

Universidad Pública de Navarra

Nafarroako Unibertsitate Publikoa

**ESCUELA TECNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS AGRONOMOS**

*NEKAZARITZAKO INGENIARIEN
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKO*

DETERMINACIÓN MEDIANTE ANÁLISIS DE IMAGEN DEL TAMAÑO DE LOS ADIPOCITOS DE DIFERENTES MÚSCULOS DE GANADO BOVINO

presentado por

Miguel Echeverría Esandi

aurkeztua

**GRADO EN INGENIERÍA AGROALIMENTARIA Y DEL MEDIO RURAL
GRADUA NEKAZARITZAKO ELIKAGAIEN ETA LANDA INGURUNEAREN
INGENIARITZAN**

Junio, 2015
2015eko, Ekaina

AGRADECIMIENTOS

A José Antonio Mendizabal Y Beatriz Soret, directores de este Trabajo Final de Grado, por su constante apoyo y amabilidad.

A Leo Alfonso, por acceder en todo momento a solucionar las dudas surgidas con el tratamiento de los datos.

A Lara Martínez Del Pino y Olaia Urrutia, por estar siempre dispuestas a ayudar y por facilitarme muchas de las tareas.

A Isabel Maquirriain, por su ayuda inestimable en el laboratorio.

A mi hermana, Laura, que se ha prestado a echarme una mano cuando lo he necesitado.

A tod@s ell@s, muchas gracias. Eskerrik asko denoi

RESUMEN

Se ha estudiado la relación entre la grasa intramuscular de diferentes depósitos del tejido adiposo en ganado vacuno de raza Pirenaica. Para ello se tomaron muestras de cuatro músculos (*Longissimus Dorsi*, *Masseter*; *Semitendinosus* y *Sternomandibularis*), así como de grasa subcutánea, en el sacrificio y se procedió a analizar el tamaño de los adipocitos por medio de técnicas de análisis de imagen, procediendo posteriormente al correspondiente análisis de datos. El veteado de *Longissimus Dorsi* se estudió, también, por análisis de imagen y se realizaron análisis de contenido lipídico por extracción química para los cuatro músculos. Los resultados muestran una relación positiva entre el metabolismo de los músculos oxidativos (*Masseter* y *Sternomandibularis*) y su mayor contenido en grasa intramuscular, frente a los músculos con metabolismo predominante glicolítico (*Longissimus Dorsi* y *Semitendinosus*). Del mismo modo, se observaron procesos simultáneos de hiperplasia e hipertrofia, mediante distribuciones bimodales, en los músculos oxidativos y, únicamente de hiperplasia, en los glicolíticos. Se pudo comprobar que la raza Pirenaica posee un nivel bajo de grasa intramuscular, respecto a otras razas comerciales.

Palabras clave: Ganado vacuno, tamaño de adipocitos, hiperplasia-hipertrofia, grasa intramuscular, veteado.

ABSTRACT

The present study expands on the relation among the different intramuscular fat deposits of adipose tissue in the Pyrenean breed cattle. For that purpose, samples were taken from four different muscles (*Longissimus Dorsi*, *Masseter*; *Semitendinosus* y *Sternomandibularis*) as well as from subcutaneous fat during sacrifice; to then proceed to analyze the size of the adipocytes through image analysis techniques and finally proceed to the correspondent data analysis. The *Longissimus dorsi* marbling was also studied through image analysis, and Analysis of lipid content was also done by chemical extraction for the four muscles. The results show a positive relationship between oxidative's muscle metabolism (*Masseter* and *Sternomandibularis*) and its higher content of intramuscular fat versus muscles with predominantly glycolytic metabolism (*Longissimus Dorsi* and *Semitendinosus*). Similarly, simultaneous processes of hyperplasia and hypertrophy were observed by bimodal distributions in oxidative muscles, and only of hyperplasia in the glycolytic muscles. It was found that the Pyrenean breed has a low level of intramuscular fat, compared to other commercial breeds.

Keywords: Beef cattle, adipocyte size, hyperplasia-hypertrophy, intramuscular fat, marbling.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Tejido graso	3
2.1.1 Características generales	3
2.1.2 Funciones	4
2.1.3 Origen	4
2.1.4 Crecimiento y desarrollo	6
2.1.5 Metabolismo	7
2.1.6 Depósitos grasos	9
2.2 Tejido muscular	13
2.2.1 Características generales	13
2.2.2 Origen	13
2.2.3 Crecimiento y desarrollo	14
2.2.4 Metabolismo	14
2.3 Relaciones entre tejido graso y tejido muscular en los animales de carne	17
2.3.1 Vinculación	17
2.3.2 Interacciones	18
2.4 Raza Pirenaica	19
2.4.1 Precedentes	19
2.4.2 Situación actual y censo	19
2.4.3 Características de la raza	20
3. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL	23
4. MATERIAL Y MÉTODOS	24
4.1 Animales	24
4.1.1 Sacrificio y toma de muestras	24
4.2 Contenido en grasa de los diferentes músculos	27
4.3 Determinación del grado de veteado	27
4.4 Determinación del tamaño de los adipocitos	29
4.4.1 Método laboratorial. Digestión por colagenasa	29
4.4.2 Método morfométrico. Análisis de imagen	30

4.5 Análisis estadístico _____	30
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN _____	32
5.1 Características de la canal _____	32
5.2 Contenido en grasa de los diferentes músculos _____	33
5.3 Grado de veteado de la carne _____	34
5.4 Distribución del tamaño de los adipocitos _____	36
5.4.1 Depósito intramuscular _____	38
5.4.2 Depósito subcutáneo _____	42
6. CONCLUSIONES _____	43
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	44
8. ANEXOS _____	53
ANEXO I: Manual de uso de “Image J” en la determinación del grado de veteado de la carne _____	53
ANEXO II: Manual de utilización de “Image Pro Plus 5.1” aplicado a la determinación del tamaño de los adipocitos _____	60
ANEXO III: Datos individuales del tamaño de vetas y distribución de adipocitos por animal _____	69

ABREVIATURAS

ADIP SD	Software estadístico
A-FABP	Gen “fatty acid binding protein 4”
ATP	Adenosín trifosfato
BC	Test de coeficiente de bimodalidad
C	Carbono
CE	Comunidad Europea
CONASPI	Confederación de Asociaciones de Ganado Vacuno Pirenaico
DIP	Test estadístico
EE	Error Estándar
FAS	Sintetasa de Ácidos Grasos
G3PDH	Glicerol 3 fosfato Deshidrogenasa
GMD	Ganancia Media Diaria
H	Hidrógeno
ICC	Índice de Conversión Concentrado
IGP	Indicación Geográfica Protegida
IM	Intramuscular
IT	Índice Transformación
O	Oxígeno
OM	Omental
P	Pirenaico
PV	Peso Vivo
PH	Potencial Hidrógeno
PR	Pélvico-Renal
SC	Subcutáneo

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Tipos de adipocitos _____	4
Figura 2: Esquema del proceso de diferenciación del adipocito _____	5
Figura 3: Morfología de un adipocito _____	6
Figura 4: Esquema del proceso de hiperplasia _____	6
Figura 5: Esquema del proceso de hipertrofia _____	7
Figura 6: Síntesis de triglicéridos en el adipocito _____	8
Figura 7: Orden de desarrollo de los tejidos grasos _____	9
Figura 8: Desarrollo de las células musculares y de los adipocitos, a partir de células mesenquimatosas	17
Figura 9: Evolución morfológica de la raza Pirenaica _____	19
Figura 10: Ejemplares, macho y hembra, de la raza Pirenaica _____	22
Figura 11: Posición de los tejidos intramusculares analizados en el animal _____	25
Figura 12: Canal derecha de los 4 animales sacrificados _____	26
Figura 13: Equipo para la medición del veteado _____	28
Figura 14: Imagen de un de las chuletas analizadas _____	28
Figura 15: Picado de muestras y almacenamiento en estufa (39°C) _____	29
Figura 16: Imágenes microscópicas (x400) de adipocitos del depósito Subcutáneo, Longissimus Dorsi y Masster _____	30
Figura 17: Porcentaje de grasa contenida en el depósito intramuscular de los diferentes músculos ____	33
Figura 18: Distribución del tamaño de los adipocitos en el depósito intramuscular Longissimus Dorsi _	38
Figura 19: Distribución del tamaño de los adipocitos en el depósito intramuscular Semitendinosus ____	39
Figura 20: Distribución del tamaño de los adipocitos en el depósito intramuscular Masseter _____	40
Figura 21: Distribución del tamaño de los adipocitos en el depósito intramuscular Sternomandibularis	40
Figura 22: Distribución del tamaño de los adipocitos en el tejido Subcutáneo _____	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: <i>Censo de ganado pirenaico 2014</i> _____	20
Tabla 2: <i>Características comerciales de la raza Pirenaica</i> _____	22
Tabla 3: <i>Datos de los animales analizados en el momento del sacrificio</i> _____	24
Tabla 4: <i>Muestras analizadas</i> _____	26
Tabla 5: <i>Parámetros productivos de los terneros de raza pirenaica, sacrificados con 12 meses de vida.</i> _____	32
Tabla 6: <i>Grado de vetado (marbling) del Longissimus Dorsi (L.D.) de los 4 terneros estudiados</i> _____	34
Tabla 7: <i>Resultados de los test BC y DIP para determinar el tipo de distribución de adipocitos en cada depósito estudiado</i> _____	36
Tabla 8: <i>Descriptivos estadísticos de los depósitos estudiados, según su distribución</i> _____	37

1. INTRODUCCIÓN

Cada año se consumen en el mundo 56,8 millones de toneladas de carne de vacuno. Europa es la responsable del 12,8% de producción de esa carne. A pesar de que la demanda de alimentos sube continuamente, la producción de carne de vacuno ha disminuido a nivel mundial casi un 9%, en la última década. España, ocupa el quinto lugar en la Unión Europea con un 5,6% de peso (581 mil toneladas de producción) (MAGRAMA, 2013).

Dentro de las producciones ganaderas del estado, el sector de vacuno de carne ocupa el tercer puesto en importancia económica suponiendo el 15,7% de la PFG. (5,7% de la PFA). El valor obtenido por estas producciones, según datos del año 2013, alcanza los 2.502 millones de euros. Ésta es una cifra superior a la de años anteriores, pero no se debe a un mayor consumo, sino a un encarecimiento de los precios (3,8%) (MERCASA, 2014).

Los cambios en la demanda internacional de materias primas han sido el principal factor que ha contribuido al aumento del coste de la producción y, consecuentemente, del producto final (Martín, 2011).

El consumo de vacuno de carne va disminuyendo paulatinamente por diversos motivos, como el efecto sustitución, que consiste en cambiar el hábito de comprar vacuno de carne por otras carnes con precio inferior (como pollo o cerdo) (Martín, 2011). Además, en la actualidad, el consumidor ya no se preocupa únicamente de la calidad organoléptica de los alimentos, sino que el cuidado de la alimentación ha tomado tal importancia que el comprador se preocupa también de su composición, principalmente de la composición de su grasa. Todo ello provoca que la tendencia actual sea producir canales con mayor proporción de músculo y menos engrasadas.

En este sentido, la calidad y las características de la carne que llega al plato dependen de diversos factores como edad, sexo, raza y localización anatómica en el animal. Éstas marcarán las cualidades organolépticas de la carne (textura, sabor, olor y color) (Díaz, 2011).

La industria está enfrentándose ahora al desafío de producir carne con suficiente grasa intramuscular (infiltrada) que satisfaga la experiencia culinaria pero sin exceso de grasa para poder satisfacer a la vez los asuntos de salud y la buena apariencia de los productos cárnicos. Una mejor comprensión de los mecanismos biológicos que determinan la cantidad y composición de la grasa intramuscular es esencial para llevar a cabo todo ello, por lo que continúa siendo un punto clave en investigación en muchos países (Hocquette et al., 2010).

Hay que tener en cuenta que un aumento excesivo de la deposición de grasa en los depósitos subcutáneo, visceral (omental, pélvico-renal y mesentérico) e intermuscular se traduce en un aumento en los índices de conversión y, por tanto, se encarecen los costes de producción (Allen, 1976). Por eso es importante reducir los depósitos globales de grasa, mientras se mejora el depósito de grasa deseable (intramuscular) de forma eficaz y sostenible. Se estima que en EEUU los costes de alimentación, que van a depósitos grasos que se desechan, asciende a 4,4 billones de dólares (Hausman et al., 2014).

Cada vez existen más evidencias de que el desarrollo del tejido adiposo intramuscular está muy ligado al de las fibras musculares, interrelacionado un tipo de células con el otro. Por ello, este Trabajo Final de Grado se centra en la distribución del tamaño de los adipocitos en función de la localización anatómica (distintos músculos) en la que se desarrollan.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Tejido graso

2.1.1 Características generales

La canal y la carne de vacuno comprenden una gran cantidad de tejidos, aunque los más importantes son el muscular, el adiposo, el conjuntivo y el óseo. Su importancia es tanto cuantitativa como cualitativa, ya que la cantidad y proporción de los mismos influye tanto en la eficiencia de producción como en la calidad de los productos.

El tejido graso o tejido adiposo constituye el mayor reservorio energético de los animales. Está compuesto, en su mayor parte, por células adiposas capaces de almacenar la energía excedente en forma de triglicéridos y movilizarla nuevamente al organismo en periodos de déficit calórico (González et al., 2008).

Los elementos que forman este tejido lipídico son C, H y O, pudiendo unirse a ellos otros elementos como P, N y S. Químicamente se diferencia de otros tejidos por su contenido en ácidos grasos (Hausman et al., 2009).

Este tejido se encuentra distribuido en el organismo de forma heterogénea según especie, edad, sexo y condición específica. Comprende el 5-35% de la masa corporal del animal (Du et al., 2011). Dentro de él se pueden distinguir dos grandes tipos de tejidos: El tejido adiposo blanco (predominante en animales adultos) y el tejido adiposo pardo (existente en animales hibernantes). Ambos presentan capacidad de almacenar y metabolizar lípidos, pero difieren en su coloración, morfología, distribución, genes y función.

El tejido adiposo blanco representa el principal almacén de energía y el pardo está especializado para el gasto energético. Al nacer predomina el pardo, aunque para la segunda o tercera semana ya se considera que todo el tejido adiposo es blanco (Bonnet et al., 2010).

Los adipocitos pardos son más pequeños que los blancos, son multiloculares en comparación con los blancos, que tienen una única gota de lípidos, y tienen un número relativamente alto de mitocondrias (Du et al., 2011).

Así, el conjunto del tejido se compone, mayoritariamente, de adipocitos maduros, además de preadipocitos, fibroblastos, células endoteliales y sanguíneas (González et al., 2008).

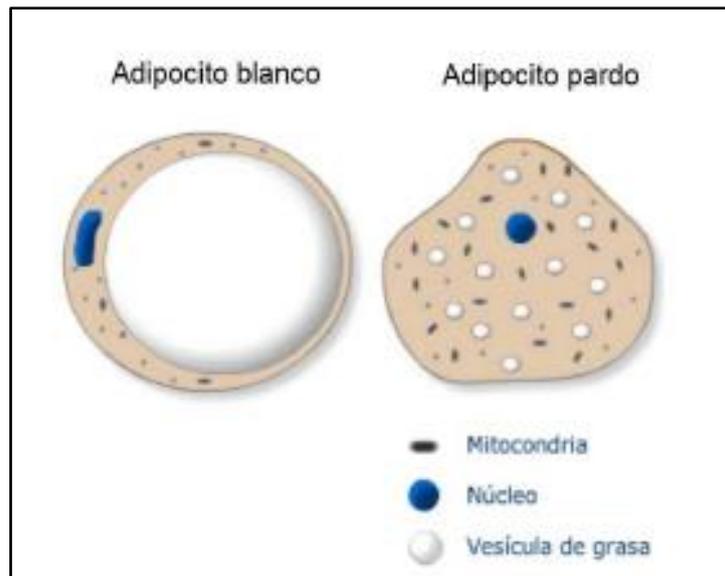


Figura 1: Tipos de adipocitos

2.1.2 Funciones

La función principal del tejido graso es el almacenamiento de energía, proporcionando las reservas energéticas necesarias para periodos de escasez de alimentos, tales como las épocas de sequía o el invierno, de forma que éstas cubran las necesidades del animal y se mantenga un equilibrio con los aportes nutricionales. Así, cuando el balance energético es positivo éste se acumula en forma de grasa y en los momentos en los que haya balance negativo se moviliza dicha grasa (González et al., 2008).

Otra función secundaria que posee la grasa es la estructural, ya que forma las bicapas lipídicas de las membranas celulares. También puede formar depósitos en los organismos y así protegerlos mecánicamente y térmicamente (Jacobi et al., 2006).

2.1.3 Origen

La adipogénesis es el proceso de proliferación, diferenciación y maduración de las células madre para formar adipocitos capacitados para la lipogénesis y lipólisis. Los depósitos grasos están compuestos de numerosos tipos celulares que incluyen adipocitos maduros, preadipocitos, adipoblastos, células vasculares y células no identificadas por ahora (Hausman et al., 2014).

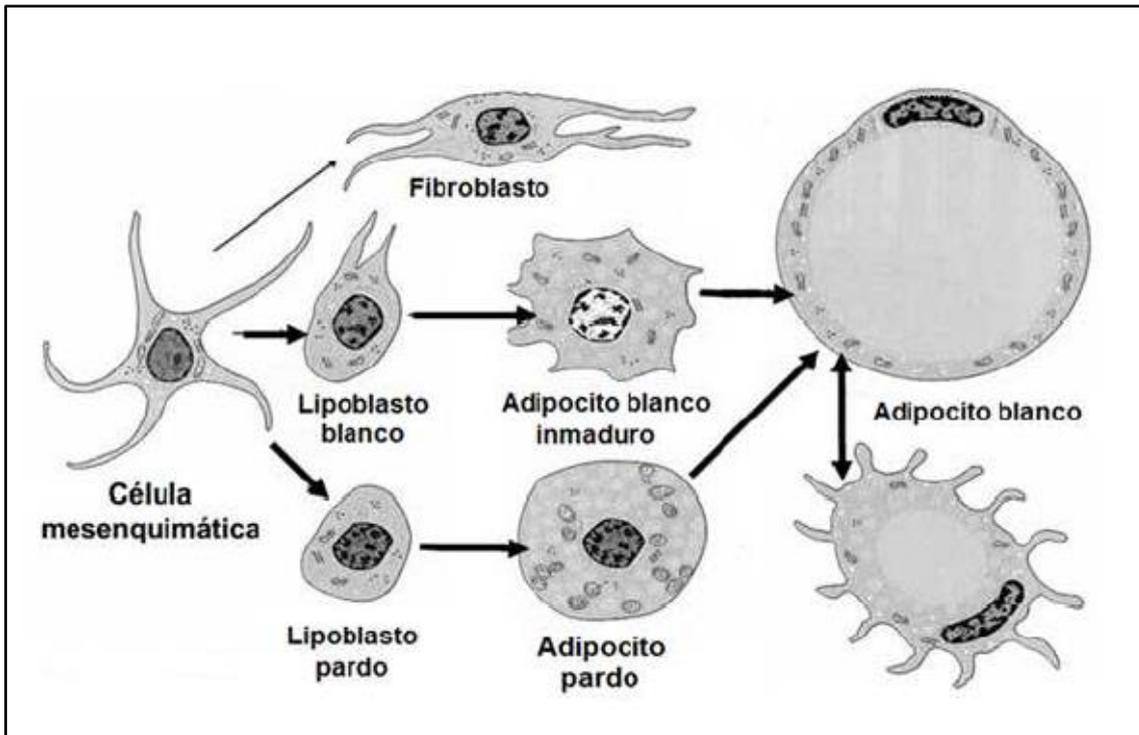


Figura 2: Esquema del proceso de diferenciación del adipocito (adaptado de Montes, 2012)

Los adipocitos son las principales células que forman el tejido adiposo. Representan el 90% de la masa del tejido graso. Se forman a partir de una célula madre multipotencial, de origen mesenquimático, que da lugar a un lipoblasto unipotencial. Los lipoblastos pasan a preadipocitos al dotarse de enzimas lipogénicas y lipolíticas y al aumentar su sensibilidad a la insulina y a catecolaminas. Es entonces cuando comienzan a almacenar lípidos (triglicéridos) en su citoplasma. Cuando las gotas lipídicas almacenadas se fusionan en una única vacuola lipídica, se consideran adipocitos (Vernon, 1986).

