroide más abundante en la sangre periférica. Esta hormona y sus alteraciones se han relacionado con la neurogénesis (producción de las células del sistema nervioso central, es decir, de neuronas y células gliales), especialmente en adultos, lo cual a su vez se ha visto como uno de los factores incidentes en la depresión humana. El cortisol además de promover la síntesis de glucosa a través de diferentes vías (como la formación de glucosa a partir del glucógeno encontrado en músculos o en hígado) disminuye la cantidad de proteína de los tejidos periférico, por lo tanto aumenta la síntesis de proteínas plasmáticas y de proteínas del hígado. Es una hormona que se libera en grandes cantidades en momentos de estrés, potenciando las vías metabólicas catabólicas, por lo tanto elevando la concentración de glucosa, aminoácidos, y lípidos (este último importante en la secreción crónica de cortisol, dando como consecuencia problemas de dislipidemias, que más tarde desemboca en problemas cardiovasculares).

1. Antecedentes.

La corticosterona es otro glucocorticoide liberado junto al cortisol en la corteza suprarrenal. En humanos se secreta en menos cantidad y aunque sus efectos no son importantes, es un precursor de la aldosterona (hormona que actúa en la conservación de sodio, generando potasio e incrementando la presión sanguínea). En otras especies la corticosterona es el principal glucocorticoide, involucrándose en la regulación del metabolismo, las reacciones inmunológicas y las respuestas de estrés.

2. Proteínas de fase aguda (PFA).

Son un grupo heterogéneo de proteínas plasmáticas que se sintetizan en el hígado y cuya cantidad en la circulación aumenta rápidamente en presencia de factores estresantes como inflamación e infección. Aquellas proteínas cuyas concentraciones plasmáticas cambian al menos un 25% durante los estados inflamatorios se conocen como proteínas de fase aguda. Existen muchas y el cambio en sus concentraciones puede implicar bien un incremento con respecto a su concentración basal (proteína C reactiva-CRP, fibrinógeno, haptoglobina, ferritina) llamándose positivas, o un descenso (albúmina, transferrina) denominándose negativas. Varían mucho dependiendo de la especie, siendo en el cerdo las más importantes la Pig-Map, proteína C-Reactiva y la haptoglobina.

La fase aguda se define como la actividad fisiopatológica que acompaña a la inflamación. Está dirigida a prevenir los daños, aislar y destruir a los patógenos invasores y activar los mecanismos de reparación necesarios. Mediante diferentes caminos produce fiebre, catabolismo muscular, incremento de la lipólisis y pérdida de peso. Estos recursos que deberían dedicarse al crecimiento o la reproducción se dedican a mantener activo el sistema inmune, así como a sintetizar anticuerpos y proteínas de fase aguda. Es el denominado coste energético del estrés.

Las proteínas utilizadas por Lampreave y col. (1994), Lipperheide y col. (1998) y Cerón y col. (2006) en sus estudios han sido: proteína C-Reactiva, haptoglobina, amiloide A-sérica, alfa 1 glicoproteína ácida, Pig-MAP, ceruloplasmina y fibrinógeno.

La proteína Alfa 1 glicoproteína ácida (AAG) modula la respuesta celular. Es un reactante de fase aguda sintetizado en el hígado como respuesta a la inflamación y daño

del tejido. El rango normal de individuos sanos es 50-120 mg/dl. Sin embargo, también se observan niveles de AAG considerablemente altos en un número de condiciones tales como enfermedades inflamatorias, infarto de miocardio agudo, trauma, embarazo y cirugía. Las concentraciones de AAG aumentan rápidamente hasta 48 horas tras cirugía, seguido de un cambio muy leve hasta unas 120 horas después, independientemente de la gravedad de la lesión. Los niveles de AAG también son una útil herramienta de diagnóstico en recién nacidos con infecciones bacterianas, ya que la mayoría de los recién nacidos con infección producen niveles elevados de AAG.

La proteína C- Reactiva (CRP) se produce en el hígado cuando hay una infección o inflamación aguda en el cuerpo. Por la facilidad técnica para su determinación tanto cualitativamente como cuantitativamente, su valoración es la que se utiliza en rutina como marcador de la respuesta de la fase aguda en la que los niveles de CRP pueden elevarse hasta 1000 veces, convirtiéndolo en un excelente indicador temprano de infección.

La Haptoglobina se une a un cierto tipo de hemoglobina (proteína en los glóbulos rojos que transporta oxígeno) en la sangre. Se mide para valorar la velocidad a la cual los glóbulos rojos son destruidos. Cuando los glóbulos rojos mueren, proceso llamado hemólisis, liberan su hemoglobina. El hígado produce la haptoglobina y la secreta en la sangre, esta encuentra y se enlaza a cualquier hemoglobina "libre", es decir, la que no está contenida dentro de los glóbulos rojos. La concentración de hemoglobina libre normalmente es muy baja, pero sus niveles se elevan cuando los glóbulos rojos están siendo destruidos. Después de que la haptoglobina se enlaza con la hemoglobina, la molécula va al hígado donde sus componentes son reciclados (hierro y aminoácidos). Este proceso destruye la haptoglobina. Cuando los glóbulos rojos están siendo destruidos, la velocidad de destrucción de la haptoglobina por el hígado supera la velocidad de formación de nueva haptoglobina. Es por esto que, la concentración de haptoglobina en la sangre disminuye.

Amiloide A- Sérico es una proteína de fase aguda que se caracteriza por incorporarse a las lipoproteínas de alta densidad durante los procesos inflamatorios, como se ejemplariza en la sarcoidosis, enfermedad de causa desconocida en la cual se produce una inflamación a nivel de los ganglios linfáticos, los pulmones, el hígado, los

ojos, la piel y otros tejidos. Esta apolipoproteína (proteínas que constituyen el componente proteico de las lipoproteínas, complejos que transportan los lípidos en la sangre) actúa bien desplazando a las otras apolipoproteínas, bien interfiriendo en el proceso de esterificación del colesterol. Ambos mecanismos de acción producen una aceleración del catabolismo del colesterol unido a las lipoproteínas de alta densidad ocasionando una disminución de sus concentraciones séricas. Esta alteración del metabolismo lipoproteico, sumado a un posible efecto directo del amiloide A-sérico sobre el endotelio vascular y la placa de ateroma, implica a la actividad inflamatoria, expresada a través de las concentraciones séricas de amiloide A, en el desarrollo de la arteriosclerosis.

Pig- MAP: Proteína específica del porcino. En el cerdo, durante la fase aguda provocada por trementina o por trauma quirúrgico la concentración plasmática de pig - MAP aumenta hasta 30 veces respecto del valor normal (0.5- 0.8 mg/ml). Asimismo se ha observado que pig-MAP aumenta mucho en cerdos de campo con patologías agudas, patologías respiratorias, meningitis estreptocócica, hembras con abortos, etc.

El fibrinógeno ayuda a detener el sangrado al favorecer la formación de coágulos de sangre. Es precursor de la fibrina (proteína fibrilar con la capacidad de formar redes tridimensionales). Los niveles elevados de fibrinógeno en plasma parecen asociarse con mayor riesgo de alteraciones cardiovasculares. Ceruloplasmina es una proteína que contiene cobre, en el suero de la sangre.

El interés de las proteínas de fase aguda se basa en dos conceptos:

➤ Su aumento siempre indica la presencia de estrés inmunológico, es decir, hay recursos que se desvían del crecimiento o de la reproducción para mantener activo el sistema inmune lo que supone pérdidas en los rendimientos productivos (disminución del crecimiento y peor índice de conversión). Además esta concentración es proporcional a la intensidad del estrés que está sufriendo el animal. También presentan más sensibilidad al estrés subclínico que puede consumir los suficientes recursos del animal (sin que este muestre síntomas) como para provocar consecuencias debidas a un segundo factor que en condiciones normales no las tendría.

1. Antecedentes.

➤ Su elevación es rápida (4-6 horas después de aparecer el estímulo) y presenta el máximo valor después de las 2 horas siguientes, pudiendo mantenerse hasta 14 horas después. Si el estrés se hace crónico, permanece elevado, salvo que haya problemas de absorción de nutrientes o malnutrición. En ocasiones su elevación anticipa síntomas clínicos.

Los valores de referencia dependen de la edad y del sexo. A partir de la entrada a cebadero (20 kg.) los machos enteros presentan mayor sensibilidad al estrés en general por lo que suelen ser mejores indicadores de situaciones problemáticas.

3. Factores fisiológicos

Factores fisiológicos como calidad de la carne después del sacrificio pudiendo producirse carne pálida, blanda y exudativa (PSE) debida a glicólisis, ácido láctico y descenso del pH como indica Guardia y col. (2005).

1.2.1.2. Indicadores de estrés a largo plazo.

El estrés a medio-largo plazo produce heterofilia y lipofenia y alteraciones en el comportamiento como el pasotismo ante el mundo que rodea al animal, y las estereotipias (secuencias de movimientos repetidos sin ningún objetivo).

En mamíferos uno de los indicadores de estrés a largo plazo es la relación entre neutrofilos y linfocitos. Los neutrofilos son los glóbulos blancos (leucocitos) más abundantes de la sangre en el ser humano. En el porcino suponen un 30-50% del total de los leucocitos, siendo en esta especie los segundos más altos después de los linfocitos. Se caracterizan por presentar un núcleo con cromatina compacta segmentada en 2 a 5 lóbulos conectados por delgados puentes. Es una célula muy móvil y su consistencia gelatinosa le facilita atravesar las paredes de los vasos sanguíneos para migrar hacia los tejidos, ayudando en la destrucción de microbios y respondiendo a estímulos inflamatorios. Son células fagocíticas por lo que la principal función de los neutrófilos es la de detener o retardar la acción de agentes infecciosos y materiales extraños.

1. Antecedentes.

Los linfocitos son las células de la sangre que intervienen en los mecanismos de defensa y en las reacciones inmunitarias del organismo. En el porcino suponen el 40-60% del total de glóbulos blancos. Los linfocitos participan en la lucha contra los microorganismos extraños y los tumores. También son responsables del fenómeno del rechazo de los órganos trasplantados. Presenta un núcleo esférico.

En cerdos sometidos a estrés los aumentos entre el cociente neutrofilos y linfocitos reflejan aumento a corto plazo del nivel de corticosterona lo que produce neutrofilia y linfopenia (Widowski y col. 1989).

La neutrofilia es una enfermedad causada por la alteración del número de neutrofilos, con aumentos superiores a $7500/\text{mm}^3$. Hay múltiples causas, bien fisiológicas (ejercicio, estrés, embarazo, parto, calor/frío, tabaquismo) o patológicas, debidas frecuentemente a infecciones de probable origen bacteriano.

La linfopenia se observa cuando se presentan recuentos de linfocitos por debajo de $1.0 \times 10^3/\text{ml}$, la cual puede estar acompañada de disminución en el tamaño de los linfocitos. La linfopenia puede originarse por fallos en la producción, exceso en su destrucción, o pérdidas celulares a través de los conductos linfáticos del intestino. Las causas son muy amplias. Puede estar causada por situaciones de estrés, sobrecargas corporales, crisis dolorosas intensas, postoperatorio inmediato, parto, primer fase de las infecciones, en la gripe no complicada en sus primeros días, en los procesos sépticos graves como un signo de derrumbamiento de las defensas, en la hiperleucocitosis séptica, en las formas malignas de la fiebre tifoidea, en la tuberculosis miliar en fase avanzada, en la fiebre del ceno, en la etapa de brote del exantema del sarampión, en los procesos con afectación extensa de tejido ganglionar como linfosarcoma, linfogranuloma, Hodgkin, en la toxicidad a moztasas nitrogenadas, por administración de ACTH, cortisona, en la agonía, es excepcional en la agranulocitosis, es marcada en la anemia esplénica, en la uremia hipoclorémica y en el abdomen agudo, en la pancreatitis aguda y en la obstrucción intestinal.

Cuando hay estrés a largo plazo ocurren inicialmente las mismas respuestas que en el estrés a corto plazo, aunque algunas cesan posteriormente y pueden ser reemplazadas por otras. La respuesta de la medula adrenal es muy breve mientras que la

de la corteza adrenal, aunque es más prolongada, disminuye al cabo de poco tiempo. Finalmente, los animales pueden escapar el estrés prolongado por autonarcotización con opiáceos naturales (endorfinas).

Entre los factores que pueden afectar al bienestar porcino se ha estudiado el efecto de las condiciones de alojamiento tales como la temperatura (Lewis y Berry, 2006) el tipo de suelo (Scott y col., 2007). Otros factores son la duración y condiciones del transporte (Gonsalvez y col, 2006 y Lewis y Berry, 2006), el enriquecimiento del medio con juguetes como bidones, cadenas, neumáticos o el enriquecimiento social (Bracke y col, 2007; Scout y col., 2007) y el estado de salud (Lipperheide y col., 1998; Segalés y col., 2004).

1.2.2. Bienestar animal en el transporte del porcino.

El manejo de los animales previo al sacrificio, el tiempo de ayuno en granja, el manejo durante el transporte (densidad de carga en el camión y duración del transporte), la carga y descarga del camión, y el manejo en el matadero (tiempo de descanso, condiciones ambientales, tipo de aturdimiento) va a afectar al bienestar animal, a las pérdidas de los animales por muerte o lesiones y a la calidad de la canal y de la carne.