Otros autores como Robelin y Castiella (1990) consideran que no se puede hablar de adipocito hasta que la célula alcanza un tamaño aproximado de 10 micras.

La diferenciación adipocitaria comienza entre los días 50 y 60 tras la concepción y coincide con la diferenciación de la matriz extracelular (Hausman et al., 2014).

La adipogénesis ocurre como consecuencia del recambio celular normal y debido a la necesidad de almacenar más grasa como consecuencia de un aumento en el consumo de calorías, y por lo tanto de ganancia de peso (González et al., 2008).

Los adipocitos maduros son células esféricas, muy grandes (en rumiantes pueden alcanzar un volumen de 2-3 nanolitros) (Vernon, 1986). Poseen una gran vacuola lipídica central característica rodeada por una fina capa de citoplasma. El núcleo es aplanado y está desplazado a la periferia de la célula. En el citoplasma destacan

pequeñas mitocondrias, un pequeño complejo de Golgi y canales tortuosos del retículo endoplasmático liso (Paniagua et al., 1993).



Figura 3: Morfología de un adipocito (adaptado de Díaz, 2010)

2.1.4 Crecimiento y desarrollo

El crecimiento del tejido adiposo (blanco y pardo) se produce por la combinación de dos procesos: la hiperplasia o aumento del número de los adipocitos y la hipertrofia o aumento de su tamaño (Du et al., 2011). La hiperplasia ocurre por proliferación de los preadipocitos y su posterior diferenciación (González et al., 2008); la hipertrofia se debe a la acumulación de lípidos, en forma de triglicéridos (resultado de la esterificación entre el glicerol 3-fosfato y los ácidos grasos), en su citoplasma.

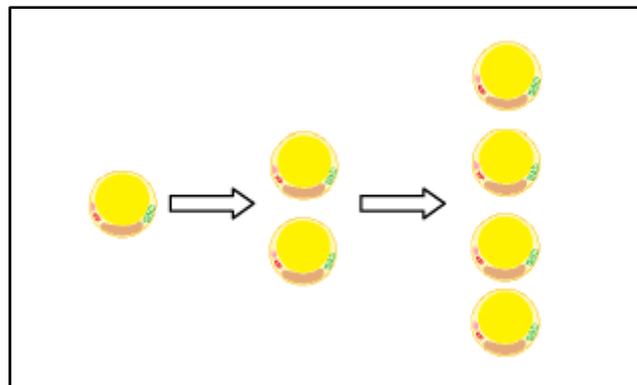


Figura 4: Esquema del proceso de hiperplasia

Ambos procesos tienen lugar mayoritariamente en las primeras etapas de crecimiento de los animales; sin embargo en animales adultos predomina la hipertrofia de los adipocitos (Mendizabal & Soret, 1997).

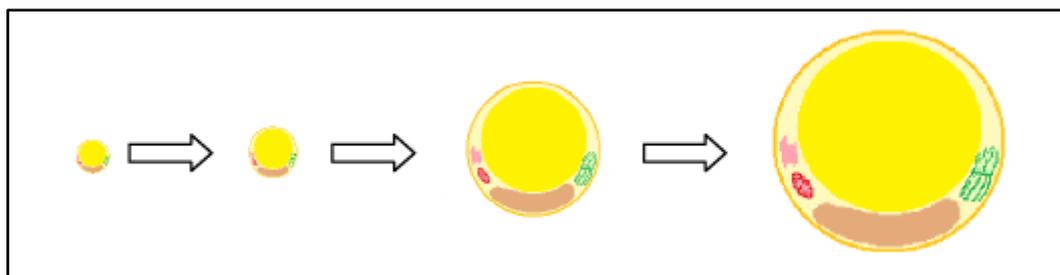


Figura 5: Esquema del proceso de hipertrofia

Según Bonnet et al. (2010), la hiperplasia ocurre mayormente durante la vida fetal y/o en la vida post-natal temprana, pero puede surgir también en estadios más tardíos o en la vida adulta en la res. El número total de adipocitos estimado al final de la vida fetal está alrededor de los 19 billones y puede aumentar hasta seis veces para alcanzar 124 billones en los adultos.

La hipertrofia empieza durante la vida fetal y es el principal mecanismo por el cual el tejido adiposo crece tras el nacimiento. El volumen de los adipocitos aumenta considerablemente (más de 100 veces) en el depósito visceral y menos en el subcutáneo, en el intermuscular y el omental (4/10 veces) entre los 150 y 600 días de edad. Pero, a diferencia de las fibras musculares el número de adipocitos nunca se establece (Bonnet et al., 2010).

El crecimiento post-natal mediante hiperplasia depende fuertemente de la localización anatómica del tejido adiposo y del diámetro promedio de los adipocitos existentes. Si se alcanza un diámetro promedio de 90 μ m la hiperplasia contribuye al crecimiento del tejido adiposo en los animales en crecimiento; es decir, que el hecho de que aumente mucho la hipertrofia puede inducir a la hiperplasia (Bonnet et al., 2010).

La mayoría de adipocitos se forman durante los períodos fetal y postnatal precoz (Du et al., 2011). Así mismo, Jo et al. (2009) apuntan a que la hiperplasia ocurre únicamente en los estados tempranos de desarrollo del animal. Según Soula et al. (2013) las distintas poblaciones de adipocitos, según su tamaño, podrían convivir por diferencias en el flujo lipolítico y lipogénico y no únicamente por tener lugar nuevos procesos de hiperplasia.

Sin embargo, Sun et al. (2011) señalan que puede haber evidencias de que conforme crece el tamaño de los adipocitos, también aumenta la secreción de factores de reclutamiento de nuevos adipocitos.

2.1.5 Metabolismo

El tamaño del adipocito depende de la cantidad de triglicéridos acumulados en la gota lipídica, y ésta del balance neto de los procesos de lipogénesis y lipólisis; es decir, el resultado de la grasa creada (lipogénesis) menos la consumida (lipólisis). La síntesis de

triglicéridos es un proceso complejo desarrollado en la mitocondria y el citosol celular que se lleva a cabo a lo largo de varias rutas y reacciones enzimáticas. Los triglicéridos se componen de una molécula esterificada de glicerol (glicerol 3 fosfato) y tres ácidos grasos, en su mayoría saturados, de cadena larga (>10 C). Este proceso de formación de los triglicéridos se denomina lipogénesis y se resume, de forma simplificada, en el siguiente esquema (Hilda et al., 2010).

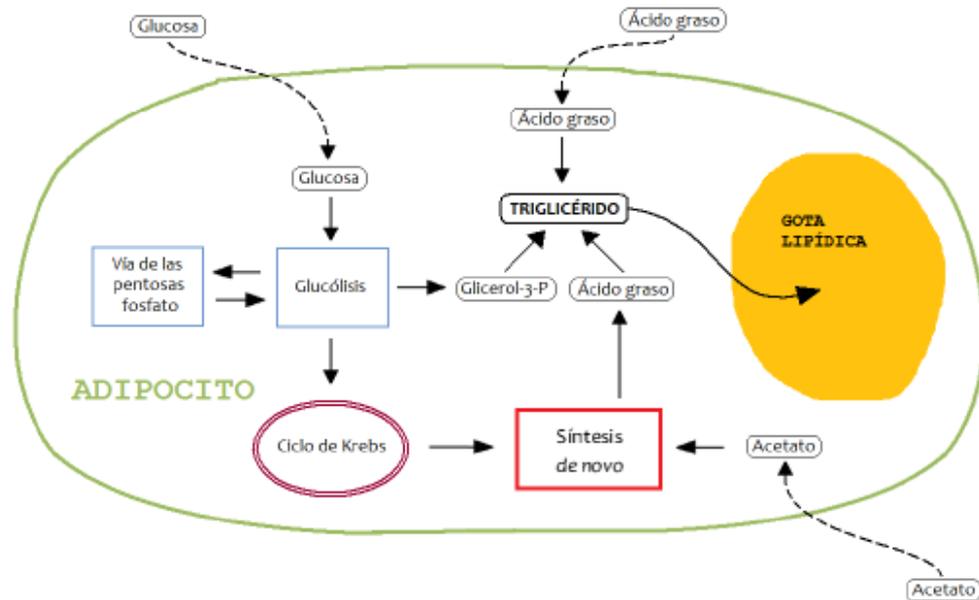


Figura 6: Síntesis de triglicéridos en el adipocito (adaptado de Vernon, 1980)

Tanto el glicerol 3 fosfato, como los ácidos grasos son productos de la descomposición del alimento ingerido, llevada a cabo en el rumen por lipasas bacterianas.

El glicerol 3 fosfato se sintetiza a partir de glucosa mediante la enzima G3PDH. En el caso de los ácidos grasos, provienen de una fuente de carbono (acetato en rumiantes) y otra de hidrógeno y se dan mediante la enzima FAS, que obtiene energía por la vía de las pentosas (Soret et al., 1998).

La importancia de los triglicéridos reside en que son la forma más importante de almacenamiento de energía en los animales. Tienen la ventaja de producir más ATP que cualquier otra forma de carbono al oxidarse el carbono de los ácidos grasos. Además, los lípidos están menos hidratados que los polisacáridos, por lo que ocupan menos espacio (Vernon, 1981).

En los músculos de los mamíferos, los triacilglicéridos son principalmente almacenados dentro de los adipocitos intramusculares (al menos el 80%) pero también en el citoplasma de las miofibrillas en gotitas cercanas a la mitocondria (Hocquette et al., 2010).

2.1.6 Depósitos grasos

La calidad de la canal viene marcada por la cantidad de grasa y su distribución en el animal (Kempster, 1981).

El tejido adiposo se compone de cuatro depósitos grasos fundamentales: El abdominal o visceral, el subcutáneo (SC), el intermuscular (IM) y el intramuscular (Narváz Rivas et al., 2009). Algunos de ellos se dividen en subdepósitos, como por ejemplo el abdominal, que engloba al mesentérico, omental y pélvico-renal.

El intramuscular es el depósito más importante desde el punto de vista sensorial, se desarrolla dentro de los tejidos musculares. El intermuscular evita el secado excesivo de la carne y el subcutáneo protege la canal durante el proceso de refrigeración y almacenamiento.

El tejido adiposo es el último de los tejidos (nervioso, óseo, muscular) en alcanzar su máxima tasa de crecimiento (Acero, 1994). Dentro de él, los diferentes depósitos también tienen un orden de desarrollo determinado, como se ve en la Figura 7.

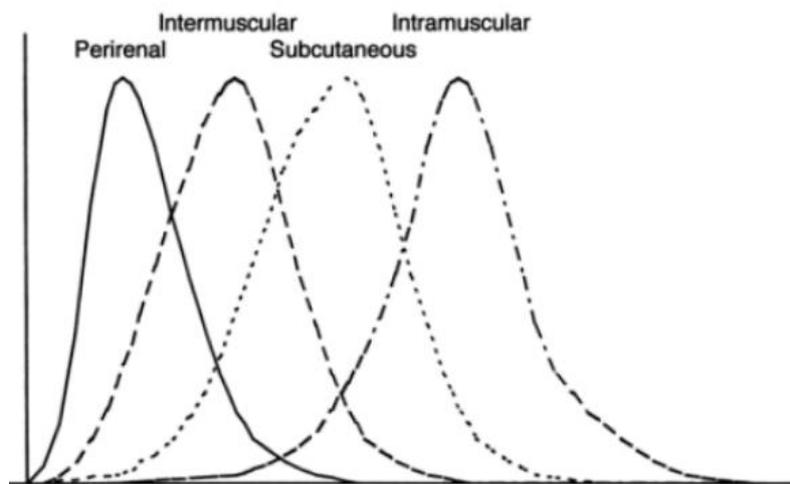


Figura 7: Orden de desarrollo de los tejidos grasos (Sainz y Hasting, 2000)

El tejido adiposo perirrenal o pélvico-renal aparece en el feto bovino a sus 80 días en el periodo fetal. El subcutáneo y el intermuscular se desarrollan desde los 180 días, mientras que el intramuscular se estima que ocurre mayormente durante el estadio final de la gestación y en el período neonatal, a partir de los 250 días de vida (Du et al., 2013). Como resultado hay un único período de alimentación para incrementar específicamente el veteado sin aumentar otros depósitos de grasa.

Estos autores concluyeron que la formación secuencial de adipocitos en estos 4 depósitos diferentes proporciona una oportunidad para incrementar

preferencialmente la adipogénesis intramuscular por encima de la de otros depósitos grasos.

Durante el desarrollo de los distintos depósitos grasos, los procesos de hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos no tienen lugar al mismo tiempo ni con la misma intensidad dependiendo de factores como la raza, el sexo, la alimentación o la localización anatómica del depósito graso considerado (Hood, 1982; Hausman et al., 2014).

Algunos de estos factores han sido estudiados con anterioridad: Pascual, A. (2011) estudió el desarrollo de depósitos grasos en terneras de raza pirenaica, según edad y alimentación. Se realizaron 4 lotes (6 meses, 12 meses y 2 de 18 meses). Los dos primeros lotes, y uno de los de 18 meses fueron alimentados de forma convencional. El otro lote de 18 meses tuvo una dieta alta calórica desde los 12 a los 18 meses. Los resultados indicaron que los procesos de hiperplasia e hipertrofia no tienen la misma intensidad en los distintos depósitos.

Díaz, J. (2010) también analizó el desarrollo y metabolismo de distintos depósitos grasos para distintas dietas en corderos. Se llevó a cabo el estudio de la inclusión de lino en tres lotes de corderos (0%, 5%, y 10%) para ver el efecto sobre la cantidad y el tipo de grasa almacenada. No observaron diferencias significativas.

Sin embargo, en un estudio anterior, Mendizabal & Soret (1997) observaron que el tamaño y el número de adipocitos variaban entre los diversos depósitos. Incluso dentro de un mismo depósito se podían encontrar diferencias en el grado de hipertrofia según la localización de los adipocitos.

A este respecto, Robelin (1981) analizó el crecimiento del número de adipocitos en los diferentes depósitos (entre el 15% y 65% del PV de terneros) y observó que en el depósito graso subcutáneo el número de adipocitos se multiplicaba por 5.6, el intermuscular por 1.3 y el pélvico-renal por 1.6.

En un estudio en ovino, Mendizabal et al. (2002) comprobaron que el depósito subcutáneo era el que mayor capacidad de almacenar y movilizar grasa tenía; siendo el intermuscular el que menos.

Los depósitos grasos clasificados con respecto al tamaño de sus adipocitos son de mayor a menor: Abdominal (OM y PR), subcutáneo, intermuscular e intramuscular (Hood, 1982). Este hecho fue corroborado por Mendizabal et al. (1999) en terneros de distintas razas, sacrificados a 450 Kg de PV. Los resultados medios fueron: El depósito abdominal (117 μm el PR y 107 μm el OM), el subcutáneo 84 μm y el intermuscular 69 μm .

También se ha descrito que el depósito subcutáneo, así como el intramuscular, mantienen su capacidad de hiperplasia hasta los 14 meses (Hood y Allen, 1973).

Allen (1976) explica que los adipocitos de los depósitos intermuscular e intramuscular son de menor tamaño debido a, posiblemente, la presión a la que son sometidos por los músculos adyacentes. Esto impediría su expansión.

Por último, cabe resaltar que el depósito subcutáneo es el que más grasa pierde en períodos en los que el animal necesita movilizar reservas (Vernon, 1980).

CALIDAD DE LA CANAL Y DE LA CARNE

Se entiende como canal el producto final comercializable de todo sistema de producción de carne (Martín et al., 1993).

La canal es la unidad primordial entre los productores primarios y el sector de transformación y comercialización. Su calidad determina el precio y es por ello que figura como objetivo primario de técnicos y ganaderos.

El tejido graso influye en el flavor de la carne, ya que la grasa intramuscular aporta buenas características organolépticas de ésta (Robelin, 1986).

Póveda (1991) definió como alta calidad de canal a aquella que esté determinada por: Un máximo contenido en músculo, mínimo en hueso y un nivel adecuado de grasa de acuerdo con las exigencias del mercado, además de buenas características físicas, químicas y organolépticas de la carne.

Existe una reglamentación (Reglamento C.E. nº 103/2006) para el ganado vacuno de más de 300 kg de peso vivo, de tal manera que quedan establecidos parámetros de clasificación de las canales.

Dicha clasificación se realiza en función de tres factores: Categoría, conformación (desarrollo de la canal) y engrasamiento.

El desarrollo del tejido graso es el que marca el nivel de engrasamiento, y éste es el parámetro más importante en la clasificación de canales, debido a que es el que más variaciones presenta (Briskey & Bray, 1964) y debido a las tendencias del mercado hacia una demanda de carnes más magras (Ruiz de Huidobro et al., 1996).

García-Torres et al. (2005) dedujeron que un estado de engrasamiento óptimo es el que mantiene un equilibrio entre la cantidad mínima de grasa para satisfacer los gustos del consumidor y la cantidad suficiente para asegurar la conservación de la canal junto al sabor y aroma de la carne.

VETEADO

El veteado es el término empleado en la industria cárnica para referirse a la presencia de motas blancas o vetas de grasa intramuscular entre los haces de fibras musculares. Al microscopio se observan como depósitos de grasa específicos con adipocitos embebidos en la matriz del tejido conectivo cercanos a los capilares sanguíneos (Hocquette et al., 2010).

Dentro de las razas bovinas existen diferencias no sólo en la cantidad de veteado sino también en la estructura y distribución de las motas de veteado en los músculos.

El contenido graso intramuscular también resulta del balance entre la síntesis y degradación de triacilglicéridos (lipogénesis y lipólisis). Por eso, muchas vías metabólicas tanto en el adipocito como en las miofibrillas pueden contribuir a la variabilidad en el contenido intramuscular (Hocquette et al., 2012).

La grasa intramuscular es la suma de fosfolípidos (principalmente localizados en las membranas celulares), triglicéridos (la principal forma de reserva de energía) y colesterol (Hocquette et al., 2010).

Los lípidos musculares son almacenados en menor proporción como fosfolípidos dentro de las miofibrillas y en mayor cantidad como triglicéridos dentro de los adipocitos intramusculares. Por eso, el número de adipocitos intramusculares es un buen predictor del contenido graso intramuscular (Du et al., 2011).