La presión moral de la sociedad actual ha hecho que la legislación sea cada vez más fuerte en este sentido. Las condiciones y requisitos para poder realizar el transporte de todas las especies animales, vienen establecidas en el **Reglamento 1/2005 del Consejo, de 22 de diciembre de 2004, relativo a la protección de los animales durante el transporte y las operaciones conexas** que regula prácticamente todos los aspectos que influyen en el transporte de ganado. Por una parte los requisitos de los vehículos, de los transportistas, de la duración del viaje, de los períodos de descanso, la alimentación y la bebida durante el transporte. Regula igualmente los controles que deben realizar los Estados Miembros y el régimen de sanciones que debe aplicarse. Con esta legislación lo que se pretende es establecer medidas específicas para evitar posibles malos tratos y sufrimientos a los animales que son transportados dentro del territorio de la UE.

1. Antecedentes.

El Reglamento introduce normas más estrictas aplicables a los trayectos de una duración superior a ocho horas. Estas normas afectan tanto a los vehículos como a los animales.

Asimismo, el Reglamento establece un equipamiento de mejor calidad en los vehículos de transporte, incluido, en particular, la regulación de la temperatura (ventilación mecánica, registro de la temperatura, sistema de alerta en la cabina de conducción) y cualquier otro sistema que garantice un rango de temperaturas en el interior del vehículo de entre 5°C a 30°C, con una temperatura de + 5°C. También establece la posibilidad de contar con un sistema permanente de suministro de agua, la mejora de las condiciones de transporte a bordo de los buques destinados al transporte del ganado (ventilación, dispositivos de suministro de agua, sistema de aprobación, etc.).

Se prohíbe el transporte de determinados animales, como los animales muy jóvenes (los terneros de menos de diez días, los cerdos de menos de tres semanas y los corderos de menos de una semana) salvo en el caso de que el trayecto sea inferior a 100 Km. El Reglamento prohíbe igualmente el transporte de las hembras preñadas en la última etapa de la gestación y durante la semana posterior al parto.

En cuanto a las disposiciones relativas a la duración del trayecto y los espacios previstos para los animales, en materia de duración del transporte el Reglamento prevé duraciones diferentes en función de los tipos de animales: animales no destetados, es decir, que todavía se alimentan de leche (9 horas de trayecto, seguidas de una hora de descanso para abreviar, seguida de 9 horas de trayecto); cerdos (24 horas de trayecto siempre que exista la posibilidad permanente de abreviar); caballos (24 horas de trayecto con la posibilidad de abreviar cada 8 horas); bovinos, ovinos y caprinos (14 horas de trayecto, seguidas de una hora de descanso para abreviar, seguida de 14 horas de trayecto). Las secuencias mencionadas pueden repetirse siempre que se descargue a los animales, se les alimente, se les permita abreviar y se les deje descansar durante al menos 24 horas en un puesto de control autorizado.

Respecto a la densidad de carga los animales deberán disponer de espacio suficiente para permanecer de pie en posición natural, y en su caso, de barreras que les protejan contra los movimientos del medio de transporte. En el caso del porcino para el

transporte de más de 9 horas y un animal de aproximadamente 100 Kg., debe aumentarse la superficie por cerdo transportado de 0,42 m² en transportes de corta distancia a 0,599 m² en transportes de larga distancia, es decir un aumento de la superficie disponible para cada animal del 43 %.

El suelo del medio de transporte será lo bastante sólido para resistir el peso de los animales. No podrá ser deslizante. Deberá estar cubierto de un lecho de paja para absorber las deyecciones u otro procedimiento que ofrezca las mismas garantías, a menos que las deyecciones se evacuen con regularidad. Los animales deberán embarcarse en medios de transporte que hayan sido limpiados y en su caso desinfectados.

Está ampliamente aceptado que el cerdo es una de las especies más sensibles al estrés por transporte. Esto es consecuencia de al menos tres factores:

1.- Termorregulación: si bien el cerdo tiene glándulas sudoríparas funcionales, su capacidad de perder calor mediante sudor es prácticamente nula. Esto hace que sea particularmente sensible a las temperaturas elevadas, especialmente cuando otros mecanismos de pérdida de calor, tales como la vaso dilatación periférica, se ven comprometidas a consecuencia de la respuesta a estrés.

2.- Estrés social: el cerdo es un animal social, cuyos grupos se organizan en torno a una jerarquía. Esto se produce mediante interacciones agresivas. Al mezclar cerdos procedentes de grupos diferentes, la jerarquía debe establecerse otra vez. Las agresiones pueden causar lesiones en los animales y son por otra parte, un factor estresante intenso.

3.- Sensibilidad al estrés: los animales genéticamente sensibles a estrés padecen una alteración, producida por una mutación, en la membrana del retículo sarcoplásmico de la fibra muscular estriada. A consecuencia de ello, la concentración citoplasmática de calcio, responsable del mecanismo de contracción muscular, permanece anormalmente elevada durante un período de tiempo excesivamente largo. Esto hace que los animales sensibles a estrés, tengan dificultades a la hora de controlar la contracción muscular. En situaciones estresantes los animales homocigotos recesivos pueden sufrir un cuadro de hipertermia y acidosis frecuentemente fatal; tanto los homocigotos recesivos como los

heterocigotos presentan a menudo carne pálida, blanda y exudativa, dependiendo de las reservas de glucógeno muscular (Webb, 1996; Manteca, 1998).

La mortalidad durante el transporte es mayor en la raza Pietrain, y la Landrace es más vulnerable que la Large White (Sybesma y col.1978). La aparición de un número mayor de anomalías en el comportamiento en matadero esta relacionado con la selección para carnes magras (Gradin 1997).

Werner y col. (2007) han observado que se ha producido una disminución de la mortalidad en el transporte de 1999 a 2003 como consecuencia de nuevas directrices en la Unión Europea y señalan que unas condiciones inadecuadas tanto en el transporte de larga duración como en los de corta pueden traducirse en un incremento de de la mortalidad en el mismo y problemas de calidad de la carne.

Ritter y col. (2006) destacan que un incremento del suelo en el camión de 0,39 a 0,48 m²/ cerdo reduce las pérdidas de los animales muertos y lesionados de 0,88 a 0,36%.

Saco y col. (2003) estudiaron el efecto del transporte sobre las proteínas de fase aguda (haptoglobina y Pig-MAP) y sobre el cortisol. En este trabajo se comparaban dos tipos de de trasporte: transporte corto (1 hora y 15 minutos) acompañado por un tiempo de descanso en matadero corto (2 horas) frente a un transporte largo (6 horas) con tiempo de descanso largo (14 horas) y observaron que cuando el transporte era corto no se producía un incremento ni antes ni después del transporte de las PFA, pero si del cortisol, mientras que si el transporte era largo si que había un incremento de las PFA pero no del cortisol. Por tanto, parece que ante una situación de estrés primero se produce un incremento de las hormonas adrenales que después volverían a su nivel basal y la respuesta metabólica de incremento de las PFA seria posterior. A su vez en ese trabajo mostraban una tendencia a ser menores los niveles de PFA en los animales portadores del gen del Halotano, a pesar de que cabría esperar que los animales portadores de dicho gen fuesen más susceptibles al estrés, si bien utilizaron un número reducido de animales por tratamiento (10 animales).

1. Antecedentes.

Piñeiro y col. (2006) señalan que el transporte ejerce un efecto sobre las PFA (haptoglobina, amiloide A-sérica, proteína C-reactiva, Pig-MAP), tanto su duración como en las condiciones en las que se realiza, por lo que encuentran un mayor incremento de las PFA en transportes más cortos (24 horas vs. 48 horas) pero que se realizaron en peores condiciones (1.5m²/lechón, ausencia de serrín, agua y alimento vs. 2m²/lechón, serrín y disponibilidad de alimento y agua).

Gonsálvez y col. (2006) igualmente señalan que si bien la duración del transporte influye en las pérdidas de peso y en el rendimiento del transporte, otros factores como la estación del año o la carga de los animales de distintos orígenes repercuten de igual manera.

Foury y col. (2005) cuando estudian el nivel de catecolaminas (grupo de sustancias que incluye la adrenalina, la noradrenalina y la dopamina, las cuales son sintetizadas a partir del aminoácido tirosina) previo al sacrificio, detectan que su incremento se repercute en una peor calidad de la carne.

Otros autores (Guardia y col., 2005 y Gispert y col., 2005) encuentran una mayor incidencia de carnes DFD (dark, firm and dry) cuando varían las condiciones previas al sacrificio de los cerdos. Para ello evaluaron 116 transportes con un total de 15.695 animales en 5 mataderos distribuidos en el territorio español. En este estudio encuentran que la frecuencia de carnes DFD aumenta con la densidad de carga en el camión, el tiempo de ayuno en granja y el tiempo de espera previo al sacrificio. Observan que la incidencia de carnes DFD aumenta un 11% cuando la densidad de carga del camión varía de 0,37 a 0,50 m² por 100 kg de peso del animal. Esto podría ser debido a que, con el exceso de espacio, los animales pueden moverse, chocarse entre ellos, herirse y generar peleas, dando lugar a fatiga muscular siendo estos animales más propensos a dar carnes DFD. También encuentran que este riesgo aumenta cuando el tiempo de ayuno en la granja es superior a 22 horas, observando un 17% de carnes DFD, y con tiempos de espera previos al sacrificio largos, obteniendo un 11,6% de riesgo de DFD después de 3 horas de descanso, del 18,6% después de 9 horas y del 24,9% después de toda una noche.

1. Antecedentes.

En este mismo estudio (Gispert y col., 2005) observan el efecto del gen del halotano sobre la calidad de la carne realizando el genotipado en una submuestra de sangre de 1.331 animales y obteniendo una frecuencia para dicho gen que variaba de 8 al 54%. Midiendo la conductividad eléctrica en la canal para determinar la calidad de la carne, observan que los valores medios de ésta para los animales heterocigotos (Nn) y homocigotos dominantes (NN) fueron 4,2 veces más bajos con respecto a los animales halotano positivos para los que se obtienen unos valores medios de 6.5, con lo que observan una asociación entre del genotipo del Halotano con las carnes PSE.

Algunos autores proponen las siguientes recomendaciones para disminuir la incidencia de muertes por estrés en el transporte:

1.- Densidad de animales durante el transporte: debe permitir a los cerdos tener espacio suficiente para permanecer de pie en posición natural y para tumbarse simultáneamente. Aunque es difícil dar recomendaciones precisas sobre la densidad máxima de animales durante el transporte, los trabajos coinciden en que menos de 0.35m² por animal es desaconsejable. Algunos autores, recomiendan densidades considerablemente superiores (0.5 - 0.55 m² por animal). El diseño del camión es igualmente importante y se deben utilizar sistemas de compartimentación que permitan transportar a los animales en grupos de 6 a 8 animales (Manteca, 1998). El Instituto Americano de la Carne (American Meat Institute, 1991) recomendó para cerdos de 90 kg una densidad de 0.32 m² en invierno y 0.37 m² en verano; y para cerdos de 113 kilos una densidad de 0.40 m² en invierno a 0.46 m² en verano. El suelo de los camiones debe ser antideslizante. El techo y las paredes deben asegurar una protección eficaz contra la intemperie y grandes variaciones climáticas.

2.- Temperatura y ventilación: evitar el transporte durante las horas más calurosas del día en verano y asegurar una ventilación adecuada durante el transporte para reducir las muertes y evitar la disminución en la calidad de la carne. Igualmente, la instalación de duchas en los camiones tiene efectos marcadamente positivos (Manteca, 1998). Cuando la temperatura supera los 15 °C se recomienda usar arena o serrín mojado para mantener frescos a los cerdos. Si pasa de los 23 °C hay que rociarlos con agua antes de embarcarlos en granjas. En épocas de calor no cubrir el piso con paja.

Cuando haya menos de 15 °C se podrá usar paja o serrín seco (American Meat Institute, 1991). Los camiones deben estar provistos de montacargas y tener un sistema de ventilación ya sea manual o automático que permita la renovación del aire en todos los compartimentos. Es importante que el diseño permita una buena limpieza.

3.- Rampa de carga y descarga de los animales: los animales deben ser descargados inmediatamente después de la llegada al matadero. Al igual que en los corrales de recogida, el diseño debe permitir el flujo de animales desde los muelles de descarga hasta las salas de espera, y hasta el punto de aturdimiento sin tener que utilizar picas eléctricas. Cuando la carga y descarga de animales se realiza por rampas, estas no deberían tener una inclinación superior al 15 %. Es importante señalar, por otra parte, la conveniencia de diseñar granjas de cerdos, de modo que el desplazamiento de los animales hasta el camión pueda realizarse con la mayor facilidad posible. Finalmente, debe evitarse, en lo posible, el tratamiento brusco a los animales, durante la carga y descarga (Manteca, 1998). El movimiento debe ir de lugares más oscuros a más claros, y los animales deben poder desplazarse sin encontrar obstáculos empujados con paneles evitando el uso de picas eléctricas. Si se evitan esquinas bruscas los animales se mueven con mayor facilidad.

4.- Alimentación y agua antes y durante el transporte: antes de cualquier manipulación son necesarias de 12 a 14 horas de ayuno ya que los cerdos tienen tendencia a marearse, vomitar, y consecuentemente se produce un aumento de la mortalidad, aunque trabajos recientes sugieren la posibilidad de que el consumo de una cantidad reducida de pienso, poco antes del transporte, podría tener efectos beneficiosos. Por otra parte, los animales deberían tener acceso al agua hasta inmediatamente antes del transporte (Manteca, 1998). Finalmente, de acuerdo con la legislación de la Unión Europea, no deben transcurrir, nunca más de 24 horas sin que los animales sean alimentados y abrevados.

5.- Sistema de conducción: una conducción cuidadosa, que evite cambios súbitos de velocidad y virajes bruscos tienen una considerable influencia positiva desde el punto de vista de reducir las pérdidas económicas como a la hora de aumentar el bienestar de los animales (Manteca, 1998).

6.- Socialización: como en las etapas anteriores es necesario no mezclar animales de diferentes corrales de engorde en los camiones. En las salas de espera deben tener duchas y agua de bebida. La calidad de ésta debe estar controlada. Los grupos sociales deben mantenerse aquí y la densidad debe ser de 0,6 m² por cerdo de aproximadamente 100 kg.



Foto2: Transporte del porcino.

1.2.3. Bienestar en el sacrificio.

Los mataderos tienen un ambiente al cual los animales no están habituados. Los cerdos son muy sensibles al ruido, siendo éste uno de los factores más estresantes en los mataderos. Es necesaria la provisión de agua y un área de reposo que les permita recuperarse limpia y tranquilamente. Si los animales han sido transportados durante un periodo largo y estresante, el tiempo de reposo ha de ser de al menos 6 horas. En cambio, si el transporte es corto y con buen trato, los animales pueden sacrificarse dentro de las dos primeras horas después de su llegada a matadero.

El cerdo es un animal muy difícil de mover por lo que la utilización de tablero para guiarlos, hacerlos girar o detenerlos es un buen ejemplo de manejo. En general el movimiento de los animales debe realizarse desde lugares oscuros hacia lugares claros. Si se evitan esquinas bruscas los animales se mueven con mayor facilidad.

1. Antecedentes.

El aturdimiento es un momento muy importante tanto por sus efectos sobre la calidad de la carne como por la responsabilidad ética de los que sacrifican a los animales. En porcino se utilizan principalmente el CO₂ y la Electronarcosis, ambos aprobados por la legislación europea (**Real Decreto 54/1995, de 20 de enero, sobre protección de los animales en el momento de su sacrificio o matanza**).

Hay varias permisivas claves para que el aturdimiento cumpla el objetivo de bienestar por lo cual su aplicación se ha hecho obligatoria. Estas son que el animal debe pasar de forma instantánea a un estado de inconsciencia, es decir, insensible al dolor y que la muerte se debe provocar durante este estado. En segundo lugar, el aturdimiento debe minimizar los problemas de calidad del producto final y, en último lugar, debe garantizar la seguridad del operador.

Los aturdimientos más habituales en porcino son el eléctrico y mediante inhalación de CO₂. El aturdimiento eléctrico se produce al pasar un flujo de corriente por el cerebro. El control de los equipos, su mantenimiento y la correcta aplicación de los electrodos son los factores que aseguran un correcto aturdiendo eléctrico. Animales de diferente tamaño son más susceptibles a una aplicación incorrecta de los electrodos y consecuentemente a un incorrecto aturdimiento. Por este motivo, se aconseja que los lotes sean lo más homogéneos posibles. Por otra parte, la sujeción de los animales para la aplicación correcta de los electrodos conlleva un alto nivel de estrés previo al sacrificio.

En el aturdimiento por CO₂ este entra por las vías respiratorias pasando a la corriente sanguínea para afectar al sistema nervioso, provocando la inconsciencia y la muerte del animal. Los cerdos son introducidos en jaulas con capacidad desde 2 hasta 5 cerdos y bajados a un pozo con una concentración superior al 80% de CO₂, durante el tiempo suficiente para mantenerlos inconscientes hasta la muerte cerebral. El CO₂ es más pesado que el aire y puede ser almacenado a altas concentraciones en una fosa por debajo del nivel del suelo. La pérdida de la conciencia se produce cuando el pH del fluido cerebro espinal baja de 7,4 a 7,1, llegando a una anestesia profunda cuando el pH es de 6,8. El sistema de aturdimiento con CO₂ tiene la ventaja de que no requiere la sujeción de los animales y de permitir el aturdimiento en grupos, reduciendo así el nivel de estrés. No obstante, este sistema ha sido muy criticado desde el punto de vista del

bienestar animal. Esta crítica se basa en que la inhalación de concentraciones altas de CO₂ es picante y desagradable provocando asfixia. Sin embargo, desde la óptica de la calidad reduce significativamente las fracturas y hemorragias.

Si bien el aturdimiento elimina los factores estresantes del desangrado, éste induce en el animal unos cambios fisiológicos cuyos efectos pueden repercutir negativamente en la calidad del producto final. Estos cambios son debidos principalmente al aumento de la presión sanguínea y la actividad muscular, provocando alteraciones, bien en la calidad de la canal debido a contusiones, hemorragias o fracturas, o bien en la calidad de la carne debido a una modificación del proceso bioquímico normal responsable de la transformación del músculo en carne.

1.2.4. Calidad de la carne.

Entre los factores más importantes que influyen en la calidad final de la carne podemos nombrar el estrés, las condiciones de transporte y de descanso ante mortem, la temperatura ambiental, el genotipo y el sistema de aturdimiento (Van Groenland, G.J. Vriesekoop, P. De Vries, A. 2001). Tanto la genética como un manejo estresante de los animales previo al sacrificio pueden provocar un desarrollo anormal del proceso de la caída del pH muscular después del sacrificio, lo que conlleva dos tipos principales de alteraciones: carnes PSE y DFD.

Las carnes PSE (pálidas, blandas y exudativas) se producen como consecuencia de una caída muy rápida del pH muscular tras el sacrificio, de forma que llegue a valores de 6.0 o inferiores antes de la primera hora tras el sacrificio, mientras la carne todavía está caliente (>35 °C). Esta combinación produce una marcada desnaturalización de las proteínas musculares lo que comporta una disminución de la capacidad de retención de agua de la carne. La incidencia de PSE es muy variable, en un estudio realizado en cuatro mataderos de Cataluña la estimó en 35 %. Este proceso es más frecuente en los animales portadores del gen del halotano. Pese a esto, los animales libres de este gen también pueden producir carnes PSE si sufren un manejo estresante intenso justo antes del sacrificio (durante la conducción de los animales al aturdimiento y durante el propio aturdimiento).

1. Antecedentes.

Las carnes DFD (oscuras, duras y secas) se producen cuando las reservas de glucógeno se agotan antes del sacrificio. Esto produce una acidificación muscular insuficiente tras el sacrificio, de forma que el pH muscular en las 24 h después del sacrificio será superior a 6,0-6,2. Esto aumenta la capacidad de retención de agua, que impide el paso del oxígeno y la absorción de luz en la superficie de corte. La aparición de DFD no depende del gen del halotano, sino que está relacionado con un ejercicio físico intenso durante un periodo prolongado antes del sacrificio. La incidencia puede oscilar entre un 5-50 %, dependiendo del matadero. Un periodo de ayuno prolongado no reduce por sí mismo las reservas de glucógeno de forma importante, aunque puede aumentar los efectos del ejercicio físico y del estrés. En invierno se producen más casos que en verano.

Pese a que el aturdimiento elimina los factores estresantes del sangrado, puede producir en el animal cambios fisiológicos que pueden repercutir negativamente en la calidad del producto final.

Gade y col. (2007) encuentra que en Dinamarca la frecuencia del gen del halotano se ha reducido de 0.12% en los años 80 hasta 0.016% en 2002.

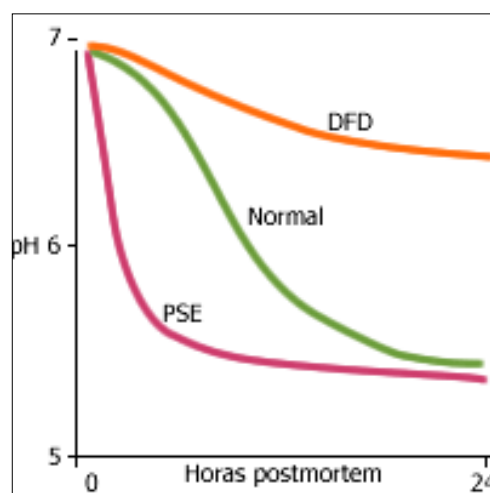


Figura 4: Patrón de acidificación en carnes normales, PSE y DFD.

No obstante, el aturdimiento eléctrico provoca una mayor incidencia de carnes PSE comparado con el sistema de aturdimiento por CO₂ (Velarde y col. 2001), debido a la estimulación del sistema nervioso, acelerando así el rigor mortis y la caída del pH muscular cuando la musculatura está aún caliente. Las principales causas de esta estimulación nerviosa son el paso de la corriente eléctrica por el animal y la actividad muscular intensa durante la fase clónica.

1.2.5. El gen del halotano y el Síndrome del Estrés Porcino

Hay determinadas razas porcinas (*Pietrain*, *Landrace Belga*) que son más susceptibles al estrés como consecuencia de ser portadoras de un gen mayor recesivo, el gen del Halotano o gen receptor de la rianodina. Es el gen responsable del síndrome del estrés porcino (PSS) o Hipertermia Maligna, enfermedad hereditaria monogénica recesiva que se caracteriza por un desorden neuromuscular, la cual es una de las anomalías genéticas de mayor trascendencia económica en el ganado porcino, ya que los animales que lo padecen suelen dar lugar a una mala calidad de la carne, carnes PSE (pale, soft and exudative) pálidas, blandas y exudativas, y estas carnes no tienen mercado.

El gen del halotano es el receptor de la Rianodina, implicado en la liberación de calcio en el músculo esquelético de diferentes tejidos. La función primaria del tejido muscular es producir movimiento y postura. En situaciones de estrés se estimula la apertura del canal liberador de calcio en aquellos animales homocigóticos por el alelo mutante, provocando una contracción muscular permanente y la consiguiente pérdida de la calidad de la carne.

La base molecular del síndrome se explica por la mutación en el exón 17 del gen RYR1 (Ryanodine receptor) que codifica una proteína denominada receptor de la rianodina o canal liberador de calcio. La mutación consiste en el cambio de una citosina por una timina en la secuencia de ADN complementario del gen Ryr1, lo que provoca el cambio de una Arginina por una Cisteína en un residuo posicionado en la superficie del canal. La presencia en el individuo de la condición homocigótica en el gen Ryr1 provoca una alteración en la liberación de calcio en el músculo esquelético. A

1. Antecedentes.

través del canal liberador de calcio, el calcio sale al citoplasma de la célula muscular uniéndose a una fosforil quinasa que activa las vías glucolíticas (glucógeno - glucosa) y de síntesis de ATP necesarias para la contracción muscular. En un canal liberador de calcio anormal se produce la liberación de calcio en forma continua, el metabolismo aeróbico, la glucogenólisis y la glucólisis se incrementan, agotando el ATP, la glucosa y el oxígeno, produciéndose un exceso de dióxido de carbono, ácido láctico, potasio y calor en la sangre, además de un desorden en el balance de iones intra y extracelular, llevando asimismo a un acúmulo de agua en la célula. La asociación marcada entre respuesta a estrés fisiológico, con hipercalemia, produce paro cardíaco. El estado de contracción permanente de la célula muscular provoca hipertrofia muscular, con el consiguiente aumento del desarrollo muscular de la canal (Reiner, 1993; O'Brien, 1995; Calvo y col., 1997).

El PSS ocurre en todo el mundo, pero existe una considerable variación en cuanto a la frecuencia en las razas y regiones. En algunos países de Europa la prevalencia de este síndrome ha aumentado durante los últimos años. Hoy constituye un problema importante en la producción porcina. Tal hecho ha dependido de la selección negligente o descuidada respecto a este síndrome en los programas de mejora genética en especial los programas de selección basados puramente en características de rendimiento y producción. La enfermedad probablemente ocurra en todas las razas porcinas, pero es más frecuente en las seleccionadas por una fuerte musculatura, con escasa grasa dorsal y más carne. Es sobre todo frecuente en las razas Pietrain, Poland China y Landrace, para las cuales, se ha incluido en el índice de selección, un sistema de puntos en cuanto a musculatura, ritmo de crecimiento, conversión de alimento, y espesor de grasa dorsal (Blood y col., 1988).

Los factores estresantes que pueden desencadenar el PSS son:

1.- Estresantes físicos como transporte a temperatura y/o humedad ambiental alta, ejercicio físico durante la carga y descarga, privación de comida y agua, alojamiento y transporte prolongado (Shen y col., 1992; Manteca, 1998).

2.- Estresantes psicológicos tales como mezcla de animales, ambiente nuevo, manejo brusco previo, durante y posterior al transporte de los animales y apareamiento (Shen y col., 1992; Manteca, 1998).

3.- Estresantes farmacológicos: anestésicos como halotano, metoxiflurano, cloroformo, enflurano, y fluroxeno. Los relajantes musculares despolarizantes como la succinilcolina y los agonistas α - adrenérgicos también pueden iniciar o potenciar el síndrome (Shen y col., 1992; O'Brien, 1995).

Las manifestaciones clínicas más importantes son:

1.- Muerte durante el transporte: ocurre normalmente cuando hay alta densidad de cerdos en los camiones de transporte a frigorífico y durante veranos cálidos. El porcentaje de bajas durante el transporte puede oscilar entre el 0.1 y 1% dependiendo de la sensibilidad al estrés y de las condiciones de transporte (Blood y col., 1988; O'Brien, 1995; Manteca, 1998). Cuando se observa a los cerdos vivos afectados, muestran inicialmente temblor rápido de la cola, rigidez general, acompañada de incremento en la rigidez muscular, y disnea hasta el punto de respirar por la boca. La temperatura corporal se eleva notablemente, a menudo más allá de los límites del termómetro clínico, hasta 45 °C, observándose también zonas irregulares en la piel con palidez y eritema. En esta etapa, el cerdo es, frecuentemente, víctima de ataques por otros animales del grupo. El animal sufre y muere.