Du et al. (2011) supusieron que el número de adipocitos es un parámetro clave para la acumulación de grasa intramuscular y que una manera de estimar el número de adipocitos intramusculares es valorar la expresión del gen A-FABP, que solo se expresa dentro de los adipocitos. Estos autores demostraron que el grado de expresión de dicho gen era claramente superior en grasa de terneros Japanese Black que producen carne grasa que en terneros Holstein que producen carne más magra que los anteriores. Es un parámetro muy interesante, aunque no forma parte del estudio de este trabajo.

La expresión del nivel de grasa intramuscular generalmente sigue una curva con forma de S que incluye un período al principio de la vida en el cual el nivel de grasa intramuscular no aumenta, un período de desarrollo lineal y a veces, una meseta que representa el máximo de la capacidad de depósito graso en el músculo en animales adultos (o que han alcanzado su madurez).

En este contexto, el nivel de grasa intramuscular al inicio del período de crecimiento es probablemente un determinante clave del nivel final de grasa intramuscular. La mayor parte de la variabilidad depende de las diferencias en el número de adipocitos

intramusculares localizados entre los haces de fibras musculares (Hocquette et al., 2010).

Hocquette et al. (2010) concluyeron que: En los animales, el veteado aumenta con el peso de los animales y aparecen nuevas y pequeñas vetas. Lo cual sugiere que la hiperplasia de los adipocitos juega un papel importante en el veteado durante el crecimiento. Además apuntan a que los adipocitos y células musculares interactúan durante el crecimiento.

En un estudio realizado por Duarte et al. (2013,) se identificó la falta de veteado de la carne como el mayor problema de la calidad de carne de vacuno (junto con la ternura). Esto es debido a la reducción global de la acumulación de grasa, incluyendo la intramuscular, la cual es crítica para la palatabilidad de la carne. Suponen que la solución pasa por incrementar la grasa intramuscular (veteado) sin incrementarla en otros depósitos. En el caso de la ternura, el problema viene del exceso de colágeno, incrementando el tejido conectivo y favoreciendo la dureza.

2.2 Tejido muscular

2.2.1 Características generales

El músculo esquelético representa aproximadamente el 55% del cuerpo. La masa muscular está determinada mayormente por el número y tamaño de las fibras musculares. La miogénesis es el proceso de desarrollo que lleva a la formación de músculo (Bonnet et al., 2010).

La composición química de los músculos es relativamente constante: 75% de agua, 19-25% de proteínas y 1-2% de minerales y glucógeno. Sin embargo, su contenido lipídico es altamente variable. La grasa intramuscular varía del 3 al 11% en diferentes músculos. Esto se explica por patrones biológicos intrínsecos (importancia del metabolismo oxidativo y glicolítico de las fibras musculares) y por factores de la cría y manejo del animal (Hocquette et al., 2010).

El número total de fibras musculares se establece para el final del segundo trimestre de gestación (Bonnet et al., 2010).

2.2.2 Origen

Las células progenitoras de la miogénesis (proceso de formación del tejido muscular) proceden de células mesenquimáticas y promueven el desarrollo en fibras musculares y células satélite. Además de las células satélite, las células progenitoras

multipotenciales, como los pericitos son capaces de diferenciarse en células miogénicas, contribuyendo de ese modo al crecimiento muscular postnatal.

Las miofibrillas primarias son las primeras en formarse durante el período embrionario, en los dos meses iniciales y las secundarias durante el período mediotardío, meses 2 a 7 (Du et al., 2011).

2.2.3 Crecimiento y desarrollo

Durante el desarrollo, el crecimiento muscular es continuo y comprende el incremento del número de miofibrillas (hiperplasia) y de su diámetro y longitud (hipertrofia), la cual depende de las células satélite. Durante el desarrollo fetal, el crecimiento muscular ocurre principalmente mediante hiperplasia. El tamaño de las miofibrillas aumenta desde ese período y continua durante los períodos peri y post-natal (Du et al., 2013).

2.2.4 Metabolismo

MÚSCULOS OXIDATIVOS

Se componen principalmente de fibras rojas (o tipo I), lentas, tónicas. Éstas son cortas, con gran concentración de enzimas del ciclo de Krebs, con riego sanguíneo abundante, gran concentración de mitocondrias (metabolismo oxidativo) y de mioglobina.

Poseen pocas unidades motoras en total, el máximo de fuerza de concentración aparece muy separado del potencial de acción y su contracción es lenta; es decir, están condicionados para realizar movimientos lentos pero constantes y con fuerza. Su actividad miosin-ATPasa es baja (Hall, 2011).

MÚSCULOS GLICOLÍTICOS

Están formados por fibras blancas (o tipo II), rápidas, fásicas. Son fibras más largas que las rojas, con gran concentración de enzimas glicolíticas, riego sanguíneo no muy amplio, baja cantidad de mitocondrias y baja concentración de mioglobina.

Se caracterizan por tener muchas unidades motoras en total, el máximo de fuerza de concentración próximo al potencial de acción y contracción más rápida que las rojas; esto es, están capacitados para realizar contracciones rápidas. La actividad miosín-ATPasa es más elevada (Hall, 2011).

IMPLICACIONES EN LOS MÚSCULOS ESTUDIADOS

La caracterización de los distintos músculos depende de su grado de composición por fibras rápidas o lentas. Los músculos en los que predominan las lentas son considerados oxidativos, mientras que los que poseen mayor cantidad de fibras rápidas se suponen glicolíticos (Hall, 2011).

También se debe tener en cuenta que el transporte de los ácidos grasos se lleva a cabo en el torrente sanguíneo, una vez se ha producido la absorción de nutrientes en el intestino por las lipoproteínas. Debido a esto, se puede pensar que los músculos con fibras lentas (metabolismo oxidativo), los cuales poseen mayor riego sanguíneo, puedan tener mayor facilidad para almacenar grasas (Azain, 2004).

Según Hocquette et al. (2010), las fibras oxidativas contienen más fosfolípidos y más triacilglicéridos, mientras que las glicolíticas tienen menos contenido lipídico. Las razas con más grasa tienden a tener más músculos oxidativos que las que tienen más tejido magro. Estos autores realizaron un estudio en cerdos: Analizaron la parte roja del músculo semitendinoso (48% de fibras de tipo oxidativo) y observaron que presentaba un mayor contenido de lípidos que la parte blanca (Que poseía 20% de fibras oxidativas).

Llegaron a la conclusión de que la mayor cantidad de fibras rojas es probablemente un prerrequisito para el desarrollo de la grasa intramuscular, ya que los adipocitos necesitan vasos sanguíneos en su proximidad para dotarse de triglicéridos. Aunque el hecho de que haya fibras rojas no garantiza el desarrollo de la grasa.

La disminución en el metabolismo oxidativo está asociada con un nivel menor de grasa intramuscular, esto confirma que el recambio de ácidos grasos (mayor en los músculos oxidativos que en los glicolíticos) podría favorecer el depósito de triacilglicéridos en las células adiposas. Un elevado recambio de ácidos grasos combinado con una elevada síntesis de tejido graso favorece la hiperplasia de los adipocitos, lo cual juega un papel fundamental en el vetado durante el crecimiento del animal.

Hocquette et al. (2010) afirman que la tasa de crecimiento del músculo y la actividad metabólica de otros órganos influye en el aumento de la tasa de grasa intramuscular, por lo que ésta no depende únicamente de la variación durante el desarrollo del número y actividad metabólica de los adipocitos dentro del músculo.

Así mismo indican que animales con gran masa muscular de alta actividad glicolítica o tejidos con gran actividad glicolítica generalmente muestran un menor desarrollo del vetado.

Por otro lado, en los rumiantes el músculo masetero está compuesto completamente por fibras lentas, oxidativas en el adulto. La diferenciación contráctil ocurre tarde en

comparación con la de los otros músculos y su actividad oxidativa es mayor (Picard et al., 1996).

El masetero presenta una diferenciación muscular retrasada en comparación con otros músculos, como el semitendinoso. Su composición en fibras es más específica (en composición y en tamaño) que otros músculos, lo que según Picard et al. (1996) se podría deber a poseer una actividad mecánica más prolongada que el resto de músculos de un rumiante. El músculo esternomandibularis también presenta un metabolismo oxidativo, pero su cantidad de grasa es menor que la del masetero. Además, posee el haz muscular bien separado del tejido conectivo (formado por adipoblastos) (Duarte et al., 2013).

En cuanto al músculo semitendinoso, éste es un músculo glicolítico, rápido. Su contenido lipídico es menor que en los oxidativos como el recto abdominal, sobre todo por los triacilglicéridos. Tiene menos proporción de fibras de tipo I, lentas y más de tipo II, glicolíticas, rápidas. Del mismo modo, tiene más enzimas glicolíticas y menos actividad de las enzimas oxidativas (Hocquette et al., 2010). En el caso de Longissimus dorsi, las características que presenta son similares, ya que es un músculo con metabolismo glicolítico (Muriel et al., 2002). Aunque, en este caso, el contenido de grasa intramuscular incrementa linealmente durante el período de alimentación, de forma más abundante, dando soporte adicional al veteado como tejido de desarrollo temprano (Kern et al., 2014).

(Sadkowski et al., 2014) realizaron un estudio para medir el porcentaje de grasa intramuscular presente en el músculo semitendinoso. Observaron que los valores eran de un 0,53% en animales *Limousin* de 15 meses, de 1,1% en Frisona Holstein y de 0,81% en terneras Hereford, lo que se quedaba bastante alejado de los parámetros que se suelen obtener para Longissimus Dorsi a esas edades (más del 2% de veteado).

Con respecto a la calidad de la carne, Muriel et al. (2002) realizaron un estudio para comparar el metabolismo de un músculo oxidativo (Masster) y uno glicolítico (Longissimus Dorsi) con la calidad de la carne. Llegaron a la conclusión de que existe relación entre el tipo de metabolismo y la calidad de la carne para los parámetros de color y oxidación (mayor en el masetero).

2.3 Relaciones entre tejido graso y tejido muscular en los animales de carne

2.3.1 Vinculación

Las canales están compuestas de músculo, grasa, tejido conectivo y hueso, todos ellos derivados de células mesenquimales multipotenciales. Por ello, el desarrollo del tejido graso y el muscular están vinculados y se puede pensar que uno depende del otro y viceversa. En el caso del tejido muscular, el período fetal es crucial porque luego no aumenta el número de fibras musculares tras el nacimiento (Du et al., 2011).

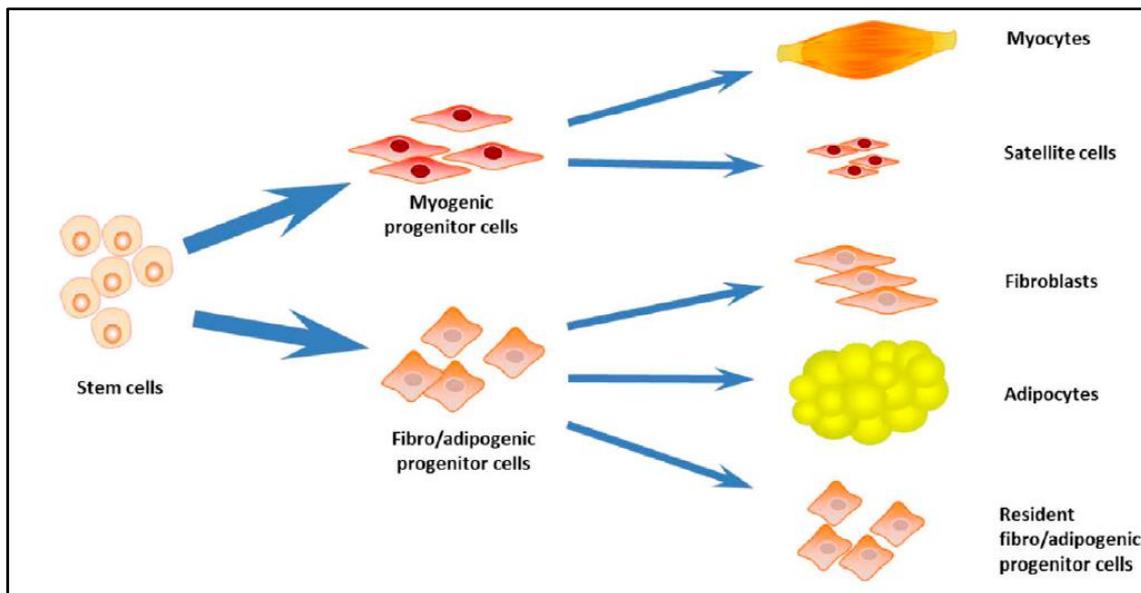


Figura 8: Desarrollo de las células musculares y de los adipocitos, a partir de células mesenquimatosas (adaptado de Du et al., 2013)

Du et al. (2011) consideraron que la carne magra está compuesta por fibras musculares, células grasas y fibroblastos y partieron de que el desarrollo del tejido muscular incluye la miogénesis, adipogénesis y fibrogénesis, a partir de células mesenquimales.

Realizaron un ensayo promoviendo cada uno de estos procesos, por separado, y vieron que: Promoviendo la miogénesis aumenta la masa magra, promoviendo la adipogénesis intramuscular incrementa la grasa intramuscular y promoviendo la fibrogénesis se favorece la acumulación de tejido conectivo (proporciona dureza a la carne).

Como ya se ha comentado anteriormente, el número total de fibras musculares, en vacuno, se establece para el final del segundo trimestre de gestación. Por el contrario, el número de adipocitos no se fija nunca; es decir, no hay un momento en el que dejan de aumentar, de sintetizarse nuevos. El aumento principal se da desde antes del

nacimiento hasta el primer año de vida, dependiendo de su localización anatómica (Bonnet et al., 2010).

Bonnet et al. (2010) concluye que las células adiposas y musculares parecen estar vinculadas en la competición por su cometido, diferenciación y metabolismo de nutrientes. Todo esto determina su número y tamaño.

2.3.2 Interacciones

Los tejidos adiposo y muscular, en el ganado, crecen mediante el incremento del número de células (hiperplasia), principalmente durante la vida fetal. Las interacciones entre ambos pueden regular el equilibrio dinámico entre el número y tamaño de las células adiposas del músculo. El aumento del almacenamiento de nutrientes en los adipocitos y fibras musculares totalmente diferenciadas, que resulta en el agrandamiento de las células (hipertrofia), se piensa que es el principal mecanismo por el cual incrementa la masa grasa y muscular (Du et al., 2011).

Según Bonnet et al. (2010) la contribución de la hiperplasia y la hipertrofia al crecimiento del tejido adiposo varían en función de la edad y la localización anatómica del tejido. Por ello el tipo de músculo en el que se desarrolle la grasa influye en los procesos lipídicos.

La grasa es depositada en menor medida que el músculo durante los primeros períodos de la vida postnatal y en mayor medida que los tejidos magros cuando el animal crece. Debido a esto, la concentración de grasa en el músculo inevitablemente aumentará a lo largo de la vida del animal. Esto no quiere decir que la grasa intramuscular tenga una maduración más tardía que el resto de depósitos grasos (Hocquette et al., 2010).

Las sucesivas oleadas de crecimiento del músculo y del tejido adiposo sugieren una prioridad para el crecimiento del tejido muscular. En ganado Azul Belga el elevado desarrollo muscular está combinado con una disminución del tejido adiposo muscular (Bonnet et al., 2010).

2.4 Raza Pirenaica

2.4.1 Precedentes

Los terneros cuya grasa ha sido estudiada en el presente Trabajo Final de Grado pertenecen a la raza Pirenaica, una raza autóctona de Navarra y de otros territorios cercanos como Guipúzcoa, Vizcaya, Álava y Aragón.

En el siglo XIX y principios del XX tuvo un papel fundamental en la ganadería, debido a su triple aptitud (trabajo, carne y leche). Posteriormente, fue relegada por razas foráneas, corriendo serio peligro de extinción en la década entre 1950 y 1960.

Primero fue expulsada por la Frisona de las zonas más productivas y en las zonas más difíciles fue cruzada con la Pardo Alpina, para proporcionar mayor precocidad y condición carnicera. Afortunadamente, pudo recuperarse mediante diversos programas de conservación, fomento y mejora (Echeverría, 1975; Aranguren, 2002).

En la Figura 9 se aprecia la evolución que esta raza ha ido sufriendo a lo largo del tiempo.



Figura 9: Evolución morfológica de la raza Pirenaica (Aranguren ,2002)

2.4.2 Situación actual y censo

En la actualidad su censó se encuentra en expansión y ocupa un lugar importante entre las razas productoras de carne de España. Se distribuye en la vertiente sur de los Pirineos, de los cuales toma su nombre. Comprende desde el norte de Navarra y noroeste de Gipúzcoa, hasta el norte de Lérida y Gerona (Buxadé, 1998). Existen asociaciones de Pirenaica en Cantabria, País Vasco, Navarra, Aragón y Cataluña (CONASPI, 2015).

Su comercialización está amparada por la IGP “Ternera de Navarra-Nafarroako Aratxea”, suponiendo el 90% de la carne comercializada bajo esta marca de calidad (MAGRAMA, 2015).

La Confederación de Asociaciones de Ganado Vacuno Pirenaico (CONASPI) es la institución encargada de gestionar el libro genealógico, además de desarrollar actividades que tengan como objetivo la conservación de la raza y su promoción (mejora genética, participación en ferias, cursos de formación, etc.) (CONASPI, 2015).

CONASPI está formada por siete asociaciones: ASPINA (Navarra), ASGAPIR (Vizcaya), ASAPI (Aragón), ASPIC (Cataluña), HEBE (Guipúzcoa), ARPIEL (Álava) y ASPICAN (Cantabria) (Aranguren, 2002).

De acuerdo con los datos proporcionados por CONASPI en su Informe y memoria de 2014, a 31 de diciembre de ese año había inscritos en el libro genealógico 40.077 ejemplares: 5294 machos y 34.785 hembras.

Tabla 1: Censo de ganado pirenaico 2014 (CONASPI, 2015)

	MACHOS	HEMBRAS < 2 AÑOS	HEMBRAS > 2 AÑOS	TOTAL
GUIPÚZCOA	591	836	1784	3211
VIZCAYA	563	929	2119	3611
ÁLAVA	473	733	2858	4064
CANTABRIA	331	755	3266	4352
ARAGÓN	477	661	2064	3202
CATALUÑA	30	155	285	470
NAVARRA	2829	3478	14860	21167
TOTAL CONASPI	5294	7547	27236	40077

Como puede apreciarse en la Tabla 1, la Comunidad Foral de Navarra cuenta con la cabaña más numerosa (21.167 individuos), más de la mitad de los animales registrados en el libro genealógico), seguida por el País Vasco, con 10. 886 ejemplares; es decir, casi el 28 % de los animales inscritos (CONASPI, 2015).

2.4.3 Características de la raza

MORFOLÓGICAS

Francisco Javier Aranguren Garde, en el libro “La raza Pirenaica” (2002), detalla el estándar racial del ganado Pirenaico:

- Cabeza de medianas proporciones, con encornadura hacia delante, de sección circular en su nacimiento, en lira y ligeramente en espiral.
- Perfil fronto-nasal subcóncavo, ojos salientes, cara más bien corta, hocico ancho y maxilares robustos.
- Cuello musculado, bien unido a la cabeza y al tronco, de línea superior recta e inferior con papada, como vestigio y prueba de la primitividad de la raza.
- Línea dorso-lumbar recta, nacimiento alto de la cola (encallado), costillar arqueado, grupa larga y horizontal y algo angulosa, muslos y nalgas muy desarrollados y descendidos.
- Esqueleto fino, compacto. Aplomos correctos. Pezuñas bien desarrolladas y puestas, duras y resistentes.
- Capa monocolor: trigueña más o menos clara “GORRI” o “ZURI”, con aureola alrededor de los ojos (ojo de perdiz), axilas, bragadas y hocicos sin pelos de otro color.
- Mucosas de color carne sonrosadas.
- Cuernos de color blanco nacarado, con las puntas color amarillento y pezuñas de color claro “con visos de color amarillento”.
- Ubre bien formada en tamaño, separación, inserción y longitud de los pezones, y desde luego sin los “pelos largos de lobo” de la primitiva raza vasca.

Funcionalmente, en la actualidad, y para los ejemplares más selectos, la producción de carne permite animales precoces, de alto rendimiento, bajo IT y buenos cortes comerciales. Sin embargo, la generalidad del ganado se distancia en precocidad, conformación e IT (Buxadé, 1996).

PRODUCTIVAS

Las características productivas que resaltan en esta raza son (CONASPI, 2015):

- Buena conformación.
- Buenas características reproductivas (fertilidad y capacidad para el parto).
- Buenas características maternas (Buena nodriza y capacidad lechera).
- Presentan docilidad.
- Buen desarrollo muscular y estructura ósea.
- Raza longeva (unos 12 de años de vida productiva).

Como datos significativos, se pueden tener en cuenta los analizados por Blasco et al. (1992). Estos autores realizaron un estudio con madres y terneras para ver los valores que la raza Pirenaica tiene en varios aspectos fundamentales.

Las madres presentaron un peso post-parto de 491,8 Kg (las primíparas) y 568,9 (las múltiparas). Respecto a la alzada a la cruz, se obtuvieron unos valores de 126,8 y 130, cm, respectivamente.

Respecto a las terneras, se estudiaron los pesos al nacer (37 Kg las nacidas de primíparas y 41 Kg las nacidas de múltiparas) y al destete (187 y 188 Kg, respectivamente). Contando los días que transcurrieron hasta el destete, calcularon unas ganancias medias diarias de 0,908 Kg para terneras de primíparas y de 0,847 para las de múltiparas.

CARNICERAS

Otros datos característicos de esta raza fueron estudiados por Alberti et al. (2001) y se describen en la Tabla 2:

Tabla 2: Características comerciales de la raza Pirenaica

Categoría	Ternero	Añojo	Añojo pesado
GMD (kg/d)	1.54	1.7	1.75
ICC (kg/kg)	4.3	4.1	4.3
Peso canal (kg)	184	284.2	352.8
Rendimiento canal (%)	60.3	61.7	63.4
Clasificación (SEUROP, 1 a 5)	R 1+	U- 2	U+ 2+

- GMD: Ganancia media diaria
- ICC: Índice de conversión concentrado



Figura 10: Ejemplares, macho (A) y hembra (B), de la raza Pirenaica (CONASPI, 2015)

3. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

El objetivo fundamental de este trabajo es estudiar la relación entre la grasa intramuscular y el tipo de músculo en la que se desarrolla, en ganado vacuno de carne de la raza Pirenaica

Como objetivos específicos se han definido:

- Analizar la distribución del tamaño de los adipocitos en distintos músculos y en el depósito subcutáneo.
- Estudiar el porcentaje de grasa intramuscular de cuatro músculos con características diferentes entre sí.
- Determinar el grado de veteado existente en la carne procedente de los terneros objeto de estudio.

A continuación se describe el diseño experimental planteado para alcanzar los objetivos citados:

Se van a utilizar 4 terneros machos de raza Pirenaica, sacrificados a edad y pesos comerciales e inmediatamente tras el sacrificio se tomarán muestras de cuatro músculos que difieren en sus características histoquímicas y metabólicas así como en su valor comercial, para analizar el tamaño de los adipocitos y su distribución:

- *Longissimus dorsi*
- *Semitendinosus*
- *Masseter*
- *Sternomandibularis*

Se analizará, también, el depósito Subcutáneo como referente, dado que es un depósito mucho más estudiado en cuanto a tamaño y número de adipocitos que el intramuscular y existen muchos más datos en la bibliografía.

Se tomarán además muestras del *Longissimus Dorsi* de la media canal izquierda a la altura de la décima costilla, para analizar el grado de veteado.

Todos los animales de la experiencia han sido criados y cebados en las mismas condiciones, para minimizar en lo posible los factores ambientales.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Animales

Se utilizaron 4 terneros machos de raza Pirenaica, pertenecientes a la ganadería Labayen, de Huici (3 terneros) y a la ganadería Bovi River SCI, de Cabanillas (1 ternero).

Estos terneros fueron criados de forma convencional. Estuvieron con sus madres hasta los 4-5 meses, cuando fueron destetados y llevados al cebadero. Allí permanecieron otros 6 meses hasta ser sacrificados.

La alimentación fue la estándar para este tipo de terneros acogidos a la I.G.P “Ternera de Navarra” (GOBIERNO DE NAVARRA, 2000); es decir, pienso y paja de cereal, *ad libitum*, durante el cebado.

Fueron sacrificados con \pm 368 días, tal como se muestra en la Tabla 3:

Tabla 3: Datos de los animales analizados en el momento del sacrificio

	Ternero 1	Ternero 2	Ternero 3	Ternero 4
Nº animal	ES 05 140 27 147 58	ES 07 140 27 147 61	ES 06 140 27 147 59	ES 01 140 27 006 56
Procedencia	(MC Labayen, Huici)	(MC Labayen, Huici)	(MC Labayen, Huici)	BoviRiver SCI (Cabanillas)
Fecha de nacimiento	28/02/2013	02/03/2013	28/02/2013	07/12/2012
Fecha de sacrificio	06/02/2014	06/02/2014	06/02/2014	06/02/2014
Nº sacrificio	1	2	3	4
Hora de toma de muestra del longissimus	11:14	11:28	11:42	11:57

4.1.1 Sacrificio y toma de muestras

El sacrificio de los terneros tuvo lugar el día 6 de Febrero de 2014 en el matadero comercial “La Protectora” (Pamplona). Los animales fueron aturdidos con el método de la bala cautiva. A continuación se suspendieron en el aire, enganchados por la pata posterior izquierda y se sacrificaron por degüello. Después de desangrarlos se continuó el faenado a lo largo de la cadena de sacrificio del matadero.

Una vez terminada la evisceración, se tomó muestras de los distintos depósitos a analizar: Los cuatro depósitos intramusculares (Longissimus Dorsi, Masseter, Semitendinosus y Sternomandibularis) y el depósito Subcutáneo. La extracción de la grasa del Longissimus Dorsi y del Subcutáneo se realizó en la región dorsal izquierda a la altura de la 10ª costilla y fueron los primeros en llevarse a cabo, ya que se extraen en la línea de sacrificio. El Masetero se cogió una vez se había desprovisto al animal de su cabeza y la grasa de Semitendinosus y Sternomandibularis se extrajo en la sala de oreo, pocos minutos después.

Las muestras extraídas consistieron en fracciones de 3-5 gramos de peso. Éstas, se conservaron en tubos con una solución Tirode (0,15 M NaCl; 6 mM KCl; 2 mM CaCl₂; 6 mM Glucosa; 2 mM NaHCO₃), ajustado a un pH de 7,62, en termos con agua a 39°C (temperatura fisiológica en ganado ovino para evitar la lisis de los adipocitos). Así, fueron transportadas hasta el laboratorio, donde se procesaron inmediatamente.

Además, a las 24 horas, en la sala de despiece, se extrajo (en la cámara de oreo) una fracción de 2 cm Longissimus Dorsi (10ª costilla, por ser la más empleada en la bibliografía) para determinación del veteado. Se envasó al vacío y se congeló a -20°C hasta su utilización.

Por último, se midió el espesor de grasa dorsal con un calibre digital a la altura de la 10ª costilla de la canal derecha y la nota de engrasamiento y de conformación se determinaron conforme a la clasificación oficial (Reglamento C.E. nº 103/2006).

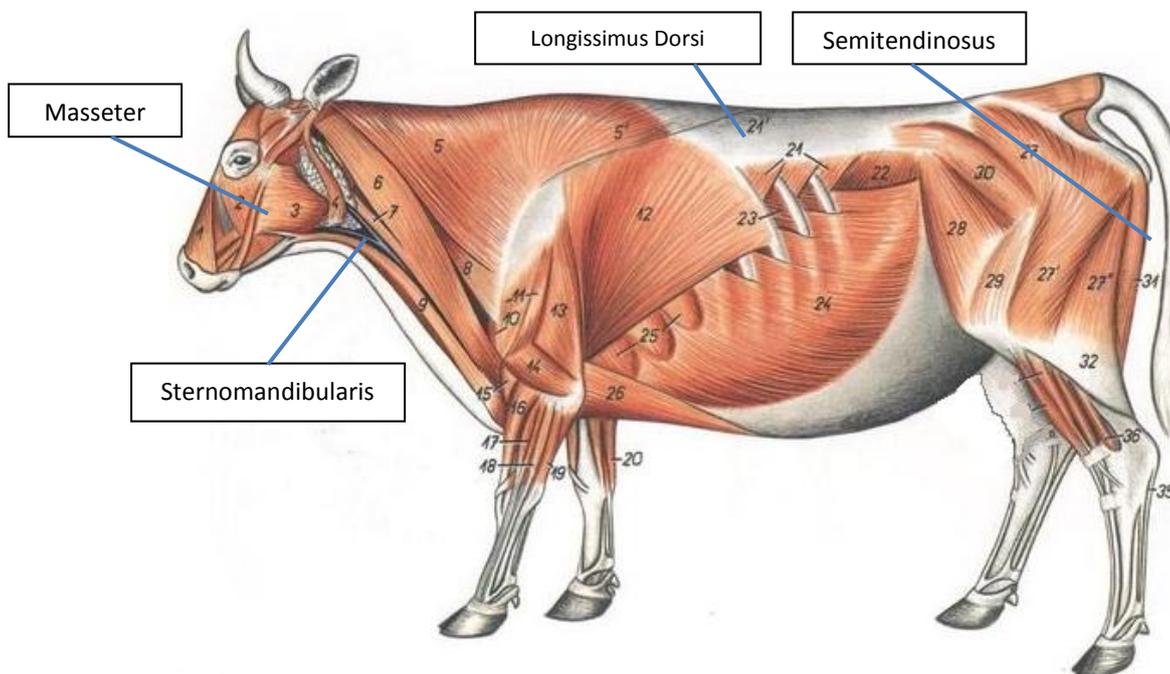


Figura 11: Posición de los tejidos intramusculares analizados en el animal

En la Tabla 4 se presenta el sistema identificativo de las 20 muestras de grasa estudiadas (4 animales x 5 depósitos grasos).

Tabla 4: Muestras analizadas

DEPÓSITOS	Longissimus	Semitendinosus	Masseter	Sternomandibularis	Subcutáneo
PIRENAÍCO 1	P1L	P1S	P1M	P1T	P1SC
PIRENAÍCO 2	P2L	P2S	P2M	P2T	P2SC
PIRENAÍCO 3	P3L	P3S	P3M	P3T	P3SC
PIRENAÍCO 4	P4L	P4S	P4M	P4T	P4SC



Figura 12: Canal derecha de los 4 animales sacrificados

4.2 Contenido en grasa de los diferentes músculos

La estimación de la cantidad (en porcentaje) de grasa en los cuatro músculos se realizó mediante el método Soxhlet (Soxhlet, 1879; ISO 1443, 1973). Se partió de una muestra de músculo que se trituró con el fin de homogeneizarla. Se dividió la muestra en dos para realizar una réplica de cada análisis. Se realizó una digestión de 5 mg de muestra, añadiendo 300ml de HCL 3M y dejándolo hervir durante una hora. Después se filtró la digestión y el filtro se dejó secando a 70°C hasta el día siguiente. Una vez seco el filtro, se procedió a la extracción y medición de la grasa. Para ello, el filtro se introdujo en un sifón que había sido ensamblado a un matraz previamente tarado y todo ello se colocó en un baño de agua. Se llenó el sifón de éter y se calentó el baño de manera que el éter pudiese realizar ciclos (unos 10 por hora) desde el sifón al matraz durante 7 horas. Una vez pasado el tiempo establecido, se volvió a medir el peso del matraz, pudiendo calcular de esta manera el porcentaje de grasa depositado en el matraz que había sido arrastrado desde el filtro mediante el éter.

$$\% \text{ Grasa} = \frac{(\text{Peso del matraz con grasa} - \text{Peso del matraz vacío})}{\text{Peso de la muestra}} * 100$$

4.3 Determinación del grado de veteado

Se ha empleado la metodología de análisis de imagen que, manteniendo el criterio de rapidez en la determinación que caracteriza al método de los patrones fotográficos, aporta una mayor objetividad que los modelos de patrones fotos que se utilizaban en el pasado. De esta forma obtenemos, de manera precisa, la proporción de grasa de veteado presente en la carne (Mendizabal et al., 1998).

Para llevar a cabo este proceso se emplearon los filetes de 2cm de Longissimus Dorsi que se habían congelado a las 24 h. del sacrificio. Éstas, se descongelan en un frigorífico a 3°C durante 24h.

A continuación, ayudados por pinza y bisturí, se diseccionó y retiró los restos de grasa externos al músculo o los trozos de otros músculos contiguos.

Para conseguir unas buenas imágenes de las muestras, para su posterior digitalización, se emplearon un sistema de iluminación de focos, una cámara gran angular y un ordenador con el programa de adquisición de imágenes "Image pro-Plus (Versión 5.1) (anexo 2). Una vez digitalizadas las imágenes, se utilizó el Software libre de análisis de imagen "ImageJ", para realizar las medidas morfológicas. Éstas fueron el área total del músculo, área de las vetas de grasa intramuscular y n° de vetas.

El grado (porcentaje) de veteado se obtuvo al dividir el área de grasa que sumaban todas las vetas entre el área total del músculo.

El proceso detallado de la medida del veteado está recogido en el *anexo 1*.



Figura 13: Equipo para la medición del veteado



Figura 14: Imagen de un de las chuletas analizadas

4.4 Determinación del tamaño de los adipocitos

4.4.1 Método laboratorial. Digestión por colagenasa

Las muestras de grasa fueron trasladadas desde el matadero al laboratorio en termos de agua a 39 °C. El proceso a seguir con cada una de ellas consistió en sacarlas del termo en el que venían del matadero y desmenuzarlas con pinzas y tijeras en una placa Petri sobre placas calefactadas (Figura 15). Las muestras picadas se metieron en el recipiente Erlenmeyer que contenía la solución citada y se volvieron a meter en la estufa para que se produjera la digestión.

La técnica que se empleó para el estudio del tamaño de los adipocitos fue la digestión de las muestras con colagenasa descrita por Robdell (1964). Por efecto de la colagenasa la matriz del tejido conjuntivo que rodea a los adipocitos es digerida, quedando éstos libres y listos para ser observados a microscopio.

Para ello, fue necesario preparar de antemano la solución de digestión (5mL medio 199 comercial, 200mg seroalbúminabovina; 5mg y 10mg de colagenasa tipo II para el depósito SC e IM respectivamente, ajustándola a un PH entre 7,00 y 7,40) y calentarla en una estufa a 39°C.

Tras 90 minutos a 39°C en la estufa (Figura 15), las muestras estaban listas para ser analizadas en el microscopio. Se sacaron de la estufa a medida que se iban analizando. Se iba filtrando su contenido a través de un tamiz para eliminar los restos de tejido graso y con una pipeta se colocaba una gota de solución de incubación en el portaobjetos.



Figura 15: Picado de muestras y almacenamiento en estufa (39°C)

4.4.2 Método morfométrico. Análisis de imagen

Una vez que teníamos las preparaciones se procedió a digitalizar las imágenes microscópicas para su posterior procesamiento mediante la técnica de análisis de imagen (Arana et al., 2005).

Para llevar a cabo este proceso se dispuso de un microscopio óptico (40x), una cámara de video acoplada a él y conectada a un ordenador, así como el software informático "Image-Pro Plus" (Versión 5.1).

Una vez se tuvieron las imágenes digitalizadas en el ordenador se fueron procesando con el software informático "Image-Pro Plus" (Versión 5.1).

En el *anexo 2* se detalla, poco a poco, el procesamiento de las imágenes.

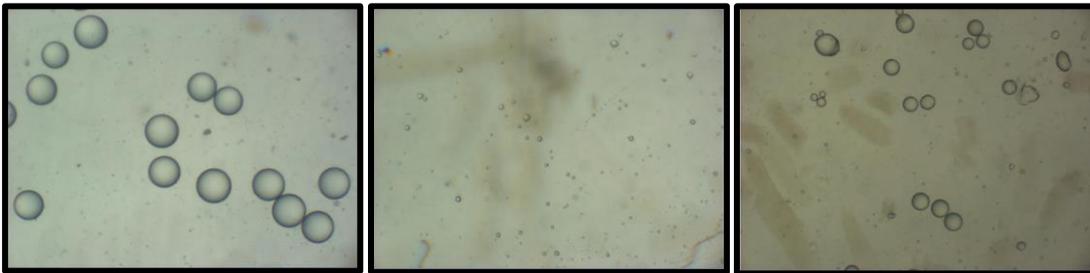


Figura 16: Imágenes microscópicas (x400) de adipocitos del depósito Subcutáneo, Longissimus Dorsi y Masster

Se obtuvieron los diámetros en micras (μm) de, entre 100 y 200, adipocitos por depósito y animal, para que la muestra cuantificada fuera representativa.

4.5 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el programa informático Adip SD, creado por Alfonso (2014) y de libre acceso para su uso. En él se describe la unimodalidad o bimodalidad de la distribución del tamaño de adipocitos y se calculan los parámetros adecuados de comparación entre grupos de datos.

Para el cálculo del tipo de distribución, se introdujeron en el software los datos obtenidos de cada depósito (músculo) para el conjunto de todos los animales ($n=4$). El programa contrasta la unimodalidad de los datos y los analiza utilizando distintos estadísticos en función de que la hipótesis de unimodalidad sea o no rechazada. Si se rechaza, se asume que la distribución de los datos es bimodal y se calculan los estadísticos descriptivos de la bimodalidad.

Los contrastes de unimodalidad se llevan a cabo mediante el Coeficiente de Bimodalidad (BC) y el estadístico Dip.

- El Coeficiente de Bimodalidad es:

$$BC = (m_3^2 + 1) / (m_4 + [3 \cdot ((n-1)^2) / ((n-2) \cdot (n-3))])$$

Dónde: m_3 es el sesgo y m_4 el exceso de curtosis o apuntamiento.

Para una distribución uniforme el valor de BC es 0.555, por lo que valores mayores pueden indicar ausencia de unimodalidad, aunque es cierto que podrían estar indicando distribuciones unimodales fuertemente sesgadas.