2.- Hipertermia Maligna: puede ser inducida en animales susceptibles por anestésicos como el halotano, que llevan a un aumento de temperatura corporal por encima de los 41° C, acidosis metabólica, taquicardia, taquiarritmia y muerte. (Blood y col., 1988; Fujii y col., 1991; O'Brien, 1995).

3.- Carne pálida, blanda y exudativa (PSE): en los cerdos susceptibles a estrés, con frecuencia, la carne es de calidad inferior después del sacrificio, ya que se observa a la inspección, pálida, blanda y exudativa. Esto se relaciona con glucogenólisis y glucólisis excesiva después de la muerte, producción de ácido láctico y caída rápida del pH del músculo, alcanzando valores inferiores a pH 6, antes de la primera hora después del sacrificio, con despigmentación y merma en el agua de fijación. En el músculo afectado, rápidamente se produce rigidez cadavérica después del sacrificio, pero a continuación disminuye, de modo que en la carne de la canal, se observa excesiva exudación. La carne afectada tiene pH menor a 6 y generalmente temperatura de 41°C o mayor, 45 minutos después del sacrificio, en oposición al pH normal superior a 6 y temperatura menor de 40 °C. Asimismo, la carne tiene sabor desagradable y cualidades netamente inferiores respecto a la cocción y elaboración, no aceptando el encurtido con facilidad (Blood y col., 1988; Webb, 1996; Calvo y col., 1995). Los cerdos resistentes al estrés, homocigotos dominantes, típicamente no producen carne PSE, pero sí lo manifiestan comúnmente los homocigotos recesivos (Monin y col., 1999).

4.- La existencia de carne DFD: aparece menos frecuentemente en animales muertos por PSS. Esto se produce por un pH superior a 6, después de haber transcurrido 24 horas del sacrificio, reteniendo mayor cantidad de agua y deteriorándose la canal con facilidad (Webb, 1996; Calvo y col., 1997).

5.- Necrosis del músculo del lomo, músculo dorsal: cuando los cerdos superan un estrés grave durante más de 2 horas, se produce el cuadro clínico llamado necrosis aguda del músculo dorsal (Otto Eich, 1991). El síndrome agudo se caracteriza por inflamación y dolor sobre los músculos del lomo. Se inflama un músculo dorsal largo, pero raras veces ambos. El dorso del animal enfermo se curva hacia arriba, con convexidad hacia el lado afectado. Hay renuncia de movimiento por parte del animal. La inflamación y el dolor mejoran después, pero hay atrofia del músculo afectado y rigidez prominente de la columna vertebral, si bien puede ocurrir alguna regeneración al cabo de varios meses. En los casos agudos, es muy frecuente la muerte. Suele observarse este síndrome en adultos jóvenes con peso de 75 a 100 kg. La forma leve puede pasar inadvertida excepto en pacientes que adoptan decúbito cerca del lugar en que comen.

Los efectos de la genética y la sensibilidad al gen del Halotano sobre la calidad de la canal y de la carne, se han revisado en distintos estudios (De Vries y col., 1999). Los cerdos halotano positivos en relación a los cerdos halotano negativos, incluyendo el homocigoto dominante, y heterocigoto, se diferencian por tener menor crecimiento y apetito, canales más cortas, mejor conformadas, y con mayor rendimiento, menor espesor de grasa dorsal y mayor porcentaje de magro, mayor área y profundidad del músculo, elevada incidencia de carne PSE. Los cerdos homocigotos recesivos “halotanos positivos” tienen muy buena musculatura y se ven frecuentemente acompañados por inferior calidad de carne, menor fertilidad y mayores niveles de mortalidad durante la lactancia. La menor fertilidad de los verracos homocigotos recesivos se debe a que el volumen y número de espermatozoides totales en el eyaculado, son significativamente menores, presentando rápido deterioro y disminución de la motilidad de los espermatozoides en medios conservados a largo plazo.

Existen varios métodos para predecir la susceptibilidad de los cerdos al PSS.

1.- Prueba de Halotano: esta prueba es sumamente confiable para la identificación de los cerdos homocigotos recesivos. Se conoce que el diagnóstico por halotano detecta más del 90% de los homocigotos y menos del 10 % de los heterocigotos para el defecto PSS (Shen y col., 1992). Los cerdos susceptibles a estrés son sensibles al halotano a las 8 semanas de edad. Si el peligroso anestésico se retira inmediatamente después de la aparición de signos evidentes de rigidez en las extremidades y antes de la aparición de la hipertermia fulminante, la mortalidad del método es mínima. El método consiste en administrar por vía inhalatoria el anestésico halotano y observar la reacción del animal. Los cerdos que permanecen no reactivos durante un período de 5 minutos se consideran normales. Los cerdos se adormecen sin aparecer contracturas ni espasmos musculares. Los animales enfermos manifiestan contracturas y espasmos musculares (Blood y col., 1988; Grobet y col., 1992; Calvo y col., 1997).

2.- Niveles de creatina - cinasa en la sangre: estos niveles son más altos en cerdos susceptibles a estrés y se consideran útiles para la identificación de los animales con tal susceptibilidad. Puede utilizarse la prueba de la creatina - cinasa como criterio

selectivo para estimar la resistencia a estrés y la calidad de la carne. Para ejecutarla se somete primero a los cerdos a una prueba de ejercicio normal y se toman muestras de sangre 8 a las 24 horas después con el objeto de determinar los niveles de creatina - cinasa. Es buena la correlación entre dichos niveles y la prueba del halotano. Se observa también un incremento en los niveles de enzimas séricas en porcinos durante el transporte de la granja al matadero. Sin embargo, no se encuentran niveles elevados de creatina - cinasa en el suero de todos los cerdos con el cuadro de PSS. La prueba inicial se ha modificado de modo que la sangre puede colectarse en forma de gotas sobre un papel filtro y se envía por correo al laboratorio para identificación por una técnica bioenzimática. El método de la luciferasa para determinación de creatina - cinasa en sangre entera se considera un procedimiento discriminativo útil para el PSS (Blood y col., 1988).

3.- Tipificación de sangre: este método se usa para la identificación de cerdos susceptibles. En el cromosoma 6 del cerdo se ha identificado una región con 4 loci, los cuales contienen los genes responsables de las variantes de las enzimas 6 fosfogluconato deshidrogenasa y fosfo isomerasa. El sistema del grupo sanguíneo H es determinado por uno de los loci y la sensibilidad al halotano lo es por genes de un locus de esta región, la cual tiene un interés muy particular, debido a que se ha comprobado, una conexión muy estrecha entre ella, con características muy importantes en la carne, como lo es el PSS. De este modo, puede utilizarse el grupo sanguíneo para descubrir cerdos sensibles y portadores a PSS (Blood y col., 1988).

4.- Carne pálida blanda y exudativa: esta característica se valora mediante un índice de calidad de carne que combina color, pH a las 24 horas después de muerto y capacidad de retención de agua. Casi todas estas pruebas predicen fácilmente los ejemplos más graves del PSS, pero no son lo bastante precisas para identificar tendencias hacia el empeoramiento, lo cual restringe su valor en los programas de reproducción.

5.- Prueba de contracción por cafeína y Halotano: se realiza a partir de biopsias musculares de animales sospechosos. Las muestras de músculo son colocadas en solución salina normal oxigenada y conectada a un tensiómetro que mide la fuerza de desplazamiento. La tensión isométrica es grabada por un polígrafo durante la exposición

a 5% de halotano incrementándose progresivamente la cantidad de cafeína. La concentración de cafeína en 1 gramo, incrementa la tensión. Cuando la concentración de cafeína es menor que 4 mM y el músculo desarrolla más de 0.5 de tensión se expone al halotano considerándose a los cerdos MH (hipertermia maligna) susceptibles. Los heterocigotos tienen resultados intermedios (Shen y col., 1992; O' Brien, 1995).

6.- El uso de técnicas del ADN recombinante, como la PCR y los polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) (Fujii y col., 1991) y polimorfismos de conformación de cadena simple (SSCP) (Bauerová y col., 1995), permiten la detección de animales sanos, enfermos y portadores con una seguridad del 100 %. Los análisis de ADN se realizan directamente sobre el individuo del que se desea estudiar, sin posibilidad de error.

7.- PCR - RFLP: básicamente el método de diagnóstico desarrollado consiste en la amplificación específica de un fragmento del gen Ryr1, que contiene la mutación, mediante la técnica de PCR. Posteriormente se realiza una digestión con enzimas de restricción y se visualizan los resultados mediante electroforesis en gel de agarosa, diferenciándose claramente los tres genotipos (Calvo y col., 1997).

8.- PCR - SSCP: a diferencia de PCR-RFLP es un método que no requiere enzima de restricción y gel de agarosa. El costo del diagnóstico se reduce a la mitad, es más fácil y rápido que el método PCR-RFLP. Los fragmentos amplificados son visualizados en una corrida electroforética en un gel de acrilamida a 3 °C (Nakajima y col., 1996).

2. Justificación y objetivos

2. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.

2.1. Justificación.

El bienestar animal tanto en las explotaciones ganaderas, como en el transporte del ganado y en el sacrificio, es una preocupación creciente en la sociedad actual (Herranz Herranz A; López Colmenero J. 2003).

Habiéndose superado en los países desarrollados cuotas de producción agrícolas y ganaderas de autoabastecimiento, la sociedad actual es más exigente y ya no solo demanda producto, sino que exige calidad del producto y respeto en la forma de producir. En este sentido, la producción animal ha orientado sus líneas de trabajo a la calidad del producto (organoléptica, nutricional y sanitaria), y en la producción respetuosa hacia los animales (bienestar en la granja, en el transporte y en el matadero) y el medio ambiente.

Además el grado de estrés en el animal tiene una relación directa con la productividad y la calidad de la carne (Martín Bejarano, 2001) por lo que su impacto económico en el mercado es importante.

Por tanto, la ausencia de estrés en los animales es uno de los requisitos principales del bienestar animal y las normativas europeas son cada vez más exigentes en ese sentido (**Real Decreto 1135/2002 relativo a las normas mínimas de protección de cerdos; Reglamento 1/2005 del Consejo, de 22 de diciembre de 2004, relativo a la protección de los animales durante el transporte y las operaciones conexas; Real Decreto 54/1995, de 20 de enero, sobre protección de los animales en el momento de su sacrificio o matanza**)

En la actualidad, la investigación se dirige a estudiar que factores pueden producir estrés y sobre la búsqueda de parámetros indicadores de estrés.

2.2. Objetivos.

El objetivo principal de este proyecto ha sido estudiar el efecto del tiempo de transporte previo al sacrificio en el cerdo de abasto sobre parámetros indicadores de estrés (neutrófilos/linfocitos y proteínas de fase aguda).

Para realizar el trabajo hemos contado con la colaboración de una de las mayores empresas de porcino de la Región de Murcia, Juan Jiménez S.L. y del matadero de Lorca “La Comarca”.

Como objetivos particulares se han planteado los siguientes:

- Estudiar si otros factores, como el sexo, el gen del halotano o la conformación de animal-clasificación de la canal, afectan al nivel de bienestar de los animales.
- Analizar si la calidad de la carne, medida a través del pH, se ve afectada por la duración del transporte, del sexo, del gen del halotano o de la clasificación de la canal.
- Estimar la frecuencia del gen del halotano o gen receptor de la rianodina en una población porcina de cebo de la Región de Murcia.

3. Materiales y métodos

3. MATERIALES Y METODOS.

3.1. Material animal.

Para la realización de este proyecto se ha partido de 300 cerdos de cebo procedentes del cruzamiento Pietrain x (Landrace x LargeWhite). Estos cerdos provenían de tres granjas diferentes (100 animales por granja) propiedad de Juan Jiménez S.L. y cuya localización se muestra en la tabla1. Cuando los animales alcanzaron aproximadamente los 100 kg de peso vivo fueron cargados y transportados de madrugada en un camión con una densidad de carga de 0.42m²/cerdo y sacrificados en el matadero “La Comarca” en el termino municipal de Lorca en tres fechas diferentes para cada una de las tres granjas. (tabla1).

Tabla 1: Procedencia de los animales, fecha y hora de sacrificio, y (duración del transporte condiciones previas al sacrificio).

PROCEDENCIA	FECHA DE SACRIFICIO	HORA DE SACRIFICIO	TIPO DE TRANSPORTE	TIEMPO DE ESPERA
Casa de Hoya Vacas (Albacete)	4.07.07.	09:52am	Largo (3 h)	Largo
Pulgara (Murcia)	17.07.07.	09:52am	Corto (15 min)	Corto
Zarcilla de Ramos(Murcia)	25.07.07.	09:15am	Corto (30 min)	Largo

La duración del transporte previo al sacrificio fue variable según las granjas de origen. Los animales procedentes de dos de las granjas de Murcia fueron sometidos a transporte corto (7,5 km y 28,2 km respectivamente), mientras que los procedentes de Albacete los consideramos de transporte largo (220,5 km). La mitad de los animales de transporte corto cuando llegaron a matadero tuvieron un tiempo de espera previo al sacrificio largo (12 h) y la otra mitad corto (3 h); mientras que los animales cuya duración de transporte fue larga tuvieron siempre un tiempo de espera largo (12 h).

3. Materiales y métodos.

Cada una de las salas de espera del matadero tenía unas dimensiones de 14 metros de largo por 2 metros de ancho y albergaba entre 50 y 60 cerdos. Estaban provistas de duchas y el suelo era hormigonado y rugoso.