- El test estadístico Dip calcula el intervalo modal, que corresponde a los valores a y b de la distribución uniforme:

$$f(x) = 0 \text{ para } x < a; f(x) = 1/(b-a) \text{ para } a \leq x \leq b; f(x) = 0 \text{ para } x > b$$

La significación de la hipótesis de distribución unimodal se evalúa comparando el valor del estadístico *Dip* con los valores empíricos obtenidos bajo esa hipótesis para un nivel de significación del 5%. Si el valor de *Dip* es menor que el valor correspondiente a la significación del 5% no se rechaza la hipótesis nula de unimodalidad. Dado el carácter conservador del test, el programa calcula también el valor correspondiente a una significación del 10% para valorar mejor la posible existencia de bimodalidad. Si el valor es mayor que el 5% de significación, se rechaza la unimodalidad y se asume una distribución bimodal.

Si ambas pruebas, *BC* y *Dip*, rechazan la hipótesis de unimodalidad, se puede considerar que los datos se distribuyen bimodalmente. Cuando los resultados de ambas pruebas no convergen, se puede considerar la prueba *Dip* como una medida más adecuada de la bimodalidad que el *BC* (Freeman y Dale, 2013).

Una vez contrastada la hipótesis de unimodalidad, se calcularon los estadísticos habituales de una población que sigue una distribución normal (media, mediana, moda, mínimo, máximo) y algunos parámetros descriptivos de las distribuciones bimodales para los depósitos que presentaban esta distribución (moda 1, moda 2, nadir o punto de inflexión menor, porcentaje de adipocitos sobre el nadir y la relación entre el número de adipocitos por debajo y por encima del nadir). Los pasos seguidos para el análisis de los datos fueron realizados siguiendo las pautas de Alfonso y Mendizabal(2014).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Características de la canal

En la Tabla nº 5 se muestran los valores de los parámetros productivos y de la canal de los 4 terneros Pirenaicos (P1, P2, P3 y P4)

Tabla 5: Parámetros productivos de los terneros de raza pirenaica, sacrificados con 12 meses de vida aprox.

PARÁMETRO	P1	P2	P3	P4	E.E.
EDAD SACRIFICIO (d)	343	361	343	426	19.71
PESO SACRIFICIO (KG)	508.9	464.2	601.6	521.1	28.63
PESO CANAL CALIENTE(kg)	314	286.4	371.2	321.5	17.67
PESO CANAL FRÍA(kg)	307.5	280.5	363.5	315	17.29
GMD (kg/d)	1.37	1.18	1.64	1.13	0.12
ESPELOR GRASA DORSAL (mm)	4.56	3.68	5.13	5.76	0.52
CONFORMACIÓN (SEUROP)	U+	U	U+	U+	-
ENGRASAMIENTO (1-5)	2	2-	2	2	-

*Los errores estándar (E.E.) son para la media de los 4 valores.

- La GMD (ganancia media diaria) se ha calculado considerando un peso medio al nacimiento de 38,8 kg (Blasco et al., 1992).
- P1, P2, P3 y P4 hace referencia a cada ternero estudiado.
- Los valores de conformación y engrasamiento se establecen según el reglamento (CE) 103/2006.

Se puede comprobar que, las edades y los pesos de sacrificio corresponden con la de terneros Pirenaicos machos acogidos a la IGP “Ternera de Navarra” (de 9 a 13 meses de edad y entre 450 y 600 kg de peso vivo), aunque uno de los terneros excede en la edad.

Los pesos de sacrificio permiten calcular la ganancia media diaria, la cual es adecuada para animales de esta raza y sacrificados con 12 meses, como ha sido demostrado por autores como Alberti et al. (2001), quienes obtuvieron unas ganancias de entre 1,5 kg y 1,8 kg/d para terneros de 12 meses de raza Pirenaica. Hay que tener en cuenta que la GMD se ha calculado para todo el periodo vital de los animales y no solo para la época de cebado (últimos 6 meses), por lo que se entiende que los valores sean un poco inferiores que los de Alberti et al. (2001). La conformación y la nota de engrasamiento también coincide, por lo que se puede pensar que los animales presentan, de partida, unas características normales para su edad y raza.

Se observa que el ternero con mayor peso de canal posee, también el valor más alto para el espesor de la grasa dorsal. Esta analogía se repite en el ternero de menor peso, el cual tiene el menor espesor de grasa dorsal.

5.2 Contenido en grasa de los diferentes músculos

Una vez determinado en contenido en grasa química mediante el método Soxhlet de extracción química, para todos los animales, se han obtenido los siguientes resultados:

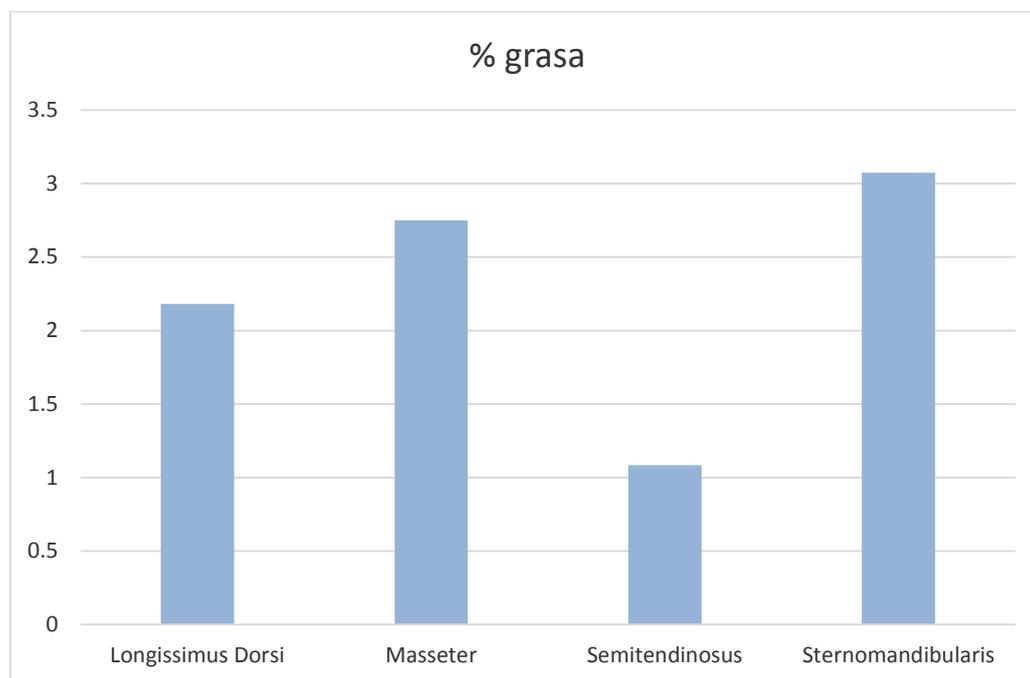


Figura 17: Porcentaje de grasa contenida en el depósito intramuscular de los diferentes músculos

Los datos obtenidos apuntan a refutar la opinión de que la raza que se ha estudiado para este proyecto (la raza Pirenaica) posee un bajo nivel de engrasamiento, tal y como se ha descrito en trabajos anteriores, por autores como Alberti et al. (2001) o Sayed et al. (2007), quienes encontraron valores de grasa intramuscular, para esta raza, inferiores al 4%. Otras razas, como “Black japanese” han presentado valores de grasa intramuscular de hasta el 23,3%, según Gotoh et al. (2009). Aunque en dicho estudio los animales eran de 24 meses.

Observando la Figura 17, se observa que, de los diferentes músculos, los que poseen fibras oxidativas (con mayor capacidad de síntesis de ácidos grasos), como son el Masseter y el Sternomandibularis, presentaron más porcentaje de grasa que los glicolíticos (Longissimus Dorsi y Semitendinosus), cuya fuente principal de energía proviene de la glucólisis.

Los depósitos glicolíticos frente a los oxidativos fueron estudiados por Hocquette et al. (2010), quienes demostraron que los depósitos glicolíticos tienen menos contenido en lípidos (sobre todo en triglicéridos), que los oxidativos. Para ello, utilizaron los músculos Semitendinosus (glicolítico) y Recto Abdominal (oxidativo).

Dentro de los glicolíticos, el Semitendinosus presenta menor contenido graso que Longissimus Dorsi. En un estudio realizado recientemente (Sadkowski et al., 2014) se

analizó el grado de engrasamiento del músculo Semitendinosus de tres razas comerciales (terneros Limousin, Frisona Holstein y Hereford de 15 meses) y encontraron valores de contenido en grasa de 0,53%, 1,1% y 0,81% respectivamente. Por lo tanto, nuestra hipótesis también apunta a un contenido lipídico menor en Semitendinosus que en Longissimus Dorsi.

Otros autores que apuntan en esta dirección son Albrecht et al. (2006) quienes estudiaron diferencias entre los músculos Longissimus y Semitendinosus y comprobaron que Longissimus tenía más superficie de veteado y más número de vetas (1,5 y de 2,5 a 4 veces más respectivamente) que Semitendinosus.

En cuanto a los músculos oxidativos (Masseter y Sternomandibularis), se piensa que su metabolismo influye incrementando el nivel de grasa acumulada, ya que necesitan realizar la oxidación de los ácidos grasos para conseguir energía. Sería por eso que presentan valores más altos.

Duarte et al. (2013) analizaron el porcentaje de grasa intramuscular presente en el músculo Sternomandibularis de animales de raza Angus y Wagyu (con 24 meses) y obtuvieron resultados de 1,8% y 3,2 %, respectivamente.

Todos estos datos concuerdan con las hipótesis de Hocquette et al. (2010), quienes afirmaban que las fibras oxidativas contienen más fosfolípidos y triacilglicéridos, mientras que las glicolíticas presentan un menor contenido lipídico. Debido a ello, podemos creer que existe una relación entre el tipo de metabolismo de los músculos y su contenido lipídico total, siendo éste más alto en los músculos oxidativos.

5.3 Grado de veteado de la carne

En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos al determinar el grado de veteado de la carne por medio del análisis de imagen de las fotografías del músculo *Longissimus Dorsi*.

Tabla 6: Grado de veteado (marbling) del Longissimus Dorsi (L.D.) de los 4 terneros estudiados

VETEADO	P1	P2	P3	P4	E.E.
Área L.D. (cm ²)	148.77	124.90	145.13	129.84	3.95
Área Grasa (cm ²)	2.17	1.63	2.41	2.57	0.17
Número Vetas	20.00	16.50	19.00	30.50	1.75
Veta media (cm ²)	0.11	0.10	0.13	0.08	0.02
Grasa IM (%)	1.45	1.29	1.66	1.98	0.10

Los datos son obtenidos con la imagen superior e inferior de cada chuleta.

En cuanto a los datos obtenidos por medio del método del veteado, vemos que el animal menos pesado es el que menor área de músculo muestra y el de más peso tiene más área que los demás. Esto concuerda con otros estudios realizados anteriormente, como Goñi et al. (1999), que encontraron esta misma relación positiva. Sin embargo, se puede apreciar, como el animal con menor área presenta más grasa que otros animales más pesados.

Se puede comprobar que la Pirenaica es una raza bovina con un grado de veteado muy bajo, no llegando al 2% en ninguno de los animales estudiados por este método. Pascual (2011) determinó que el grado de veteado medio para terneros de raza Pirenaica de 12 meses se establecía en torno al 2.4 %.

A pesar de obtener resultados ligeramente inferiores por el método del veteado, éste nos sirve para corroborar que la raza Pirenaica tiene unos niveles de engrasamiento inferiores a los de otras razas comerciales. Así, por ejemplo, en terneros de razas "German Angus", "Galloway" y "Frisona Holstein" se han encontrado valores de veteado de 3.22%, 3.51% y 3.92%, respectivamente, para terneros de 12 meses en Longissimus Dorsi (Albrecht et al., 2006).

Además, cabe reseñar que los terneros que poseen un porcentaje más alto de veteado, es por tener vetas más grandes, no por haber presentado mayor número de vetas. En este sentido, observamos que tanto el número, como el tamaño de las vetas es mucho inferior que los resultados que obtuvieron Albrecht et al. (2006) para las razas comentadas, donde observaron una cantidad de vetas por filete superiores a 100 y unos tamaños medios de veta de entre 0,9 y 1,3 mm².

Un estudio de Zea et al. (2007) concluye que la carne de terneros alimentados con pienso, en vez de heno o ensilado, poseen mayor veteado. Ya que los terneros de nuestro estudio fueron alimentados con pienso, cabe la posibilidad de que hubieran presentado valores aún más pequeños de veteado en el caso de haber realizado la experiencia con terneros alimentados con otra dieta.

Por todo ello, podemos pensar que el desarrollo del veteado se produce, tanto por aumento de vetas, como por aumento del tamaño de las mismas; esto es, los terneros más engrasados presentan más número de vetas y más de mayor tamaño.

Los valores de número y tamaño de vetas obtenidos se encuentran descritos en el *anexo 3*.

5.4 Distribución del tamaño de los adipocitos

Los parámetros que definen el tipo de distribución (uni o bimodal) del tamaño de los adipocitos de los 4 músculos estudiados y del depósito subcutáneo se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7: Resultados de los test BC y DIP para determinar el tipo de distribución de adipocitos en cada depósito estudiado

TEST	BC test				DIP test	
DEPÓSITO	Valor	Curtosis	Asimetría	Inferencia*	Valor	Inferencia
LONGISSIMUS	0.632	22.897	3.922	Se rechaza la unimodalidad	0.011	Dip <0.022 ($\alpha=0.05$) Dip <0.020 ($\alpha=0.10$) No se rechaza unimodalidad
MASSETER	0.785	-0.696	0.908	Se rechaza la unimodalidad	0.033	Dip >0.024 ($\alpha=0.05$) Se rechaza unimodalidad
SEMITENDINOSUS	0.732	6.462	2.447	Se rechaza la unimodalidad	0.025	Dip <0.050 ($\alpha=0.05$) Dip <0.046 ($\alpha=0.10$) No Se rechaza unimodalidad
STERNOMANDIBULARIS	0.468	-0.862	0.153	No se rechaza la unimodalidad	0.072	Dip >0.036 ($\alpha=0.05$) Se rechaza unimodalidad
SUBCUTÁNEO	0.728	-1.541	0.267	Se rechaza la unimodalidad	0.089	Dip >0.019 ($\alpha=0.05$) Se rechaza unimodalidad

*Valores de BC<0.555 indican unimodalidad

En la Tabla 7 se muestran los valores obtenidos, para cada depósito, con los dos test utilizados para analizar la distribución de los adipocitos. Los resultados individuales para cada animal también fueron obtenidos para los diferentes depósitos, mediante el test Dip y el test BC y se recogen en el *anexo 3*.

Los depósitos en los que la unimodalidad es rechazada por los dos test son el Masetero y Subcutáneo. Cuando los resultados de los test no coinciden, se considera la prueba Dip como la más adecuada, tal como describieron Freeman y Dale (2013) y Alfonso y Mendizabal (2014).

De este modo, la distribución de adipocitos de los músculos Longissimus Dorsi y Semitendinosus son considerados como distribuciones unimodales y la del Sternomandibularis como bimodal.

Los estadísticos descriptivos de las distribuciones se representan en la Tabla 8, en la que se muestran los datos característicos de la unimodalidad o la bimodalidad, según el depósito.

Tabla 8: Descriptivos estadísticos de los depósitos estudiados, según su distribución

ESTADÍSTICOS	LONGISSIMUS	MASSETER	SEMITENDINOSUS	STERNOMANDIBULARIS	SUBCUTÁNEO
Todos los depósitos					
Mínimo (μm)	5.67 \pm 0.36	7.65 \pm 0.87	9.79 \pm 0.88	10.28 \pm 1.01	6.88 \pm 0.53
Máximo (μm)	48.77 \pm 9.68	70.12 \pm 5.08	66.21 \pm 16.84	89.61 \pm 6.44	163.61 \pm 17.63
Mediana (μm)	10.11 \pm 0.48	16.30 \pm 2.77	21.40 \pm 1.99	36.58 \pm 5.74	47.61 \pm 16.86
Depósitos unimodales					
MEDIA (μm)	13.24 \pm 1.80	-	26.79 \pm 3.44	-	-
MODA (μm)	10.34 \pm 1.07	-	17.44 \pm 1.95	-	-
Depósitos bimodales					
MODA 1 (μm)	-	11.09 \pm 1.28	-	18.38 \pm 2.56	12.60 \pm 0.94
MODA 2 (μm)	-	54.48 \pm 4.11	-	53.64 \pm 4.78	113.95 \pm 2.72
NADIR (μm)	-	27.54 \pm 1.82	-	34.96 \pm 1.78	38.90 \pm 5.92
% SOBRE NADIR	-	35.62 \pm 4.87	-	55.86 \pm 9.43	48.54 \pm 4.45
RATIO PEQUEÑOS/GRANDES	-	1.96 \pm 0.39	-	0.93 \pm 0.28	1.11 \pm 0.21

- Los tamaños expresados hacen referencia al diámetro de los adipocitos.

Los depósitos que presentan una distribución unimodal se definen bien con los parámetros de media y moda, ya que nos informan de forma clara sobre el tamaño que presentan los adipocitos. Tanto el músculo Longissimus Dorsi, como el Semitendinosus presentaron valores bajos para el tamaño de sus adipocitos (10.11 y 21.40 μm de mediana, respectivamente).

Para el caso de distribuciones bimodales, como ocurre con los músculos Maseter y Sternomandibularis y con el depósito subcutáneo, la descripción es más compleja, puesto que se requieren más datos para detallarla más precisamente.

La separación de las dos modas nos ayuda a observar que, la primera de ellas, se asemeja bastante a la de las distribuciones unimodales de los músculos Longissimus Dorsi y Semitendinosus (entre 10 y 20 μm). Esto nos lleva a pensar que para los dos tipos de distribuciones existe una hiperplasia semejante. Los músculos Masseter y Sternomandibularis presentan una segunda moda similar, mientras que el depósito Subcutáneo muestra un valor mucho más elevado para la segunda moda, lo que indicaría un nivel alto de hipertrofia de sus adipocitos.

Los datos con los valores estadísticos de cada animal por separado se recogen en el *anexo 3*.

5.4.1 Depósito intramuscular

Distribución unimodal: Longissimus Dorsi y Semitendinosus

Para el músculo de L. Dorsi, la distribución de sus adipocitos según su tamaño, queda de la siguiente manera:

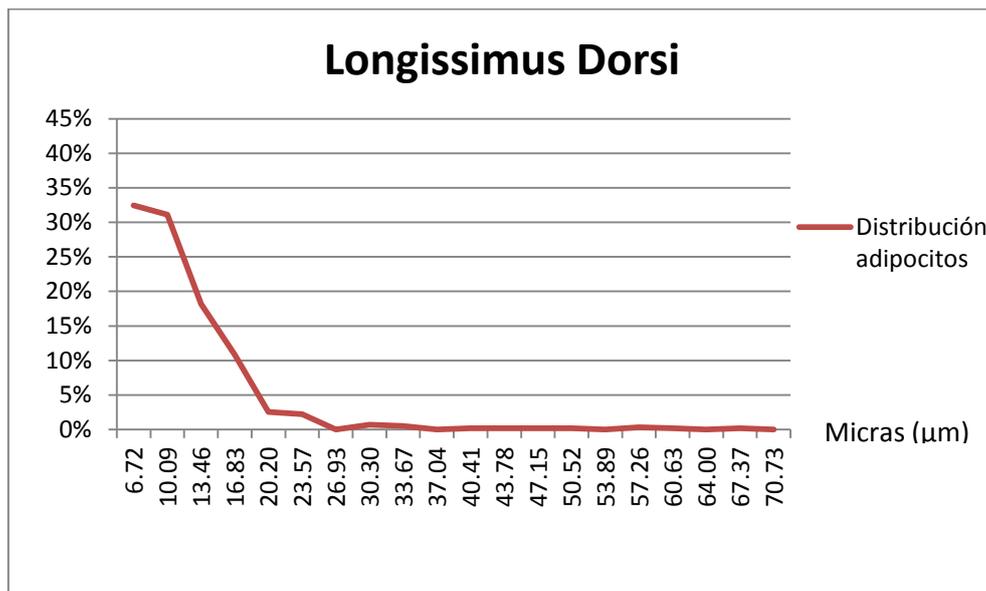


Figura 18: Distribución del tamaño de los adipocitos en el depósito intramuscular Longissimus Dorsi

En la Figura 18 se puede ver la distribución de adipocitos observados. El eje horizontal marca el tamaño del diámetro de éstos, en micras, y el vertical la frecuencia con la que aparecen (en %).

Para este músculo, nos encontramos frente a una distribución unimodal. En ella, el tamaño medio de los adipocitos estudiados es de $26.79 \pm 3.44 \mu\text{m}$, presentando una moda de $10.34 \pm 1.07 \mu\text{m}$.

En el caso del músculo semitendinosus, la gráfica correspondiente a la distribución de los adipocitos según su tamaño, aparece representada en la Figura 19.

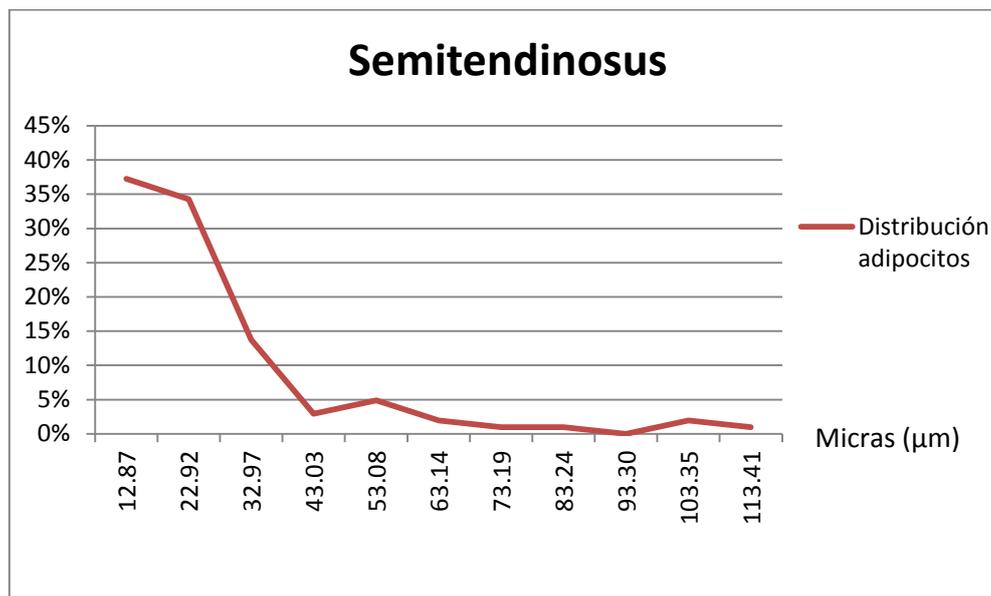


Figura 19: Distribución del tamaño de los adipocitos en el depósito intramuscular Semitendinosus

En este caso volvemos a estar ante una distribución unimodal. Observamos que, el tamaño medio de los adipocitos estudiados es de $13.24 \pm 1.8 \mu\text{m}$, presentando una moda de $17.44 \pm 1.95 \mu\text{m}$.

Se observa que, a pesar de haber sido cebados los terneros durante seis meses, los adipocitos no han manifestado una hipertrofia muy marcada en estos dos músculos. Se puede pensar que el aumento de grasa se ha dado por hiperplasia; es decir, un incremento significativo del número de adipocitos, pero no del tamaño de éstos.

Debido a ello, cabe pensar que para aumentar la grasa intramuscular y mejorar así las cualidades organolépticas de la carne, convendría estudiar mecanismos biológicos inductores de la hipertrofia.

Para el músculo Longissimus Dorsi, la distribución que se ha obtenido concuerda con la del estudio de Sayed et al. (2007), en el que se estudió el tamaño de los adipocitos para el depósito Longissimus Dorsi. Los datos reflejaban un pico muy importante de adipocitos de pequeño tamaño (por debajo de $20 \mu\text{m}$).

Por otra parte, el hecho de que ambos músculos (Longissimus Dorsi y Semitendinosus) tengan un carácter glicolítico predominante, en el que predominan las fibras de tipo II, puede favorecer que los adipocitos tengan un tamaño más reducido para poder liberar triglicéridos de forma más rápida, al tener mejor relación superficie/volumen, tal y como indican Soula et al. (2013).

Distribución bimodal: Maseter y Esternomandibularis

En la Figura 20 se muestra la gráfica de distribución de los adipocitos según su tamaño, en el músculo Maseter.

En este caso, nos encontramos frente a la siguiente distribución:

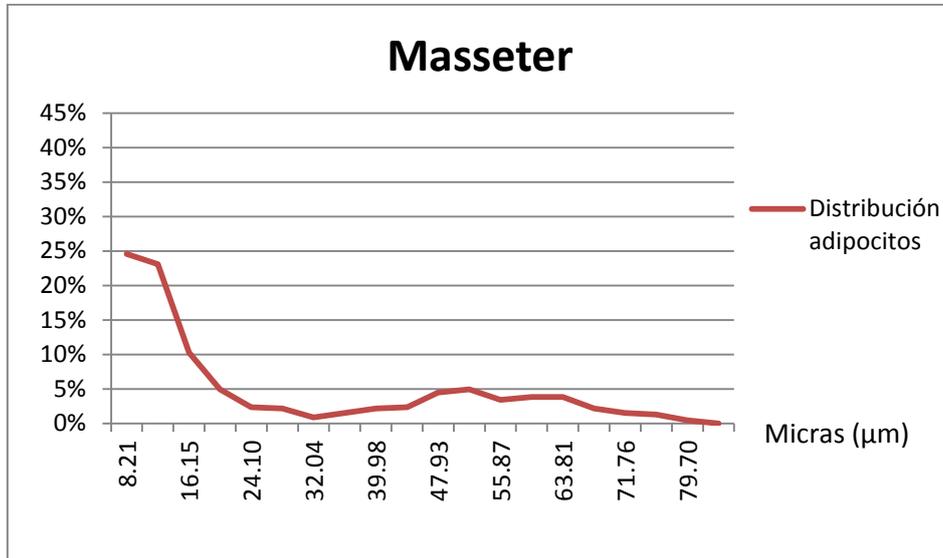


Figura 20: Distribución del tamaño de los adipocitos en el depósito intramuscular Maseter

Tanto el test BC, como el Dip, han rechazado la unimodalidad de la distribución (Tabla 7), por lo que nos encontramos ante una distribución bimodal. La gráfica también lo muestra visualmente. Para esta distribución el punto de inflexión, o nadir, se sitúa en $27.54 \pm 1.82 \mu\text{m}$. El 35% de los adipocitos son mayores a ese valor.

La distribución que siguen los adipocitos en el Sternomandibularis se muestra en la Figura 21.

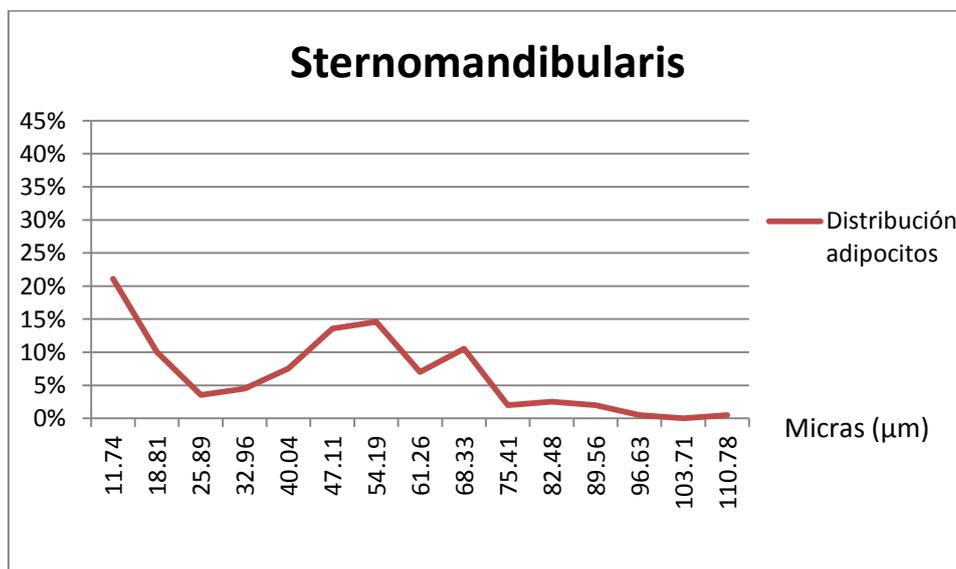


Figura 21: Distribución del tamaño de los adipocitos en el depósito intramuscular Sternomandibularis

Para el músculo Sternomandibularis, observamos que el test BC no rechaza la unimodalidad, aunque se queda cerca del valor mínimo (0.555). El test Dip sí que rechaza la unimodalidad, por lo que se asume una distribución bimodal para este músculo (Tabla 7).

Se observa que la distribución presenta dos poblaciones de adipocitos (pequeños y grandes) interactuando de forma simultánea. Se puede pensar que los adipocitos grandes poseen una función de almacenamiento de triglicéridos, tal como afirmaron Jacobi et al. (2006). Este hecho tendría relación con el tipo de metabolismo de estos tejidos (oxidativo)

Los tejidos con fibras de metabolismo oxidativo (fibras rojas), como es el caso del Sternomandibularis, están dotados de mayor riego sanguíneo, por lo que pueden tener facilidad para la adquisición de oxígeno y ácidos grasos (que se transportan por la sangre), de acuerdo con Azain (2004).

La existencia de adipocitos pequeños puede explicarse por darse una inducción a la hiperplasia en momentos en los que la hipertrofia es muy intensa. Este hecho lo explicaron Bonnet et al. (2010), quienes concluyeron que cuando los adipocitos alcanzan tamaños superiores a 90 μm se pueden dar procesos de hiperplasia en animales en crecimiento.

Otros autores opinan que la hiperplasia solo ocurre en estados tempranos de desarrollo (Jo et al., 2009) y explican la existencia de adipocitos de menor tamaño por diferencias entre el flujo lipolítico y lipogénico (Soula et al., 2013).

En el caso del Masseter, posee fibras con un desarrollo más tardío que el resto de músculos y, además, es el que menos actividad glicolítica tiene (Picard, 1996). Todo ello nos lleva a pensar que manifieste, de forma temprana, hipertrofia en sus adipocitos: Bien sea por necesidades energéticas adicionales a otros músculos o por tener menor presión mecánica de las fibras (aún sin desarrollar), lo que facilitaría el aumento del tamaño de los adipocitos.

En cuanto a la relación entre el tamaño de los adipocitos y el engrasamiento de los músculos, vemos que los tejidos con adipocitos predominantemente pequeños, como el Longissimus y el Semitendinosus, son los que menor contenido lipídico presentan. Y, análogamente, los depósitos Masseter y Sternomandibularis, con mayores diámetros de adipocitos, contienen un porcentaje mayor de grasa.

Esto último, fue también demostrado por Soula et al. (2013). Estos autores, en un estudio, concluyeron que cabe pensar que exista relación entre la cantidad de tejido adiposo y el tamaño de los adipocitos del mismo.

5.4.2 Depósito subcutáneo

La distribución de los adipocitos, en el tejido subcutáneo, se muestra en la Figura 22.

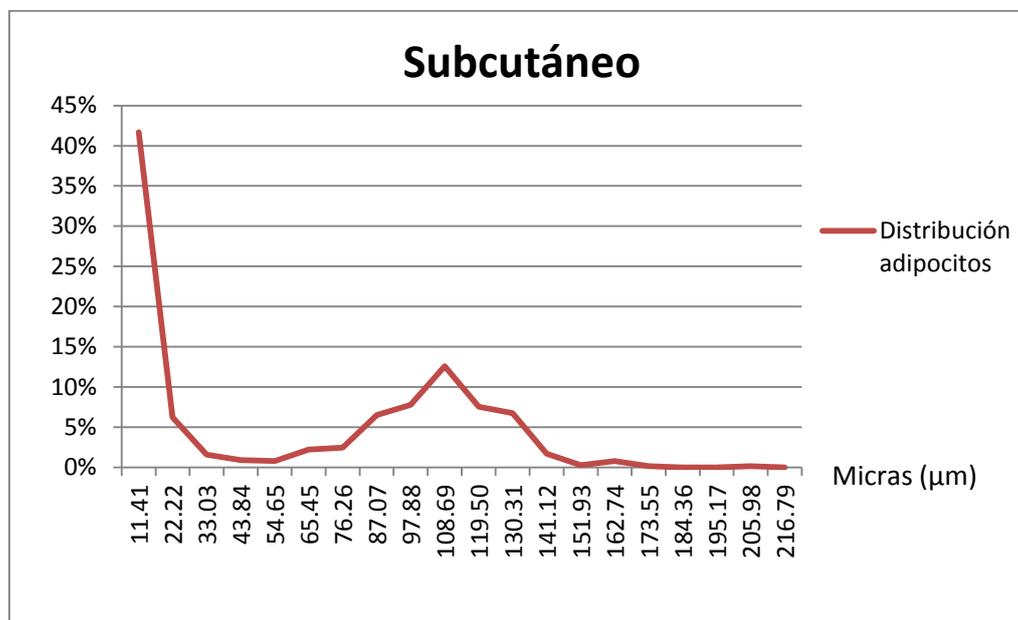


Figura 22: Distribución del tamaño de los adipocitos en el tejido Subcutáneo

Existen dos poblaciones de adipocitos, comprendidas entre dos modas muy alejadas una de otra. La primera de ellas se encuentra sobre las 12 μm y la segunda está en 112 μm .

Con esta segunda población con un valor elevado de moda, se evidencia una hipertrofia de los adipocitos, lo que podría explicarse por un desarrollo más avanzado del depósito, el cual llevaría más tiempo almacenando grasas. Esta hipótesis coincide con el hecho de que el depósito Subcutáneo se desarrolle antes que el intramuscular (Acero, 1994). Se estima que este depósito comienza a desarrollarse sobre los 180 días, durante el periodo fetal, mientras que el intramuscular no lo hace hasta los 250 días aprox. (Du et al., 2013).

Pero no solo la hipertrofia, sino que también la hiperplasia de adipocitos (representada en la primera población de adipocitos de pequeño tamaño), forma parte del desarrollo del depósito Subcutáneo, como se ha descrito anteriormente en otros trabajos (Robelin, 1981; Hood y Allen, 1983).

Por tanto, podemos pensar que se está produciendo un desarrollo del tejido Subcutáneo por proceso de hiperplasia y, eventualmente, de hipertrofia de forma simultánea. Esto mismo observó Sayed et al. (2007) en un estudio con terneros de la misma raza que la utilizada por nosotros (Pirenaica).

6. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en este Trabajo Fin de Grado se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1.- El tipo de metabolismo de los músculos estudiados influye en la distribución del tamaño de sus adipocitos; siendo bimodal la distribución de adipocitos que mostraron los músculos de metabolismo oxidativo (Masseter y Sternomandibularis) y unimodal en los músculos cuyo metabolismo es glicolítico (Longissimus Dorsi y Semitendinosus). Esto indicaría que en los músculos glicolíticos está teniendo lugar una hiperplasia adipocitaria, mientras que en los oxidativos se darían tanto la hiperplasia como la hipertrofia (población de adipocitos pequeños y población de adipocitos grandes).

2.- El depósito subcutáneo ha presentado una distribución bimodal de sus adipocitos, la cual se asemeja a las distribuciones de los músculos oxidativos (Masseter y Sternomandibularis). Si bien, los valores de la segunda moda son muy superiores para el depósito subcutáneo (113 μ m frente a 54 μ m), lo cual evidencia un proceso de hipertrofia intenso. Dado que en los depósitos grasos al inicio de su desarrollo predomina la hiperplasia de los adipocitos y, posteriormente, la hipertrofia, estos datos obtenidos podrían indicar un desarrollo más precoz del depósito subcutáneo frente al intramuscular. Dentro del depósito intramuscular, la grasa de los músculos Masseter y Sternomandibularis parece tener un desarrollo más temprano que la grasa de Longissimus Dorsi y Semitendinosus, donde todavía no ha comenzado la hipertrofia adipocitaria.

3.- Existe una relación directa entre el contenido lipídico de los músculos estudiados y el tamaño de sus adipocitos, de tal manera que a mayor contenido graso, mayor es la proporción de adipocitos de tamaño grande, resultados de la hipertrofia.

4.- La Pirenaica es una raza cuya carne está poco engrasada (al menos a los 12 meses de edad), en comparación con otras razas cárnicas, lo cual podría favorecer la comercialización de estas carnes como poco grasas, de acuerdo con las tendencias de consumo actuales.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acero, P. (1994). Fisiología del crecimiento. In C. BUXADÉ (Ed.), *Estructura, etnología, anatomía y fisiología. Zootecnia-Bases de producción animal, tomo I*. Madrid: Mundi-Prensa.
- Albertí Lasalle, P., Lahoz Castelló, F., Tena Gómez, R., Jaime Cuello, S., Sañudo Astiz, C., Olleta Castañer, J. L., et al. (2001). Producción y rendimiento carnicero de siete razas bovinas españolas faenadas a distintos pesos.
- Albrecht, E., Teuscher, F., Ender, K., & Wegner, J. (2006). Growth-and breed-related changes of marbling characteristics in cattle. *Journal of Animal Science*, 84(5), 1067-1075.
- Alfonso, L. y Mendizabal, J.A. (2014). Caracterización de la distribución del tamaño de los adipocitos para el estudio del tejido adiposo en producción animal. Escuela Técnica Superior De Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública De Navarra, Campus Arrosadia, Pamplona, España,
- Allen, C. E. (1976). Cellularity of adipose tissue in meat animals. *Federation Proceedings*, 35(11), 2302-2307.
- Alzón, M., Mendizabal, J., Arana, A., Albertí, P., & Purroy, A. (2007). Adipocyte cellularity in different adipose depots in bulls of seven spanish breeds slaughtered at two body weights. *Animal*, 1, 261-267.
- Arana A., Soret B., Mendizabal J.A., Purroy A. (2005). Medida del tamaño y número deadipocitos y de la actividad enzimática lipogénica. *Monografías INIA: Serie Ganadera*, 3, 381-393.
- Aranguren, F. J. (2002). In Asociación de Criadores de Vacuno Pirenaico de Navarra (ASPINA) e Instituto Técnico y de Gestión Ganadero (ITG Ganadero) (Ed.), *La raza pirenaica*. España.
- Azain, M. (2004). Role of fatty acids in adipocyte growth and development. *Journal of Animal Science*, 82(3), 916-924.
- Blasco, I., Olleta, J. L., San Juan L., & and Revilla. R. (1992). The pyreneam breed: Some productive trials and the interest on its conservation in mountain areas. *Archivos De Zootecnia*, 41, 549-553.