Foto 1: Sala de espera.

A través de un pasillo estrecho e inclinado, con paredes y suelo de hormigón, se facilitaba la conducción de los animales al punto de contención, donde estos pasaban a la noria de aturdimiento de CO₂. Tras su salida eran colgados y sacrificados por degüello. En el inicio del desangrado se tomaron dos muestras de sangre por animal en dos tubos de ensayo diferente, uno de ellos contenía anticoagulante EDTA, por lo que esta sangre se utilizó para la extracción del ADN genómico y para la realización de los frotis de sangre. El otro tubo contenía un coagulante natural de la sangre que facilitó la separación del suero para la posterior determinación de la proteína de fase aguda (PFA).

Del tubo con EDTA se obtuvo una alícuota que fue congelada a -20°C para su posterior extracción de ADN genómico y otra alícuota fue conservada a 4°C para la realización del frotis de sangre al día siguiente. Por otro lado, del tubo con coagulante se extrajo el suero sanguíneo y fue congelado también a -20°C para la posterior determinación de las PFA.

A continuación se detallan las distintas medidas que se llevaron a cabo.

3.2. Medida de pH.

El pH fue medido en un músculo *Semimembranosus* del jamón de los 300 animales a los 45 minutos del sacrificio en el túnel de refrigeración a -20 °C del matadero, con un pH-metro metálico portátil con sonda de acero inoxidable.

3.3. Pérdidas por oreo.

Al final de la línea de sacrificio se pesó la canal la canal caliente (PCC) y se volvió a pesar tras su refrigeración 24 horas a 4°C obteniéndose el peso de la canal fría (PCF). Las pérdidas por oreo se calcularon como $(PCC-PCF) \times 100/PCC$ (en %).

3.4. Relación neutrofilos/ linfocitos.

Para la determinación de la relación neutrofilos/linfocitos (N/L) se realizaron frotis de sangre para las 300 muestras de sangre de forma duplicada utilizando después para el recuento de neutrofilos y linfocitos aquellas tinciones que se observaban con mayor claridad.

Para la realización del frotis se coloca una gota de sangre cerca de uno de los extremos de un portaobjetos. Esta gota de sangre se pone en contacto con uno de los extremos menores de otro portaobjetos que se desliza sobre el primero de forma que la sangre se extiende a lo largo de este. Una vez hecha la extensión se aplica metanol para fijar la sangre y se deja secar aproximadamente 10 minutos.

A continuación se realiza la tinción de las células introduciéndolas durante media hora en una cubeta con colorante Giemsa al 10% y tampón fosfato al 0.1M y pH de 7.2. Pasada esta media hora se sacan los portaobjetos de la cubeta y se dejan secar para poder observar posteriormente las preparaciones al microscopio.

El recuento de neutrófilos y linfocitos se llevó a cabo con ayuda de una cámara de fotos digital acoplada a un microscopio, contando al menos 100 leucocitos por muestra. Se realizó el conteo de 30 muestras para cada uno de los días de recogida de la sangre, lo que supone un total de 90 muestras.

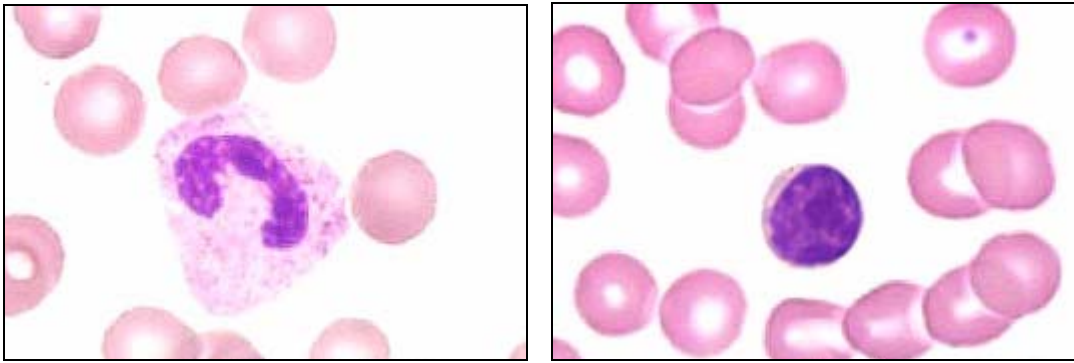


Foto2: Neutrófilo y linfocito.

3.5 .Diagnóstico del gen del Halotano.

El diagnóstico del gen del halotano se realizó de las 300 muestras de sangre, almacenadas a -20°C , mediante la técnica de PCR-RFLPs (polimorfismo en la longitud de los enzimas de restricción) que se detalla a continuación.

1.- Extracción del ADN genómico

Se realizó mediante el kit de extracción "SSS" de Genedan, el cual provee un método para la extracción del ADN genómico a partir de sangre total o medula ósea de mamíferos, saliva o semen. El protocolo implica los siguientes pasos:

- Lisis selectiva de los eritrocitos en la que los leucocitos (células que contienen el ADN) son separadas de los eritrocitos que son lisados.
- Lisis celular en la que los leucocitos son lisados con un detergente aniónico que solubiliza los componentes celulares.

- Precipitación de proteínas: se eliminan las proteínas citoplasmáticas y nucleares con precipitación salina.
- Precipitación del ADN: el ADN genómico se obtiene tras su precipitación con isopropanol observándose como un pellet blanco.
- Hidratación de ADN: el pellet de ADN es disuelto en agua estéril mediante incubación en la estufa a 65°C durante una hora u “overnight” a temperatura ambiente y agitación.

Para comprobar que el ADN había sido extraído se realizaron electroforesis durante 30 minutos en geles de agarosa al 0.8% y a 80V en los que se cargaron 5µl de ADN con ayuda de tampón de carga. Se visualizaron los geles después de estas electroforesis usando un equipo de fotodocumentación de Alphadigidoc RT.

En ocasiones también se utilizó el espectofotómetro de masas para cuantificar y determinar la purificación del ADN midiéndolo a diferentes longitudes de onda (260 y 280nm). Con las lecturas obtenidas se calculaba el cociente de absorbancia 260/280 indicando una alta pureza de la muestra en ADN si se obtenía un resultado comprendido entre 1,7 y 1,9.

2.- Amplificación del ADN por PCR.

La PCR consiste en una reacción en cadena de la polimerasa que permite amplificar una secuencia de ADN determinada por la unión de cebadores “primers” específicos. Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas, enzimas que catalizan la síntesis de ADN a partir de desoxirribonucleótidos y de una molécula de ADN plantilla o molde que es la que será “copiada”, para replicar hebras de ADN. Para ello se emplean ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas que permiten separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para que vuelvan a duplicarlas.

3. Materiales y métodos.

Se utilizó el mix red DNA polimerasa Hot Star (2X) de Genedan en un volumen final de reacción de 25 μ l. Dicho mix incluye 12.5 μ l de la Taq polimerasa, dinucleótidos, Cl_2Mg que actúa como cofactor de la Taq polimerasa y un colorante rojo que suple al tampón de carga, por lo que puede ser cargada directamente en el gel.

Se añaden 0.5 μ l de cada uno de los primers PO_3 y PO_4 al 10 μM . Estos primers son secuencias cortas de ADN (oligonucleótidos) que son, cada uno, complementarios a una de las dos hebras del ADN que se quiere amplificar. Los primers específicos para amplificar la secuencia del gen RYR1 tienen las siguientes secuencias:

Primer PO_3 , 5' TCC AGT TTG CCA ACG GTC CTA CCA 3'.

Primer PO_4 , 5' ATT CAC CGG AGT GGA GTC TCT GAG 3'.

Finalmente se añaden 6.5 μ l de agua estéril y 5 μ l de la muestra de ADN, y se ajusta con agua estéril hasta el volumen final de reacción.

Se utilizó un termociclador de Bio-Rad, que permite calentar y enfriar los tubos de reacción para controlar la temperatura necesaria en cada etapa de la reacción. La amplificación se llevo a cabo bajo las siguientes condiciones: Activación del enzima y desnaturalización del ADN a 95°C durante 7 minutos, 34 ciclos de tres pasos consecutivos de 30 segundos a 94°C (desnaturalización), 45 segundos a 64.4°C (T^a de annealing) y otros 45 segundos a 72°C (extensión) para que se produzca la unión de cebadores al lugar específico de la cadena de ADN, a continuación 7 minutos a 72°C, temperatura óptima para el enzima a la cual la velocidad de incorporación de nucleótidos es de 35-100 nucleótidos, y por ultimo descenso de la temperatura a 4°C durante un tiempo indefinido para desnaturalizar el enzima y poner fin al proceso.

Para comprobar que la amplificación se había producido se realizaron electroforesis a 120V durante 30 minutos en geles de agarosa al 1.5% en los que se cargaron 10 μ l del producto de la PCR. Los geles se visualizan a través del equipo de fotodocumentacion.

3. Materiales y métodos.

Todas aquellas muestras en las se obtenía una banda visible de 659 pares de bases fueron digeridas. No se digieren las muestras que no presenten la banda correspondiente a la amplificada o cuando el control negativo esté contaminado.

3.- Digestión con enzimas de restricción:

Las muestras amplificadas fueron digeridas con el enzima ALW21L. Para un volumen final de 20 μ l se empleo 2 μ l Búfer, 2 μ l de enzima, 16 μ l de agua estéril y 10 μ l del producto de la PCR. Se incubaron durante al menos 6 horas a 37°C en estufa.

Mediante electroforesis en un gel de agarosa de alta resolución al 1.8%, y de nuevo mediante electroforesis, se comprueba que se ha producido la digestión. Para ello se carga el gel con la totalidad del producto de la digestión y se deja correr durante al menos 45 minutos a 120V. Al igual que en la PCR se coloca en el gel un marcador molecular para identificar el tamaño de las bandas digeridas y se visualizan los geles a través del equipo de fotodocumentacion.

4.- Interpretación de los resultados.

El fragmento amplificado por PCR de 659 pares de bases con los primers específicos tiene una diana para el enzima ALW21L a 135 pares de bases en el extremo 5'. Además el cambio del nucleótido responsable de la mutación origina la aparición de una diana para el ALW21L a 493 pares de bases del extremo 5' del fragmento amplificado, que nos sirve para comprobar que la digestión ha funcionado.

Por lo tanto aparecen dos bandas (524 y 135 pb) si el animal es homocigoto NN, cuatro bandas si es heterocigoto Nn (524, 358,166 y 135 pb) y 3 bandas (358,166 y 135 pb) si es homocigoto nn.

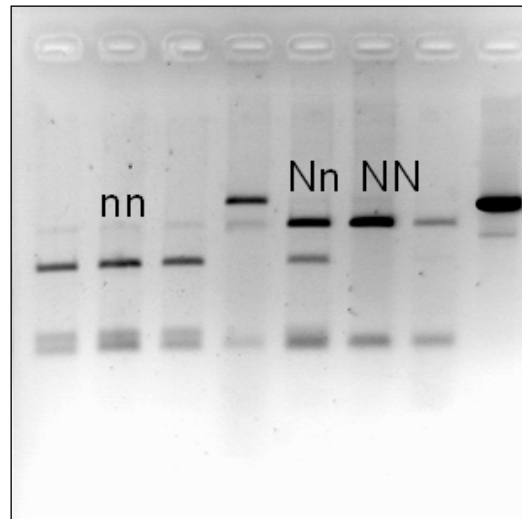


Foto3: Diferentes genotipos observados.

3.6. Proteínas de Fase Aguda (PFA)

Esta determinación se realizó en el laboratorio de la granja experimental de la facultad de veterinaria de la Universidad de Murcia. Se analizaron las proteínas Amiloide-A- Sérico, Haptoglobina y Proteína C- Reactiva (CRP) mediante un método Elisa ("Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay"), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas que se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto, por ejemplo un colorante, puede ser medido espectrofotométricamente.

Para la realización de este ensayo se usaron diferentes kit de Tridelta, específicos para cada una de las proteínas a determinar. Se analizaron 30 muestras para cada una de las fechas d recogida (15 hembras y 15 machos castrados) además de todas las muestras que habían sido diagnosticadas positivas para el gen del halotano (17 muestras).

3.6.1. Proteína C- Reactiva (CRP) y Amiloide A-sérico.

Se utilizó el kit Porcine C- Reactive Protein Assay (ref: TA 901) para el caso de la CRP, y el Tridelta Phase Range Serum Amyloid A Assay (Tridelta Development Limited, Irlanda, ref: TA 801) para Amiloide. Ambos kit utilizan el tipo de ensayo ELISA sándwich (ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos) el cual es ampliamente utilizado.

Los pocillos de la placa ELISA contienen un anticuerpo anti-antígeno a los que se añaden la muestra problema, previamente diluida según indica el protocolo del kit, en la que se encuentra el antígeno que será retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo. También se colocan en la placa, por duplicado y diluidos, los calibradores proporcionados por el kit y cuya concentración en PFA es conocida. Después de un lavado que elimina el material no retenido se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno conjugado con un enzima que marcará al antígeno. Así pues, cada molécula de antígeno estará unida a un anticuerpo en la base que lo retiene y un segundo anticuerpo, al menos, que lo marca. Después de un segundo lavado se aplica una solución de revelado que revela el color del enzima en el caso de que el "sándwich" anticuerpo-antígeno se haya producido. Una vez que la placa esta revelada se añade una solución de paro para que desnaturalice al enzima y finalice la reacción.