- Bong, J. J., Jeong, J. Y., Rajasekar, P., Cho, Y. M., Kwon, E. G., Kim, H. C., et al. (2012). Differential expression of genes associated with lipid metabolism in longissimus dorsi of korean bulls and steers. *Meat Science*, 91(3), 284-293.
- Bonnet, M., Cassar-Malek, I., Chilliard, Y., & Picard, B. (2010). Ontogenesis of muscle and adipose tissues and their interactions in ruminants and other species. *Animal*, 4(07), 1093-1109.
- Briskey, E.J., Bray, R.W. (1964). A special study of the beef grade standards for american national cattlemen's association. A.n.c.a.,
- Buxadé Carbó, C. (1998). Zootecnia: Bases de producción animal. monografía II: Alojamientos e instalaciones. Madrid: Mundi-Prensa.
- Buxadé, C. (1996). Producción vacuna de leche y carne colección "Zootecnia, bases de producción animal". Tomo VII. Madrid: Mundi Prensa.
- CONASPI. CONFEDERACIÓN DE ASOCIACIONES DE GANADO VACUNO PIRENAICO. Informe y memoria de CONASPI - año 2014. Retrieved Junio/3, 2015, from <http://www.conaspi.es/vercontenido.asp?conid=13498&menid=1540&web=22>
- Cruz, G., Strathe, A. B., Rossow, H., & Fadel, J. (2012). Characterizing bovine adipocyte distribution and its relationship with carcass and meat characteristics using a finite mixture model. *Journal of Animal Science*, 90(9), 2995-3002.
- Diario Oficial de la Unión Europea. (2006). REGLAMENTO (CE) Nº 103/2006 DE LA COMISIÓN de 20 de enero de 2006 por el que se establecen disposiciones complementarias para la aplicación del modelo comunitario de clasificación de las canales de bovinos pesados. Retrieved Mayo/5, 2015, from [http://www.agrodigital.com/upload/l_01720060121es00060008\[1\].pdf](http://www.agrodigital.com/upload/l_01720060121es00060008[1].pdf)
- Díaz Crespo, J. (2010). Efecto de la utilización de lino en la alimentación de corderos de cebo sobre el desarrollo y metabolismo del tejido graso. Universidad Pública De Navarra,
- Díaz, I. (2011, Marzo-Abril). Historia y presente de la carne de vacuno. importancia alimentaria y cualidades nutricionales. *Distribución y Consumo*, 78-83.

- Djian, P., Roncari, A. K., & Hollenberg, C. H. (1983). Influence of anatomic site and age on the replication and differentiation of rat adipocyte precursors in culture. *The Journal of Clinical Investigation*, 72(4), 1200-1208.
- Dodson, M. v., R. e. Allen, M. Du, w. G. Bergen, S. G. velleman, S. P. Poulos, M. Fernyhough- Culver, M. B. wheeler, S. K. Duckett, M. R. I. Young, B. H. voy, Z. Jiang, and G. J. Hausman. (2015). Invited review: Evolution of meat animal growth research during the past 50 years: Adipose and muscle stem cells. *Journal of Animal Science*, 93, 457-481.
- Du, M., Huang, Y., Das, A., Yang, Q., Duarte, M., Dodson, M., et al. (2013). Meat science and muscle biology symposium: Manipulating mesenchymal progenitor cell differentiation to optimize performance and carcass value of beef cattle. *Journal of Animal Science*, 91(3), 1419-1427.
- Du, M., Zhao, J. X., Yan, X., Huang, Y., Nicodemus, L. V., Yue, W., et al. (2011). Fetal muscle development, mesenchymal multipotent cell differentiation, and associated signaling pathways. *Journal of Animal Science*, 89(2), 583-590.
- Duarte, M., Paulino, P., Das, A., Wei, S., Serão, N., Fu, X., et al. (2013). Enhancement of adipogenesis and fibrogenesis in skeletal muscle of wagyu compared with angus cattle. *Journal of Animal Science*, 91(6), 2938-2946.
- Echevarría, T. (1975). Raza vacuna pirenaica: Evolución, situación actual y perspectivas. Diputación Foral De Navarra.Pamplona,
- Eguinoa, P., Brocklehurst, S., Arana, A., Mendizabal, J., Vernon, R., & Purroy, A. (2003). Lipogenic enzyme activities in different adipose depots of pirenaican and holstein bulls and heifers taking into account adipocyte size. *Journal of Animal Science*, 81(2), 432-440.
- Freeman, J. B., & Dale, R. (2013). Assessing bimodality to detect the presence of a dual cognitive process. *Behavior Research Methods*, 45(1), 83-97.
- García-Torres, S., Espejo, M., López, M., Izquierdo, M., Mendizábal, J., & Purroy, A. (2005). Conformación, engrasamiento y sistemas de clasificación de la canal bovina. Estandarización De Las Metodologías Para Evaluar La Calidad Del Producto (Animal Vivo, Canal, Carne y Grasa) En Los Rumiantes.Ed: INIA, 105-119.

- GOBIERNO DE NAVARRA. Reglamento De La Indicación Geográfica Protegida "Ternera De Navarra o Nafarroako Aratxea" y Su Consejo Regulador. BON: nº 108 (2000).
- Goñi V., Mendizabal J.A., Beriain M.J., Albertí P., Arana A., Eguinoa, P. Purroy A. (1999). Marbrure de la viande des veaux de sept races à viande espagnoles déterminée par analyse d'Image. Renc. Rech. Ruminants, 6, 278.
- González Gallardo, A., Varela Echavarría, A., Shimada Miyasaka, A., & Mora Izaguirre, O. (2008). Diferenciación in vitro de preadipocitos de tejido adiposo bovino. Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias, 46(2), 195 a 204.
- Gotoh, T., Albrecht, E., Teuscher, F., Kawabata, K., Sakashita, K., Iwamoto, H., et al. (2009). Differences in muscle and fat accretion in japanese black and european cattle. Meat Science, 82(3), 300-308.
- Hall, J. E. (2011). Guyton y hall. tratado de fisiología médica Elsevier Health Sciences.
- Hausman, D., DiGirolamo, M., Bartness, T., Hausman, G., & Martin, R. (2001). The biology of white adipocyte proliferation. Obesity Reviews, 2(4), 239-254.
- Hausman, G. (2012). Meat science and muscle biology symposium: The influence of extracellular matrix on intramuscular and extramuscular adipogenesis. Journal of Animal Science, 90(3), 942-949.
- Hausman, G., Basu, U., Wei, S., Hausman, D., & Dodson, M. (2014). Preadipocyte and adipose tissue differentiation in meat animals: Influence of species and anatomical location. Annu.Rev.Anim.Biosci., 2(1), 323-351.
- Hausman, G., Dodson, M., Ajuwon, K., Azain, M., Barnes, K., Guan, L., et al. (2009). Board-invited review: The biology and regulation of preadipocytes and adipocytes in meat animals. Journal of Animal Science, 87(4), 1218-1246.
- Hilda Ramirez-Pérez A., Buntinx Dios S.E. (2010). Metabolismo decarbohidrados, lípidos y proteínas. . Departamento De Nutrición Animal y Bioquímica. Universidad Nacional Autónoma De México.,

- Hocquette, J., Cassar-Malek, I., Jurie, C., Bauchart, D., Picard, B., & Renand, G. (2012). Relationships between muscle growth potential, intramuscular fat content and different indicators of muscle fibre types in young charolais bulls. *Animal Science Journal*, 83(11), 750-758.
- Hocquette, J., Gondret, F., Baéza, E., Médale, F., Jurie, C., & Pethick, D. (2010). Intramuscular fat content in meat-producing animals: Development, genetic and nutritional control, and identification of putative markers. *Animal*, 4(2), 303-319.
- Hood, R. L. (1982). Relationships among growth, adipose cell size, and lipid metabolism in ruminant adipose tissue. *Federation Proceedings*, 41(9), 2555-2561.
- Hood, R. L., & Allen, C. E. (1973). Cellularity of bovine adipose tissue. *Journal of Lipid Research*, 14(6), 605-610.
- ISO 1443:1973. (1973). Meat and meat products: Determination of total fat content
- Jacobi, S., Gabler, N., Ajuwon, K., Davis, J., & Spurlock, M. (2006). Adipocytes, myofibers, and cytokine biology: New horizons in the regulation of growth and body composition. *Journal of Animal Science*, 84(13_suppl), E140-E149.
- Jo, J., Gavrilova, O., Pack, S., Jou, W., Mullen, S., Sumner, A. E., et al. (2009). Hypertrophy and/or hyperplasia: Dynamics of adipose tissue growth. *PLoS Computational Biology*, 5(3), e1000324.
- Kempster, A. (1981). Fat partition and distribution in the carcasses of cattle, sheep and pigs: A review. *Meat Science*, 5(2), 83-98.
- Kern, S., Pritchard, R., Blair, A., Scramlin, S., & Underwood, K. (2014). The influence of growth stage on carcass composition and factors associated with marbling development in beef cattle. *Journal of Animal Science*, 92(11), 5275-5284.
- MAGRAMA. MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE. DIRECCIÓN GENERAL DE PRODUCCIONES Y MERCADOS AGRARIOS. SUBDIRECCIÓN GENERAL DE PRODUCTOS GANADEROS. Indicadores económicos del sector vacuno de carne. año 2013. Retrieved Junio/6, 2015, from: <http://www.magrama.gob.es>

- MAGRAMA. MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE. DIRECCIÓN GENERAL DE PRODUCCIONES Y MERCADOS AGRARIOS. SUBDIRECCIÓN GENERAL DE PRODUCTOS GANADEROS. (2013). Caracterización del sector vacuno de carne en España. Retrieved Junio/3, 2015., from http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/CARACTERIZACION_DEL_SECTOR_VACUNO_DE_CARNE_EN_ESPAÑA_2013_tcm7-267233.pdf
- Martín Cerdreño, V. J. (2011, Marzo-Abril). Consumo de carne de vacuno en España. *Distribución y Consumo*, 95-98.
- Martín, T., Alenda, R., & Cabrero, M. (1993). Predicción de la composición de la canal en las razas de ganado vacuno rubia gallega i asturiana. I. por la calificación de la canal. *Invest.Agr.: Prod.Sanid.Anim*, 8, 55-63.
- Mendizabal, J., Alberti, P., Eguinoa, P., Arana, A., Soret, B., & Purroy, A. (1999). Adipocyte size and lipogenic enzyme activities in different adipose tissue depots in steers of local Spanish breeds. *Animal Science: An International Journal of Fundamental and Applied Research*,
- Mendizabal, J., Delfa, R., Eguinoa, P., Arana, A., González, C., Alzón, M., et al. (2002). Acumulación/movilización de reservas grasas: Especie caprina versus especie ovina (fat tissue deposition and mobilization: Goats vs ewes). pp. 180-185.
- Mendizabal, J., Purroy, A., Beriain, M., Lizaso, G., & Insausti, K. (1998). Medida del grado de veteado de la carne mediante análisis de imagen. *Caso De La Carne De Toro De Lidia. Información Técnica Económica Agraria A*, 94, 43-48.
- Mendizabal, J., & Soret, B. (1997). Desarrollo del tejido graso en corderos en crecimiento. *Ovis*, 50, 59-74.
- MERCASA. (2014). Alimentación en España. Retrieved Junio/6, 2015, from http://www.mercasa-ediciones.es/alimentacion_2014/pdfs/pag_194-225_carnes_y_productos_carnicos.pdf

- MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE. Indicación geográfica protegida "ternera de navarra; nafarroako aratxea". Retrieved Junio/3, 2015, from http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/calidadagroalimentaria/calidad-diferenciada/dop/carnes/DOP_Tenera_Navarra.aspx
- Montes Segura, J. (2012). Metabolismo del tejido graso de terneros alimentados con fuentes ricas en ácidos grasos polinsaturados. Universidad Pública De Navarra,
- Muriel, E., Antequera, T., & Ruiz, J. (2002). Efecto del tipo de músculo sobre parámetros de calidad en carne fresca de cerdo ibérico. *CYTA-Journal of Food*, 3(4), 241-247.
- Muriel, E., Ruiz, J., Ventanas, J., & Antequera, T. (2002). Free-range rearing increases (n-3) polyunsaturated fatty acids of neutral and polar lipids in swine muscles. *Food Chemistry*, 78(2), 219-225.
- Narváez Rivas, M., León Camacho, M., & Vicario, I. M. (2009). Fatty acid and triacylglycerol composition of the subcutaneous fat from iberian pigs fattened on the traditional feed: "Montanera". effect of anatomical location and length of feeding. *Grasas y Aceites*, 60(3), 248-254.
- Paniagua R., Nistal M., Sesma P., AlvarezCURia M., Fraile B. (1993). Tejido conjuntivo y adiposo. *Citología e histología vegetal y animal. biología de las células y tejidos animales y vegetales* (pp. 400-428) Interamericana McGrawCHill.
- Pascual A. (2011). Desarrollo del tejido graso subcutáneo e intramuscular durante el crecimiento y cebo de terneros de raza pirenaica. Departamento de Producción Animal. ETSIA. Universidad pública de Navarra).
- Picard, B., Gagnière, H., & Geay, Y. (1996). Contractile differentiation of bovine masefer muscle. *Bam-Padova-*, 6, 361-372.
- Pickworth, C., Loerch, S., Velleman, S., Pate, J., Poole, D., & Fluharty, F. (2011). Adipogenic differentiation state-specific gene expression as related to bovine carcass adiposity. *Journal of Animal Science*, 89(2), 355-366.
- Póveda, M. C. (1991). La estructura y la composición de la canal como de terminantes de su calidad. *Bovis*, (38), 9-37.

- Robelin, J. (1986). Growth of adipose tissues in cattle; partitioning between depots, chemical composition and cellularity. A review. *Livestock Production Science*, 14(4), 349-364.
- Robelin, J., & Casteilla, L. (1990). Différenciation, croissance et développement du tissu adipeux. *INRA Productions Animales*, 3(4), 243-252.
- Robelin, J. (1981). Cellularity of bovine adipose tissues: Developmental changes from 15 to 65 percent mature weight. *Journal of Lipid Research*, 22(3), 452-457.
- Rodbell, M. (1964). The metabolism of isolated fat cells. *Comprehensive Physiology*,
- Ruiz de Huidobro, F., Sancha, J., & Cantero, M. A. (1996). La clasificación de las canales de vacuno y ovino: Ventajas del método. *Eurocarne*, 48, 17-26.
- Sadkowski, T., Ciecierska, A., Majewska, A., Oprządek, J., Dasiewicz, K., Ollik, M., et al. (2014). Transcriptional background of beef marbling: Novel genes implicated in intramuscular fat deposition. *Meat Science*, 97(1), 32-41.
- Sainz, R. D., Hasting, E. (2000). Simulation of the development of adipose tissue in Beef cattle. In McNAMARA, J. P., FRANCE, J. y BEEVER, D. (Ed.), *Modelling Nutrient Utilization in farm animals* (). Reino Unido: CABI Publishing.
- Sayed, S., Abadía, S., Mendizabal, J., Arana, A., Soret, B., Albertí, P., et al. (2007). Efecto de la alimentación con dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados sobre el desarrollo del tejido graso de terneros. *ITEA. Producción Animal*, 28, 768-770.
- Smith, S., Chapman, A., Lunt, D., Harris, J., & Savell, J. (2007). Adiposity of calf- and yearling-fed brangus steers raised to constant-age and constant-body weight endpoints. *Journal of Animal Science*, 85(5), 1136-1143.
- Smith, S., Jenkins, T., & Prior, R. (1987). Carcass composition and adipose tissue metabolism in growing sheep. *Journal of Animal Science*, 65(6), 1525-1530.
- Smith, S. B., Kawachi, H., Choi, C. B., Choi, C. W., Wu, G., & Sawyer, J. E. (2009). Cellular regulation of bovine intramuscular adipose tissue development and composition. *Journal of Animal Science*, 87(14 Suppl), E72-82.

- Soret B., Mendizabal J.A., Arana A., Purroy A., Eguinoa P. (1998). Breed effects on cellularity and lipogenic enzyme activity in latxa and rasa aragonesa lambs during growth. *Small Ruminant Research*, 29, 103-112.
- Soula, H., Julienne, H., Soulage, C., & Gélouën, A. (2013). Modelling adipocytes size distribution. *Journal of Theoretical Biology*, 332, 89-95.
- Soxhlet, F. v. (1879). Die gewichtsanalytische bestimmung des milchfettes. *Polytechnisches Journal*, 232(5), 461-465.
- Sun, K., Kusminski, C. M., & Scherer, P. E. (2011). Adipose tissue remodeling and obesity. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(6), 2094-2101.
- Vernon R.G. (1980). Lipid metabolism in the adipose tissue of ruminant animals. In Holman R. T. (Ed.), *Progress in lipid research* (pp. 23-106) Advisory Board.
- Vernon R.G. (1981). Lipid metabolism in adipose tissue of ruminants. In Christie W.W. (Ed.), *Lipid Metabolism in ruminant animals* (pp. 279-362). Oxford: Pergamon Press.
- Vernon R.G. (1986). The growth and metabolism of adipocytes. In Buttery P.J., Haynes N.B., Lindsay D.B. (Ed.), *Control and Manipulation of animal growth* (pp. 67-83). Londres: Butterworths.
- Yang, X., Albrecht, E., Ender, K., Zhao, R., & Wegner, J. (2006). Computer image analysis of intramuscular adipocytes and marbling in the longissimus muscle of cattle. *Journal of Animal Science*, 84(12), 3251-3258.
- Zea, J., Díaz, M., & Carballo, J. (2007). Efecto de la raza, sexo y alimentación en la calidad de la carne de vacuno. *Archivos De Zootecnia*, 56(1), 737-743.

8. ANEXOS

ANEXO I: Manual de uso de “Image J” en la determinación del grado de vetado de la carne

Requerimientos:

Para captar la imagen se ha empleado un ordenador provisto de un programa cualquiera de análisis de imagen (en nuestro caso **Image Pro Plus**) asociado a una toma de video CCD (con objetivo fotográfico C tipo gran angular). Se cuenta con un sistema de focos de luz que alumbren de forma homogénea la muestra, para un mejor procesamiento de la misma.

Se puede emplear cualquier programa de análisis de imagen (o una cámara normal) para obtener la imagen, pero se comete mayor error.

El software empleado para llevar a cabo el vetado de las imágenes captadas es el programa de análisis de imagen “ImageJ”, el cuál es de libre acceso.



Equipo de adquisición de imágenes

La medida realizada se da sobre una fracción del músculo *Longissimus dorsi* a la altura de la 10ª costilla. Cuanto más plano y liso sea el corte menos problemas tendremos a la hora de medir las vetas de grasa.

Los contornos y bordes de otros músculos, grasa intermuscular, etc. deberemos retirarlos antes de proceder a tomar la imagen.

Procedimiento:

Toma de imágenes:

Encendemos el ordenador y la cámara. Accedemos al programa **Image Pro Plus**. Seleccionamos modo “Complete” y cerramos la pantalla “Macro Player” que aparece.

Pinchamos en el icono  y presionamos OK en la ventana que aparece. Entonces sale un cuadro llamado “QImaging Digital Camera”. Pulsamos en “start preview” y nos aparecerá la imagen en directo de la cámara.

A partir de entonces tendremos que ajustar la imagen mediante la calibración del diafragma, zoom y luces de la mesa. Cuando tengamos una buena definición pinchamos en “Snap” y se capturará la imagen.