La intensidad del cambio de color producido es proporcional a la concentración de CPR y Amiloide presente originalmente en la muestra. Esta intensidad se registra a través de una lectura de absorbancia a 450 nm utilizando un equipo de lector de ELISA en el que se coloca la placa. Se considera una muestra positiva para la CPR y Amiloide aquellas que tienen un valor de absorbancia igual o superior al de los calibradores. Como la concentración de los calibradores es conocida se realiza una curva de regresión en la que, interpolando a partir de los datos de absorbancia obtenidos, se pueden obtener las concentraciones en CPR para cada una de las muestras, multiplicándolas por el factor de dilución correspondiente.

3. Materiales y métodos.

Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo.

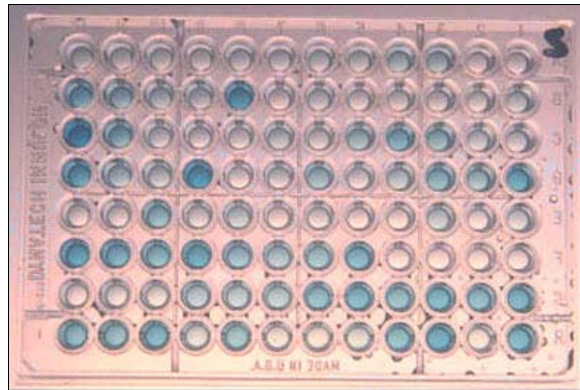


Foto4: Revelado en placa ELISA.

3.6.2. Haptoglobina.

Para la determinación de esta proteína se utilizó el kit comercial Phase Haptoglobin (Tridelta Development Limited, Ireland). Se trata de un ensayo colorimétrico basado en la determinación de la actividad peroxidasa de los complejos haptoglobina- hemoglobina a pH ácido que fue desarrollado por Eckersall y col (1999). En la placa ELISA se coloca el suero sanguíneo y se añaden los reactivos proporcionados en el kit. El incremento en absorbancia que se produce durante los 50 segundos posteriores a la adición del sustrato es medido a 600 nm y usado para calcular la curva de calibración que permitirá determinar la concentración de haptoglobina en muestras de concentración desconocida.

3.7. Análisis estadísticos.

Los datos fueron analizados usando el paquete estadístico SPSS 15.0 (SPSS versión 15, 2006). Las medias mínimo cuadráticas de las distintas variables para los diferentes efectos fueron obtenidas a partir del procedimiento GLM - análisis de la varianza según el siguiente modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + S_j + H_k + C_l + I_{ijkl} + \varepsilon_{ijkl}$$

En el que, μ es la media global, T_i el efecto de la duración de transporte (largo vs. corto), S_j el efecto del sexo (macho, hembra o macho castrado), H_k el efecto del gen del halotano (Nn vs. NN), C_l el efecto de la clasificación subjetiva de la canal (de 1 a 5) e I es la interacción correspondiente a las posibles combinaciones de los efectos principales cuando es significativa, ε_{ijkl} es el error. Para la variable pérdidas por oreo se incluyó como covariable el peso de la canal caliente.

Para estimar si la frecuencia de la clasificación de la carne PSE variaba en función del tipo de transporte se realizó un test Chi-Cuadrado.

4. Resultados y discusión

4. RESULTADOS Y DISCUSION.

El objetivo principal del presente proyecto es estudiar el efecto de la duración del transporte previo al sacrificio del cerdo de abasto sobre la calidad de la canal en cuanto a pérdidas por oreo se refiere y la de la carne medida a través del pH y sobre parámetros indicadores de estrés (relación neutrófilos/linfocitos y proteínas de fase aguda). Además se estimará si existe un efecto del sexo, del gen del halotano y de la clasificación de la canal sobre las variables anteriormente indicadas.

Previamente se hará un estudio de la estima de la frecuencia del gen del halotano y de la relación existente entre los distintos factores de influencia considerados.

4.1. Frecuencia del gen del halotano.

Se han genotipado 278 animales de los cuales 17 eran Nn y el resto NN, por tanto la frecuencia del gen del halotano (n) en una muestra de cerdos de abasto procedente de una de las principales empresas de Murcia es 3,06%. No se encontraron animales homocigotos recesivos (nn).

Estos resultados no son inesperados ya que, por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), hoy se diagnostican a los cerdos como sanos (homocigotos dominantes), portadores (heterocigotos) y enfermos (homocigotos recesivos) y en las granjas suelen mantenerse las hembras reproductoras con genotipo NN. De esta manera se evitan los posibles problemas en la carne relacionados con el estrés del porcino pues los avances en el campo de la genética molecular (De Vries y col., 2000) han puesto claramente en evidencia el descubrimiento de la equivalencia entre el PSS y la mutación del gen Ryr1 en el nucleótido 1843 (Fujii y col., 1991). La estrategia de selección de las empresas genéticas parece ser la eliminación del gen Ryr1 con la mutación 1843 en las líneas materna y paterna (Webb, 1996), si bien se sigue manteniendo en la línea paterna en heterocigosis por su efecto beneficioso que presenta en el porcentaje de magro de las canales.

Quiñonero (2006) encuentra una frecuencia del gen del Halotano del 4,3% en una población de 58 hembras reproductoras Lancrace x Large White de una granja ubicada en Cartagena (Murcia). De los animales genotipados, 5 fueron heterocigotos Nn y 53 homocigotos dominantes NN, no existiendo animales homocigotos recesivos nn. Dicha frecuencia podría considerarse equivalente a la observada en nuestro estudio, sin embargo hay que tener en cuenta que en este caso se trataba de la frecuencia en las cerdas reproductoras mientras que nosotros trabajamos con el cerdo de cebo, por lo que una frecuencia del gen del halotano en las reproductoras del 4,3% es baja comparada con una frecuencia del 3% en el cebo. Estas diferencias pueden ser debidas a que, a pesar de ser realizados ambos trabajos en Murcia, se trata de empresas diferentes.

Por otro lado, Gispert y col. (2005) encuentran en una población de 1331 cerdos de cebo, muestreados en una región catalana, una frecuencia del gen del Halotano (n) muy alta (32%), siendo 82 de los animales nn, 688 Nn y 561 NN.

4.2. Efecto de la duración del transporte, del sexo y del gen del halotano sobre la clasificación de la canal.

Se observa un efecto del sexo sobre la clasificación de la canal (tabla 1), siendo las hembras mejor evaluadas que los machos castrados. En la actualidad existe la tendencia de castrar a los machos para evitar problemas de olor sexual en la carne, por este motivo nos encontramos con muy pocos machos enteros, no pudiendo encontrar diferencias respecto a los otros tipos de animales por problemas de estimación de su valor medio.

Tabla 1. Media mínima cuadrática (MMC) y error típico (E.T.) de la clasificación de la canal para los distintos sexos

Sexo	Número de animales	MMC	E.T.
1	8	1,98 ^{ab}	0,28
2	193	2,17 ^b	0,06
3	91	2,47 ^a	0,08

1= macho, 2= hembra, 3= macho castrado. Clasificación de canal de 1 = la mejor a 5 = la peor. * Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

En cuanto a la influencia del gen del halotano sobre la clasificación de la canal, no se detectaron diferencias significativas entre los animales heterocigotos Nn respecto a los NN, si bien solo había 17 animales heterocigotos (Nn) frente a 261 animales homocigotos dominantes (NN). Por tanto el posible efecto beneficioso que pudiera tener el gen del halotano sobre la clasificación de la canal no pudo ser estimado y, en cualquier caso, su frecuencia en esta población es tan baja que no llega a traducirse en una mejoría de la clasificación de la canal. Tampoco se ha encontrado un efecto significativo de la duración del transporte sobre la clasificación de la canal.

Finalmente, se observa un efecto significativo del peso de la canal caliente sobre la clasificación de la canal, estimándose un descenso de $-0.021 (\pm 0,005)$ en su clasificación por cada kilo que incrementa su peso.

4.3. Calidad de canal.

Un parámetro indicador de la calidad de la canal son las pérdidas por oreo, siendo deseable que dichas pérdidas sean lo menor posible. La canal ideal sería aquella que fuese más magra y que a su vez tuviese las menores pérdidas por oreo, si bien es de esperar un correlación negativa entre ambos caracteres, ya que las canales que tienen una mayor cobertura de grasa tienden a evaporar menor cantidad de agua durante el proceso de la refrigeración. En nuestro proyecto no se observó una correlación entre las pérdidas por oreo y la clasificación de la canal. Las canales estudiadas presentaron unas pérdidas por oreo promedio de 2%, con un valor mínimo de 1,92 % y un máximo de 3,32%, mostrando una variación baja (coeficiente de variación 4,27%) en parte debido a que se trataba de animales del mismo tipo genético con un peso al sacrificio muy estandarizado.

4.3.1. Efecto de la duración del transporte.

En la tabla 2 se muestran las medias mínimo cuadráticas de las pérdidas por oreo para la duración de transporte corta y larga, y aunque no se observó una diferencia significativa al nivel de significación del 5%, sí se observó una tendencia a ser distintas

($P < 0,06$) si bien en cualquier caso la diferencia fue muy pequeña (0.02%) siendo mayor para el transporte largo.

Tabla 2. Media mínima cuadrática (MMC) y error típico (E.T.) de las pérdidas por oreo para diferente duración de transporte

Duración transporte	Número de animales	MMC	E.T.
Largo	92	2.02	0,009
Corto	199	2.00	0,006

Gonsálvez y col. (2006) señalan que si bien la duración del transporte influye en las pérdidas de peso de los animales y en el rendimiento del transporte, otros factores como la estación del año o la carga de los animales de distintos orígenes repercuten de igual manera.

4.3.2. Efecto del sexo, del gen del halotano y de la clasificación de la canal.

No se encontraron diferencias significativas en las pérdidas por oreo de las hembras, los machos y los machos castrados. En principio, cabría esperar un efecto del sexo en cuanto que hubiese diferencias significativas en la clasificación de la canal, pero tampoco se ha detectado un efecto de la clasificación de la canal sobre las pérdidas por oreo. Armero y col. (1999) no encontraron un efecto significativo del sexo sobre las pérdidas por goteo del *longissimus dorsi*, manifestando que no existió una correlación entre las pérdidas por goteo con el contenido de grasa intramuscular y el espesor de grasa dorsal. Finalmente no se ha podido detectar un efecto del gen del halotano sobre las pérdidas por oreo por contar solamente con 17 animales portadores del gen en heterocigosis.

4.4. Calidad de carne.

La calidad de carne fue evaluada mediante el pH medido al final de la línea de sacrificio (45 minutos post-mortem) en el músculo Semimembranosus (pH_{45Sm}). En la industria cárnica se han desarrollado diversos métodos para evaluar la calidad de la carne, entre los que se encuentran las medidas de pH, conductividad eléctrica, color, capacidad de retención de agua y pérdidas por exudado. Para que un método de predicción de la calidad de la carne sea interesante ha de ser rápido y de fácil aplicación, económico y que no destruya la canal. Por ello, en el presente proyecto se ha elegido como método la medida de pH.

Está demostrado que el descenso del pH muscular, el cual depende de la cantidad de ácido láctico producido a partir del glucógeno durante la glicólisis anaeróbica, es uno de los cambios post-mortem más significativos que se dan en el músculo durante su conversión en carne. La velocidad con que desciende el pH una vez que el animal ha sido sangrado y el límite hasta el que desciende son muy variables. (Forrest, A. 1975; Lawrie, R.A. 1974). La disminución del pH en el estado post-mortem está influenciada por las características genéticas del animal y la temperatura de la canal (una rápida congelación causa la caída mas lenta del pH). (Libby, J.A.1991).

El descenso del pH post-mortem se lleva a cabo de manera gradual, asumiendo que las canales se someten a refrigeración después del sacrificio. Antes del sacrificio el pH normal del músculo oscila entre 7.3-7.5; disminuye hasta 5.6-5.7 trascurrido 6 a 8 horas desde el sacrificio, para alcanzar un pH final (generalmente 24 horas postmortem) de aproximadamente 5.3 – 5.7.

En algunos animales el pH sólo desciende unas pocas décimas durante la primera hora después del sacrificio, probablemente como consecuencia de un agotamiento de las reservas de glucógeno, permaneciendo estable con valores relativamente altos y dando un pH final que varía entre 6.5 – 6.8, en estos casos nos encontramos con carnes oscuras, firmes y secas (DFD), en las que no hay desnaturalización de proteínas y el agua queda fuertemente ligada, existiendo un alto riesgo microbiológico. En otros animales el pH desciende rápidamente hasta 5.4 – 5.5

en la primera hora después del sangrado; debido a un metabolismo acelerado que presentan aquellos animales que son susceptibles al estrés, en estos casos se traduce en una calidad de carne defectuosa conocida como PSE o carne pálida, blanda y exudativa, en la que tiene lugar una desnaturalización rápida de las proteínas, entre ellas de la mioglobina, unida a la liberación de agua; la carne de estos animales presenta un pH final que varía entre 5.3 – 5.6.

En el presente proyecto, el pH presentó un valor medio de 6,38 con un valor mínimo de 5,36 y un máximo de 6,99, su coeficiente de variación fue muy bajo (3,8%) por lo que la mayoría de los animales estaban dentro del rango de pH considerado como normal

La calidad de la carne de un animal depende de sus características intrínsecas (tipo genético y sexo, presencia del gen del halotano o del gen productor de la carne ácida, entre otras) y de las condiciones a las que se ve sometido (alimentación, manejo en granja y previo al sacrificio). A continuación se detalla el efecto de la duración del transporte previo al sacrificio, del sexo, del gen del halotano y de la clasificación subjetiva de la canal.

4.4.1. Efecto de la duración del transporte.

No se han encontrado diferencias significativas entre las distintas duración de transporte consideradas en el presente proyecto. Gispert y col. (2005) comparan dos duraciones de transporte (corto ≤ 2 horas vs largo ≥ 2 horas) encontrando que una menor proporción de carne normal, en cuanto a los valores de conductividad eléctrica y pH final, se encuentra en transportes largos comparados con los cortos.

Se determinó la influencia del tipo de transporte en la aparición del riesgo de carnes PSE (pálida, blanda y exudativa), considerando como tal aquellas canales que tenían un pH a los 45 minutos inferior a 6.

Por dificultades en el matadero no se realizó la observación de dichas canales que hubiese sido necesaria para poder clasificarlas definitivamente como PSE. Las características PSE aparecen principalmente en la musculatura del tronco (lomo) y jamón, mientras que otras zonas musculares son normalmente menos afectadas. Los cerdos grasos dan lugar a carne PSE con menor frecuencia que los magros. (Prandl, O. Fisher, A. 1994).

Se observa que no existe tal dependencia ya que se obtiene un valor de probabilidad para test Chi-cuadrado muy alto ($p= 0,8598$). Estos resultados están en desacuerdo con los obtenidos por Fábrega y col (2007) en los que obtienen que en transportes de mayor duración el riesgo de obtener carnes DFD es 2,25 veces mayor comparado con transportes más cortos, sin embargo el riesgo de obtener PSE disminuye en estos transportes. Del mismo modo, otros autores Malmfors, 1982; Martoccia, Brambilla, Macri, Moccia y Cosentino, 1995) concluyen que un incremento en el tiempo de transporte aumenta la incidencia de carnes DFD. Sin embargo otros autores (Warris, Broww, Bevis, y Kestin (1990) afirman que periodos de transporte de 1 a 4 horas son demasiados cortos para afectar a la incidencia de carnes de cerdo DFD.

Esta diferencia de nuestro estudio con respecto al de Fábrega podría ser debida a que el número de canales clasificadas como PSE en nuestro estudio es muy pequeño (14canales) mientras que Fábrega y col. (2007) analiza un total de 60 animales por transporte.

La carne porcina PSE es causada por una combinación de factores genéticos y factores internos en el proceso de sacrificio del animal, tales como el uso excesivo de picanas eléctricas y a los fallos en el proceso de enfriado.(Grandin, T. 1991). Este defecto aparece con elevada frecuencia, en determinadas razas de cerdo, que en general son fruto de una extrema selección en busca de un mayor aprovechamiento de la dieta y de la reducción del tejido adiposo subcutáneo. Esta selección conlleva al incremento de la propensión al stress y a la hipertermia (aumento de la temperatura corporal por excitación). (Swatland, H.J. 1988).

La incidencia de PSE es muy variable, en un estudio realizado en cinco mataderos de Cataluña se estimó en 35 % (Gispert y col. 2005). Este proceso es más frecuente en los animales portadores del gen del halotano. Pese a esto, los animales libres de este gen también pueden producir carnes PSE si sufren un manejo estresante intenso justo antes del sacrificio (durante la conducción de los animales al aturdimiento y durante el propio aturdimiento).

Werner y col. (2007) han observado que se ha producido una disminución de la mortalidad en el transporte de 1999 a 2003 como consecuencia de nuevas directrices en la Unión Europea y señalan que unas condiciones inadecuadas tanto en el transporte de larga duración como en los de corta pueden traducirse en un incremento de de la mortalidad en el mismo y problemas de calidad de la carne.

4.4.2. Efecto del sexo.

No se han observado diferencias significativas entre hembras, machos y machos castrados. Otros autores (Oliver y col, 1994; Armero y col., 1999) tampoco observan diferencias significativas entre machos, hembras y machos castrados, para la mayoría de las medidas de calidad de carne, entre estas la medida del pH.

Sin embargo otros autores si encuentran diferencias entre los sexos. Asencios (2004,) quien estudió la variación del pH en 446 cerdos sacrificados con aturdimiento eléctrico y sin aturdimiento (78 animales machos enteros y 145 animales hembras en ambos grupos respectivamente), concluye que el sexo influye en el valor final del pH, obteniéndose un pH final mayor en machos enteros que en hembras, 6.00 y 5.44 respectivamente para el grupo de animales sacrificados con aturdimiento eléctrico, 6.00 y 5.24 en machos enteros y hembras respectivamente para los animales sacrificados sin aturdimiento.

Guardia y Gispert (2005) encuentran que el género también afecta en la aparición de carnes de cerdo DFD. En un estudio realizado en 1331 animales encuentran que las hembras y los machos castrados tienen una probabilidad de producir DFD un 7% mayor que en caso de machos enteros

4.4.3. Efecto del gen del halotano.

No se observan diferencias significativas en el pH_{45Sm} de los animales Nn respecto a los NN.

El Síndrome Estrés Porcino (PSS) o Hipertermia Maligna (MH) es una enfermedad hereditaria monogénica recesiva que se caracteriza por un desorden neuromuscular (Shen y col, 1992), con un locus autosomal único, denominado inicialmente gen halotano (HAL) y actualmente llamado gen receptor de la ryanodina "Ryr1" (Dekkers, 1999). El PSS se caracteriza por producir la muerte en los cerdos homocigotos recesivos, así como la aparición de canales con carne pálida, blanda y exudativa (PSE) alcanzando valores inferiores a pH 6, antes de la primera hora después del sacrificio, o carne oscura, dura y seca (DFD), con menor frecuencia, en cerdos homocigotos recesivos y heterocigotos. En este sentido, cabría esperar que los animales portadores de dicho gen presentasen un menor valor de pH, pero como ya hemos comentado la frecuencia de dicho gen en nuestra población fue baja para realizar una buena estima de dicho efecto.

Gispert y col. (2005) encuentran un pH superior para canales NN (5,9) comparado con los de las canales Nn y nn (6.5). Estas diferencias con respecto a nuestro estudio podrían ser debidas a que el número de animales es mucho menor (300 vs 1131). Así mismo el número de animales genotipados como Nn también es más reducido (17 vs 688)

4.4.4. Efecto de la clasificación de la canal.

Se obtienen diferencias significativas para el pH en las diferentes clasificaciones de canales (tabla 3). Se observa que el pH es mayor en las canales 3 y 4 que se corresponden con canales clasificadas como intermedias-malas en cuanto al engrasamiento y la conformación, mientras que las canales clasificadas como mejores presentaron valores más bajos de pH.

Estos resultados están en concordancia con los de Oliver y col. (1993), Affentranger y col. (1996) y Armero y col (1999), quienes observan que las razas más conformadas (Blanco Belga, Pietrain) presentan menores valores de pH inicial respecto a aquellas que están menos conformadas (Duroc, LargeWhite)

Tabla 3. Media mínima cuadrática (MMC) y error típico (E.T.) del pH para las diferentes clasificaciones de la canal

Clasificación de la canal	Número de animales	MMC*	E.T.
1	44	6,239 ^b	0,057
2	151	6,337 ^{ab}	0,036
3	81	6,456 ^a	0,044
4	11	6,577 ^a	0,104
5	5	6,256 ^{ab}	0,1

* Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$). Clasificación canal de 1= mejor a 5= peor.

4.5. Relación neutrófilos/ linfocitos.

El valor medio de la relación neutrófilos/linfocitos fue 0,66, con un mínimo de 0,44 y un máximo de 1,00, su coeficiente de variación fue 28,8%. Se observaron diferencias significativas para la clasificación de la canal y el efecto del gen del halotano.

Siegel (1995) afirma que dicha relación es uno de los indicadores de estrés a largo plazo más aceptados en mamíferos. Gross y Siegel (1993) determinan tres valores característicos para la relación neutrófilos/linfocitos: 0,2 para estrés bajo, 0,5 para estrés “óptimo” y 0,8 para estrés alto.

4. Resultados y discusión.

En cerdos sometidos a estrés los aumentos entre el cociente neutrofilos y linfocitos reflejan aumento a corto plazo del nivel de corticosterona lo que produce neutrofilia y linfopenia (Widowski y col. 1989).

Puppe y col. (1997) determinan que el cociente entre neutrofilos y linfocitos se incrementa significativamente un día después del destete.

Varios estudios (Gross y Siegel. 1983; Brown-Borg y col. 1993, Dhabhar y col.1996; Dee.1999) realizados en un gran número de especies han puesto de manifiesto que el incremento de la concentración de corticoides, ya sea de origen endógeno o exógeno, resulta en una redistribución de las células blancas implicadas en la respuesta inmunológica contra antígenos. Esta redistribución implica un incremento de los neutrofilos y un descenso de los linfocitos y, por tanto, mayores valores del cociente neutrofilos/linfocitos.

Por otro lado, se ha demostrado que en cerdos expuestos a estrés los cambios en la relación neutrofilos/linfocitos reflejan cortas elevaciones del cortisol del plasma sanguíneo (Widowski y col. 1989; Moore y col. 1994; Wallgren y col. 1994) cuando se producen aumentos de los neutrofilos y disminución de los linfocitos. Esto sugiere que en situaciones controladas, un incremento del ratio N/L puede ser relacionado con el incremento del estrés a largo plazo de los cerdos.

Otros autores (Barnet y col. 1983; Fernández y col. 1994) encuentran que la respuesta al estrés en cerdos es paralela a la elevación de la glucosa en el plasma sanguíneo.

Con todo esto podemos concluir que la relación N/L es una herramienta sencilla, económica y muy útil para ser usada como indicador de estrés a largo plazo en el ganado porcino coincidiendo con diversos autores (Widowski y col. 1989; Metz and Gonyou. 1990; Moore y col. 1994).

4.5.1. Efecto de la duración del transporte.

No se encontró un efecto de la duración del transporte sobre N/L. Este resultado era esperable, ya que, como hemos comentado anteriormente, dicha relación es mejor indicador de estrés a largo plazo, mientras que el estrés producido como consecuencia del transporte se manifiesta a corto plazo. Probablemente, ésta sea la causa de que ningún trabajo incluya dicho parámetro como indicador de estrés por el transporte, si bien nosotros consideramos oportuno medirlo porque se iban analizar otros efectos al mismo tiempo que corroboraron que no había diferencias para las condiciones de transporte consideradas.

4.5.2. Efecto del sexo.

No se encuentran diferencias significativas para los diferentes sexos. Van der Wal y col. (1999) observan que en ausencia de estrés adicional no hay diferencias significativas entre sexos pero cuando se produce un estímulo de estrés los cerdos machos son más resistentes que las hembras. Además, Pérez y col. (2002) encuentran que las hembras son más sensibles al estrés físico producido por el transporte que los machos. Van der Wal y col (1999) también encuentran que las cerdas jóvenes son más afectadas por cortos periodos de estrés que los lechones machos.

Guardia y col (1996) encuentran que el sexo influye en el riesgo de obtener carne de cerdo DFD, determinando que las hembras tienen una probabilidad de producir carne DFD aproximadamente un 7% mayor que los machos enteros estudiando este efecto en 116 transportes con un total de 15.695 animales en cinco mataderos españoles.

Sin embargo, Babol y Squieres. 1995; Sather y col. 1995; Warris. 1996 sostienen que los machos enteros son más agresivos que las hembras. Este comportamiento causa en lechones confrontaciones y peleas entre ellos generando mayores daños en la piel en los periodos previos al sacrificio. Como consecuencia de esto, dichos animales tendrán un mayor riesgo de dar carnes DFD, por agotamiento de glucógeno en el músculo debido al estrés y la actividad física asociada con las peleas.

Por tanto no parece clara la influencia del sexo en la aparición de un mayor grado de estrés en el porcino y futuros estudios deben ser realizados para aclarar este hecho.

4.5.3. Efecto del gen del Halotano.

En la tabla 4 se observa que la relación neutrofilos/ linfocitos es mayor en los animales heterocigotos (Nn) que en los homocigotos (NN). Dado que los animales portadores del gen del Halotano son más susceptibles al estrés, cabe esperar que la relación neutrofilos/ linfocitos para estos animales sea mayor.

Tabla 4. Media mínima cuadrática (MMC) y error típico (E.T.) de la relación neutrofilos/linfocitos para los diferentes genotipos.

Genotipo	Número de animales	MMC*	E.T.
Nn	7	0,976 ^a	0,077
NN	81	0,710 ^b	0,031

* Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Por tanto, si consideramos que la relación neutrofilos/ linfocitos es un buen indicador a estrés a largo plazo, podemos afirmar que los animales portadores del gen del halotano son también más susceptibles al estrés crónico.

4.5.4. Efecto de la clasificación de la canal.

La relación neutrofilos/linfocitos fue mayor para las canales clasificadas como 1 y 3 que para las canales clasificadas como 2 (Tabla 5). Resulta difícil justificar dicho resultado ya que parece no mostrar ninguna relación entre la clasificación de la canal y la relación N/L. Tampoco se encuentra ningún trabajo en que se estudie la variación de N/L en función de la clasificación de la canal o incluso según el tipo genético considerado. Por tanto consideramos que trabajos futuros deben ser realizados para aclarar este apartado.

Tabla 5. Media mínima cuadrática (MMC) y error típico (E.T.) de la relación neutrófilos/linfocitos para las diferentes clasificaciones de la canal.

Clasificación de la canal	Número de animales	MMC*	E.T.
1	12	0,905 ^a	0,081
2	49	0,617 ^b	0,048
3	25	0,873 ^a	0,074
4	2	0,863 ^{ab}	0,101
5	2	0,808 ^{ab}	0,099

* Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$). Clasificación canal de 1= mejor a 5= peor.

4.6. Proteínas de fase aguda.

En este apartado solo se incluye el efecto de los diferentes transportes (largo vs corto) sobre las proteínas de fase aguda por no aparecer diferencias significativas para el resto de efectos considerados.

Estas proteínas han sido ampliamente estudiadas por su función como indicadores de estrés a corto plazo. Así por ejemplo, las proteínas utilizadas por Lampreave y col. (1994), Lipperheide y col. (1998) y Cerón y col. (2006) en sus estudios han sido: proteína C-Reactiva, haptoglobina, amiloide A-sérica, alfa 1 glicoproteína ácida, Pig-MAP, ceruloplasmina y fibrinógeno, destacando en cualquier caso la gran variabilidad que presentan. En el presente trabajo se han estudiado la proteína C-reactiva, Amiloide A- sérica y Haptoglobina.

Eckersall. (2002) y Murata y col. (2004) indican que las proteínas de fase aguda son un buen indicador de bienestar animal.

Varios estudios recientes confirman que el nivel de las proteínas de fase aguda puede aumentarse en cerdos como consecuencia de su transporte por carretera (Eurell y col, 1992; Murata y Miyano 1993; Toussaint y col 1995).

4.6.1. Proteína C-reactiva.

El valor medio de la proteína C-reactiva fue 365,99 $\mu\text{g/ml}$, con un valor mínimo de 7,98 $\mu\text{g/ml}$ y un máximo de 2.107,54 $\mu\text{g/ml}$, su coeficiente de variación fue 92,75 %, lo que pone de manifiesto la gran variabilidad de esta proteína. Este rango de valores es aun más amplio que el encontrado por Piñeiro (2006) al estudiar la respuesta de las proteínas de fase aguda al transporte por carretera.

No se observan diferencias significativas para las duraciones de transporte consideradas sobre la concentración de la proteína C-reactiva (tabla 6).

Tabla 6. Media mínima cuadrática (MMC) y error típico (E.T.) de la proteína C-reactiva para los diferentes transportes.

Duración del transporte	Número de animales	MMC	E.T.
Largo	31	311,010	80,66
Corto	75	410,407	49,014

Estos resultados están en desacuerdo con los obtenidos por Piñeiro y col. (2006) que señalan que el transporte ejerce un efecto sobre las PFA (haptoglobina, amiloide A-sérica, proteína C-reactiva, Pig-MAP), tanto su duración como en las condiciones en las que se realiza, por lo que encuentran un mayor incremento de las PFA en transportes más cortos (24 horas vs 48 horas) pero que se realizaron en peores condiciones. (1.5m²/lechón, ausencia de serrín, agua y alimento vs 2m²/lechón, serrín y disponibilidad de alimento y agua).

Estas diferencias podrían ser debidas a que el número de horas consideradas en el presente estudio para el transporte largo es mucho menor (3 h), lo que sugiere que la proteína C-reactiva necesita tiempos de transporte superiores para elevar su concentración. Deberían realizarse estudios posteriores para conocer si esto es debido a la intensidad del factor estresante o la falta de tiempo para aumentar su concentración.

A su vez los resultados pueden verse afectados por la gran variabilidad de concentración que presenta esta proteína en respuesta a una fase aguda, ya que su concentración basal puede aumentarse hasta 1000 en animales enfermos (Kushner et al., 1981).

4.6.2. Amiloide A-sérico.

Su valor medio fue 45,63 mg/l con un rango de valores que osciló de 2,8 mg/l a 265,57 mg/l. y un coeficiente de variación de 118,6%. Este amplio rango de valores para Amiloide A-sérico también lo encuentra Piñeiro y col. (2006) al estudiar la respuesta de las proteínas de fase aguda para el transporte por carretera de cerdos.

En la tabla 7 se muestran los valores medios para los diferentes tipos de transporte, observándose que el valor de Amiloide A-sérico fue 2,2 veces superior ($P < 0,05$) en el transporte largo frente al corto. Este resultado está en concordancia con lo encontrado por Piñeiro y col. (2006), al observar que esta proteína aumentaba con la duración del transporte al comparar un transporte de 24 horas de duración con otro de 48 horas.

Tabla 7. Media mínima cuadrática (MMC) y error típico (E.T.) de la proteína Amiloide A-sérico para los diferentes transportes.

Duración del transporte	Número de animales	MMC*	E.T.
Largo	29	77,052 ^a	11,284
corto	75	35,453 ^b	5,962

* Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Estas diferencias encontradas en el presente estudio entre ambas proteínas sugieren que la proteína C-reactiva necesita tiempos de transportes superiores a 3 horas, para aumentar su concentración basal, al contrario que la Amiloide A-sérica en cuya concentración si se observan diferencias para los distintos transportes considerados.

4.6.3. Haptoglobina.

El valor medio de la haptoglobina fue 2,00 mg/ml, con un mínimo de 0,07 mg/ml y un máximo de 3,36 mg/ml. Esta proteína fue la que mostró un menor rango de variación (47,7%). Este rango de valores coincide con los encontrados con otros autores Piñeiro y col. (2006) al estudiar la respuesta de las proteínas de fase aguda para el transporte por carretera de cerdos.

La concentración de haptoglobina aumentó 1,4 veces ($P < 0,05$) en el transporte largo frente al corto (tabla 8).

Tabla 8. Media mínima cuadrática (MMC) y error típico (E.T.) de la haptoglobina para los diferentes transportes.

Duración del transporte	Número de animales	MMC*	E.T.
Largo	31	2,640 ^a	0,180
Corto	60	1,879 ^b	0,107

* Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Saco y col. (2003) estudiaron el efecto del transporte sobre las proteínas de fase aguda (haptoglobina y Pig-MAP) y sobre el cortisol. En este trabajo se comparaban dos tipos de transporte: transporte corto (1 hora y 15 minutos) acompañado por un tiempo de descanso en matadero corto (2 horas) frente a un transporte largo (6 horas) con tiempo de descanso largo (14 horas) y observaron que cuando el transporte era corto no se producía un incremento ni antes ni después del transporte de las PFA, pero sí del cortisol, mientras que si el transporte era largo había un incremento de las PFA pero no del cortisol. Por tanto, parece que ante una situación de estrés primero se produce un incremento de las hormonas adrenales que después volverían a su nivel basal y la respuesta metabólica de incremento de las PFA sería posterior. A su vez en ese trabajo mostraban una tendencia a ser menores los niveles de PFA en los animales portadores del gen del Halotano, a pesar de que cabría esperar que los animales portadores de dicho gen fuesen más susceptibles al estrés, si bien utilizaron un número reducido de animales por tratamiento (10 animales).

4. Resultados y discusión.

Estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente estudio pues se observa que el nivel de haptoglobina aumenta con la duración del transporte. Del mismo modo no se encuentran valores más altos de PFA en los animales portadores del gen del Halotano, a pesar de que se podía esperar que dichos animales fuesen más susceptibles al estrés, si bien el número de animales diagnosticados para dicho gen en el presente estudio igualmente es muy pequeño (17 animales).

Lipperheide y col. (1989) sugieren la utilidad de la PFA haptoglobina para identificar lotes de animales en los que la falta de higiene, la carencia de vigilancia, etc, han inducido un estrés inmunológico en los animales, caracterizado por una respuesta pobre a las vacunaciones y una reducción de la eficacia en la conversión de alimentos.

Con todo ello podemos concluir que las PFA son una buena herramienta para ser usada como indicador del estrés del porcino a corto plazo. Además, aunque supone un coste económico elevado, su determinación es sencilla y rápida especialmente en el caso de la haptoglobina.

Las PFA en ganado porcino se muestran como una nueva herramienta para la evaluación de sistemas productivos y de calidad. Por una parte resulta interesante su utilización en producción como una herramienta precisa para el diagnóstico de situaciones alteradas, con presencia de patologías, afectando a los rendimientos productivos y a una mayor mortalidad. Esta herramienta debe ser complementaria a las utilizadas actualmente para aclarar cuál es el origen de esa elevación (infeccioso, manejo, etc). (Piñeiro, 2002).

Por otra parte, las PFA permiten efectuar determinaciones rápidas y fiables en matadero que pueden ser usadas como herramientas de sistemas destinados a garantizar la calidad garantizando la ausencia de situaciones de fase aguda debidas a infecciones, mal manejo o transporte inadecuado (Taylor, 2002) en la cadena de alimentación humana. El diagnóstico preciso podría hacerse posteriormente mediante los métodos clásicos.

5. Conclusiones

5. CONCLUSIONES.

1. El incremento de la duración del transporte a matadero eleva la concentración de las **PFA** Amiloide A-sérica y Haptoglobina, relacionándose directamente la cuantía del incremento con la duración del transporte.
2. La **relación neutrofilos/linfocitos** es mayor en los animales heterocigotos (Nn) para el gen del halotano que en los homocigotos (NN), en concordancia con su mayor susceptibilidad al estrés.
3. El **pH** es afectado por la clasificación de la canal, presentando valores más bajos las canales mejor clasificadas respecto a la clasificación intermedia.
4. No existe ninguna dependencia entre los diferentes tipos de transportes estudiados (largo vs corto) y la aparición de riesgo de **carnes PSE**.
5. En las variables de calidad de carne y de canal y en los marcadores de estrés estudiados no se ha observado ningún **efecto del sexo**, tan solo las hembras fueron mejor clasificadas que los machos castrados.
6. La **frecuencia del gen del Halotano** en una población representativa de la producción porcina de cebo en la Región de Murcia fue del 3,06%, no apareciendo ningún caso de animales homocigotos recesivos.

6. Bibliografía

6. BIBLIOGRAFIA.

- Asencios Gómez R. (2004). Variación del pH en la carne de cerdos sacrificados con aturdimiento eléctrico y sin aturdimiento.
- A Velarde. El bienestar animal i la qualitat del producte final. 2007. Dossier tècnic nº 18. DARP. Generalitat de Catalunya
- Bonelli, A. M. y Schifferli R, C. Síndrome Estrés Porcino. Archivos de medicina veterinaria 2001. 33:125-135.
- Buxadé,C (1996). Zootecnia: bases de la producción animal. Tomo VI: Porcinocultura intensiva y extensiva.
- Campo, J.L., Gil, M.G., Dávila, S.G. 2002. El bienestar de los animales domesticos XI Reunión de Mejora Genética, Pamplona.
- Gade PB, Christensen L, Baltrez M, Petersen JV 2007. Causes of pre-slaughter mortality in emphasis on Danish slaughter pigs whit especial transport. Animal welfare. 16: 459-470.
- Gúardia MD, Estany J, Balasch S, Oliver MA, Gisper M, Diestre A 2005. Risk assessmnet of DFD meat due to pre-slaughter conditions in pig. Meat Science. 70: 709-716.
- Gisper M, Oliver MA, Velarde A 2005. Interaccion between genetics and animal welfare and its relationship whit the raw material. III congreso mundial del jamón. 59-61.
- Fábrega, E. (2001). El bienestar animal durante el transporte y sacrificio como criterio de calidad. Producción animal, nº 169.
- Herranz Herranz A; López Colmenero J. (2003). Bienestar animal. Editorial Agrícola Española, S.A, ANCOPRC, Ministerio de Agricultura, Pesca y alimentación.
- Karlen GAM, Hemsworth PH, Gonyou HW, Fabrega E, David Strom A and Smits RJ. (2007). The welfare of gestation sows in convencional stalls and large groups on deep litter. Applied Animal Behaviour Science 105: 87-101.
- Martín Bejarano S. (2001). Enciclopedia de la carne y de los productos cárnicos. Editorial Martín & Macias.

- Piñeiro M, Piñeiro C, Carpintero R, Morales J, Campbell F.M, Eckersall P.D. Toussaint J.M.M, Lampreave F 2006. Characterisation of the pig acute phase protein response to road transport. *The veterinarian Journal*. 173:669-674.
- Puppe, B; Tuchscherer, M; Tuchscherer, A. (1997). The effect of housing conditions and social environment immediately after weaning on the agonistic behaviour, neutrophil/lymphocyte ratio, and plasma glucose level in pigs. *Livestock Production Science* 48, 157-164.
- Quiñonero Méndez J. (2006). Efecto de las condiciones de alojamiento sobre el bienestar animal: Relación neutrofilos/linfocitos como indicadores de estrés en cerdas gestantes.
- Real Decreto 1041/1997, de 27 de junio, por el que se establecen las normas relativas a la protección de los animales durante su transporte (BOE 163 del 9 de julio de 1997)
- Real Decreto 1135/2002, de 31 de octubre, relativo a las normas mínimas de protección de cerdos.
- Real Decreto 54/1995, de 20 de enero, sobre protección de los animales en el momento de su sacrificio o matanza).
- Ritter MJ, Ellis M, Brinkmann J, DeDecker JM, Keffaber KK, Kocker ME, Peterson BA, Sclips JM, Wolter BF 2006. Effect of floor space during transport of market-weight pigs on the incidence of transport losses. *Journal of Animal Science*. 84: 2856-2864.
- Saco Y, Docampo MJ, Febrera E, Manteca X, Diestre A, Lampreave F, Bassols A 2003. Effect of transport stress on serum haptoglobin and Pig-MAP in pigs. *Animal welfare*. 12: 403-409.
- <http://www.anps.es/proyectos>. Asociación Nacional de criadores de Ganado porcino selecto.
- <http://www.mapa.es>. Ministerio de agricultura pesca y alimentación.
- http://www.produccionanimal.com.ar/etologia_y_bienestar/bienestar_en_general/59-bienestar_durante_transporte_y_sacrificio.htm.