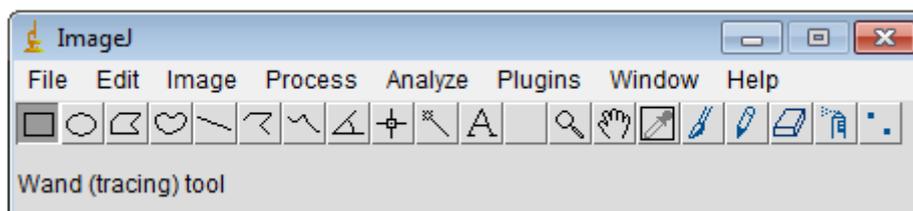
Realizamos las fotos necesarias (calibración, cara superior cara inferior) y las guardamos en el ordenador conforme las vamos capturando (File, Save As...). Se guardan de forma predeterminada en formato JPEG.

Procesado de imágenes:

Una vez que tenemos las imágenes, procedemos a analizar el grado de veteado.

Los pasos que se indican a continuación son efectivos para la versión 1.33 del programa ImageJ. Si se emplea otra versión de este mismo programa, las herramientas pueden variar en el menú del programa.

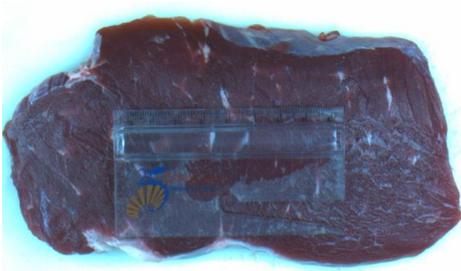
El programa es de dominio público y se puede descargar rápido desde internet. Al ejecutarlo nos aparece la barra de menús.



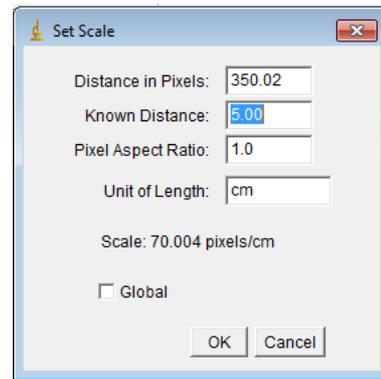
Menú principal del programa ImageJ

Para abrir una imagen hay que arrastrarla hasta la barra de menús y entonces “soltarla”. De esa forma quedará abierta con el programa. La imagen debe estar en formato jpg, bmp...

La primera imagen que debemos abrir es la de calibración (foto de L.D. con una regla graduada encima).



Muestra de imagen de calibración

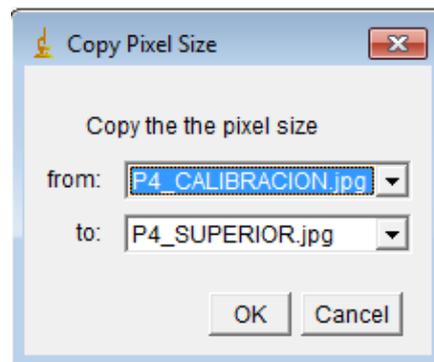


Cuadro de diálogo para calibrar

Calibración:

Hacemos “click” sobre el icono  y trazamos una línea sobre la regla en la imagen, de tal manera que concretemos una distancia conocida (ej: 5cm). Seguidamente vamos a Plugins/ Spatial calibration/Set scale y en el cuadro de diálogo que aparece ponemos 5.00 (en nuestro caso) en “known distance” y cm en “Unit of Lenght”, ya que nosotros habíamos marcado 5cm de la regla con la línea.

Abrimos otra imagen, y procedemos a aplicarle la calibración de la imagen de dimensiones conocidas. Para ello seguimos la ruta: Plugins/Spatial calibration/Copy Pixel Size. Nos aparece otro cuadro en el que pide el nombre de la imagen calibrada y el de la imagen a la que queremos aplicar esa calibración. Por lo que en “From” colocamos el nombre que le hayamos dado a nuestra imagen de calibración y en “To” el de la imagen que queremos calibrar para después medir.



Calibración de una imágenes a otras

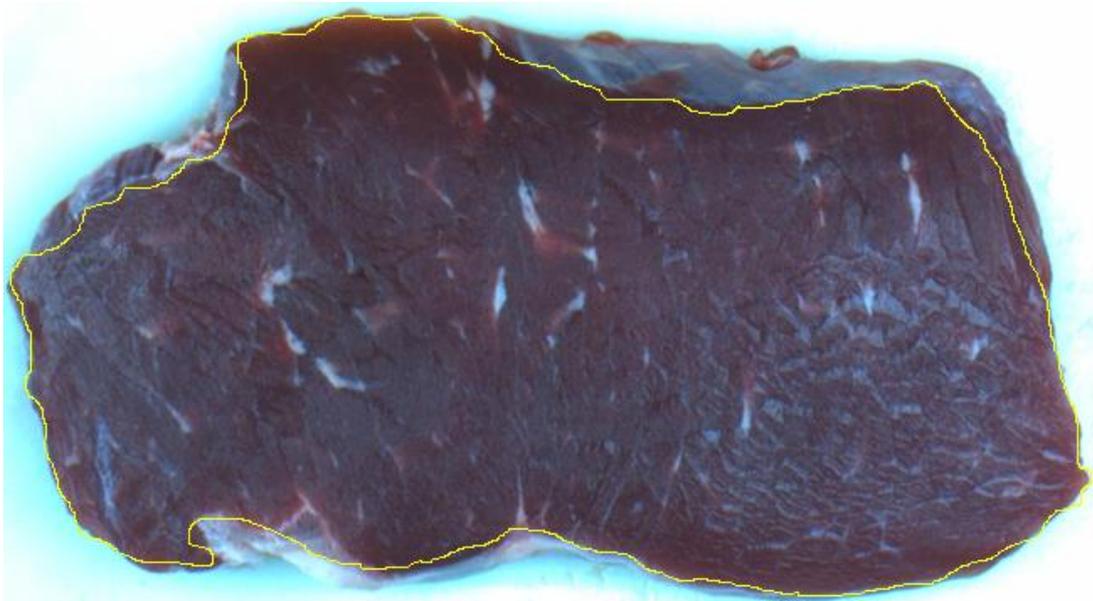
En el siguiente cuadro pulsamos Ok. De esta manera ya tenemos calibrada la imagen que queremos analizar.

Medida del área y rgb:

Los pasos que daremos a continuación son los necesarios para obtener los siguientes parámetros: **Área de L.D., medida de gris y medidas RGB, número de vetas, tamaño de vetas, área total de vetas y porcentaje de veteado.**

Debemos decir que el programa ofrece la posibilidad de realizar estos procesos de forma manual o automática. Para este tipo de análisis conviene hacerlo de forma manual, ya que vamos a ser más precisos a la hora de obtener los resultados. Aunque el proceso es más lento.

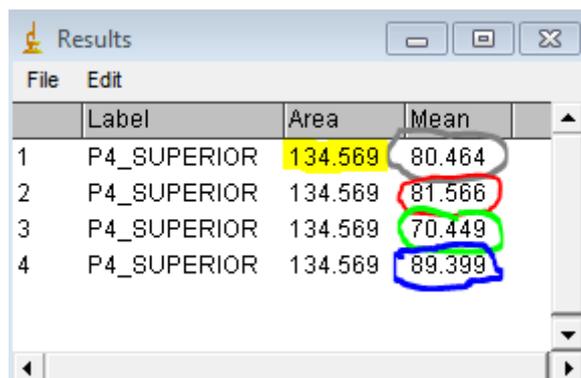
Para conocer el área de L.D. pulsamos el icono  que nos permite trazar líneas poligonales y vamos marcando el contorno del músculo de la manera más precisa posible.



Contorneado del área de Longissimus Dorsi.

Tanto para esta medición como para el veteado es necesario tener presente la muestra real, así podemos ver exactamente por donde va el contorno del músculo o distinguir vetas de grasa de brillos, etc.

Después de realizar el contorno tenemos que ver los resultados que nos ha dado. En primer lugar, en Analyze/Set Measurement elegimos las medidas que queremos analizar. Por defecto están el área y la coloración de grises, por lo que lo dejamos así. Vamos a Analyze/Measure y nos devuelve una tabla en la que nos indica el tamaño del área y la media de grises. Sin hacer nada más vamos a Plugins/Colour functions/RGB Measure y nos añade a la tabla anterior los valores de Red, Green y Blue. Exportamos los datos a Excel para guardarlos.

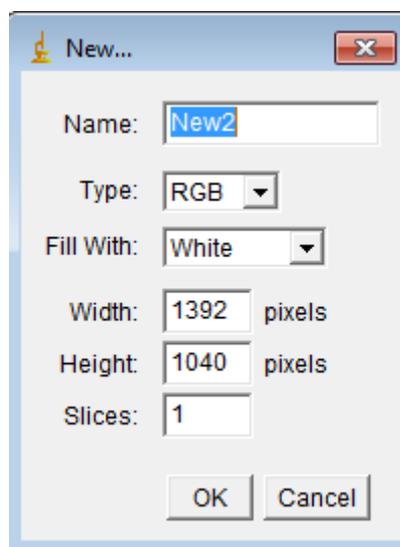


	Label	Area	Mean
1	P4_SUPERIOR	134.569	80.464
2	P4_SUPERIOR	134.569	81.566
3	P4_SUPERIOR	134.569	70.449
4	P4_SUPERIOR	134.569	89.399

Medidas de área, gris y RGB

Medida del veteado:

El paso anterior nos sirve para llevar a cabo el veteado, ya que debemos copiar el contorno que tenemos marcado (Ctrl + C) y pegarlo (Ctrl + V) en una ventana nueva. Esto lo realizamos pulsando en File/New. Nos aparece un cuadro de diálogo que debemos dejar como en la siguiente figura para que nos deje pegar la imagen y le damos el nombre que consideremos oportuno. Los parámetros que deben estar para que nos deje pegar son los mismos en los que estaba, por defecto, la imagen en la que hemos trabajado y de la que hemos copiado el área seleccionada.



Crear hoja en blanco

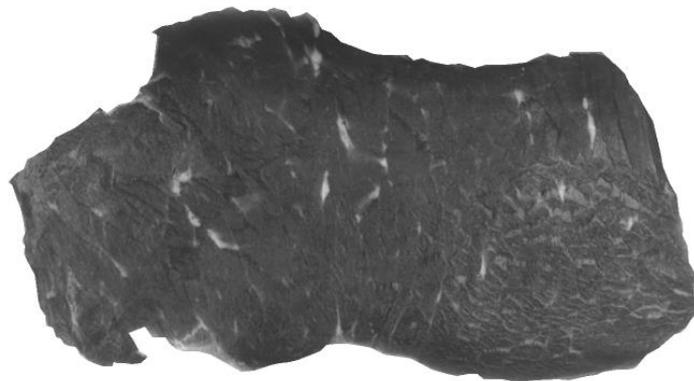
Una vez pegamos el área recortada debemos medir el área de cada veta de grasa. Aunque no hay que olvidarse de calibrar la imagen antes de comenzar.

Esto lo realizaremos de la misma forma que se ha explicado para la imagen anterior. Por ello es necesario no cerrar la imagen de calibración hasta el final.

El procedimiento es el mismo que hemos hecho para delimitar el área: Con el icono  vamos contorneando cada veta. Al finalizar cada una de ellas debemos pulsar Analyze/Measure para que se guarde el área de esa veta, antes de comenzar con la siguiente. Seguimos así hasta completar todas las vetas. Tendremos así, en el cuadro Results (que se abre al guardar la primera veta), todas las áreas de las vetas medidas.

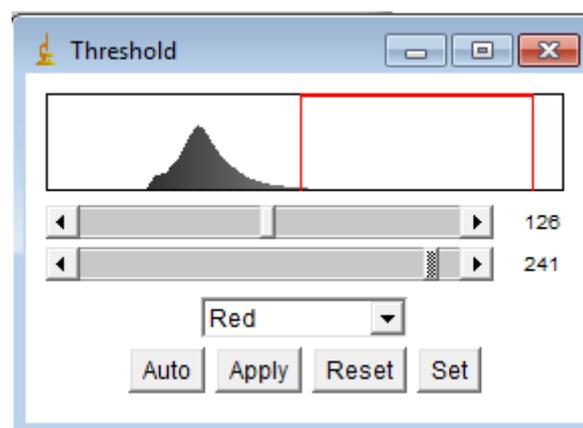
Estos datos los exportamos a Excel. Es conveniente realizar la suma de todas las áreas para compararla con el área total y determinar así el porcentaje de veteado.

Como ya hemos comentado antes, estas medidas se pueden hacer de forma automática con el programa. Para medir las vetas, después de pegar el área contorneada y calibrar la imagen, debemos binarizar la imagen (Image/Tipe/8 bit).

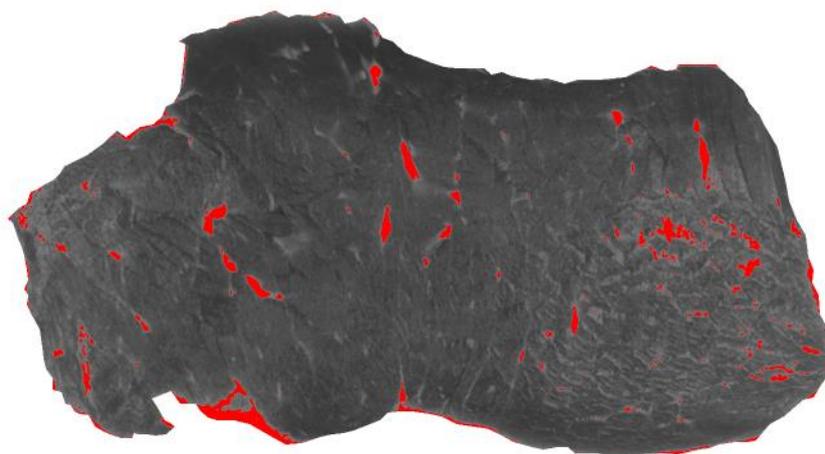


Binarización de la imagen

Seguimos la ruta Image/Adjust/Threshold que nos proporcionará una nueva ventana (Threshold) en la que deberemos ajustar el umbral que más se aproxime a contornear las vetas de grasa. Los valores de color van de 0 a 255. Normalmente nos moveremos en valores por encima de 100.

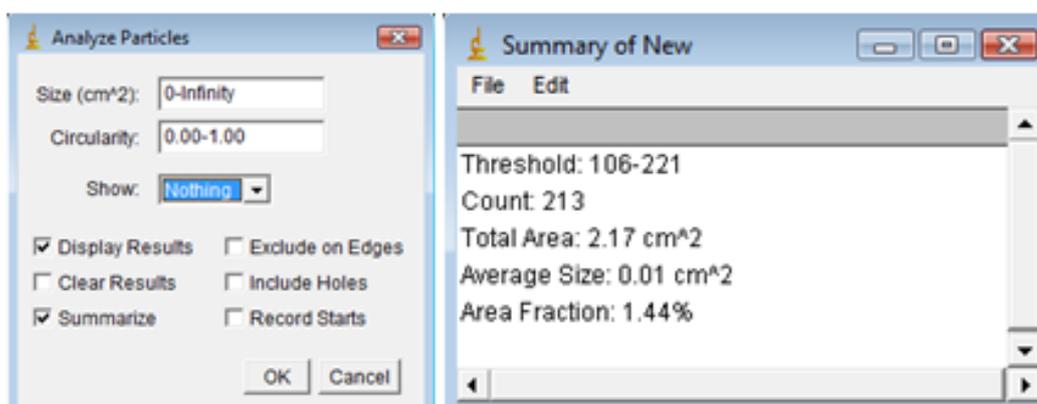


Elección del rango de Threshold



Contorneado automático de las vetas de grasa

Una vez ajustado seleccionamos Analyze/Analyze Particles y obtendremos un cuadro de diálogo con los resultados que buscamos: Umbral del color, nº de vetas, área total de las vetas, tamaño medio y porcentaje sobre el área total (grado de veteado).



Resultados del veteado automático

En nuestro caso hemos realizado todo el proceso de forma manual, excepto la medida de RGB que sólo se puede hacer automáticamente.

La mayor diferencia se da en el número de vetas, ya que automáticamente se detectan muchas más. Pero suelen ser brillos de la imagen y no vetas de grasa.

El grado de veteado va a variar, fundamentalmente, por la raza del animal. Pero se comete menos error realizando la medición de forma manual.

ANEXO II: Manual de utilización de “Image Pro Plus 5.1” aplicado a la determinación del tamaño de los adipocitos

El software empleado en el análisis de imagen es el **Image Pro Plus (Version 5.1)**. Este programa permite el trabajar con imágenes digitalizadas a partir de una cámara de video (en este caso CCD), conectada a un microscopio.

Procedimiento para la toma de imágenes

1. Encender por este orden:

- a. El ordenador
- b. El microscopio
- c. La cámara (que debe estar acoplada al convertidor y éste al ocular superior del microscopio)

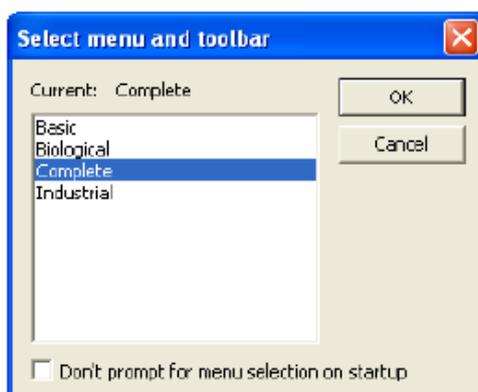
2. Colocar la lente de 40 aumentos (4X)

3. Pinchar el icono del programa



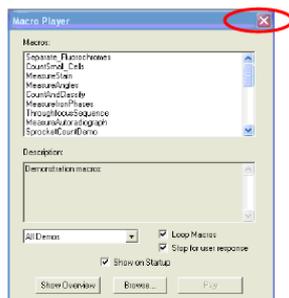
Icono del programa

4. Seleccionar el modo completo: “Complete”



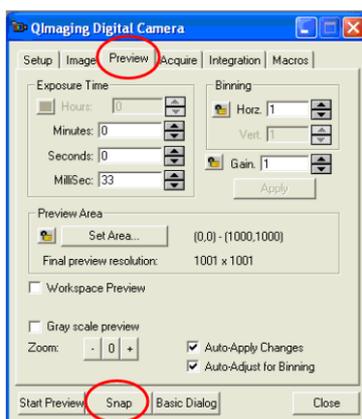
Cuadro de diálogo: “Select menú”

5. Cerrar el recuadro titulado “Macro Player”



Cuadro de diálogo: "Marco Player"

6. Para llegar al cuadro de diálogo *QImaging Digital Camera* pinchar en el icono  o seguir la ruta: *Acquire* → *Video/Digital capture*.
7. Pinchar en *Preview* para visualizar la imagen observada en el microscopio.
8. Una vez se encuentre la imagen deseada, se reajusta el enfoque y se congela la imagen con *Snap*.



Cuadro de diálogo para la captura de imágenes

9. Guardar la imagen con el icono  o siguiendo la ruta: *File* → *Save As* → *Guardar* (en la carpeta que corresponda).

OJO: Cada vez que se vayan a tomar imágenes es necesario realizar una captura de una cámara de conteo con cuadrícula de superficie conocida, para calibrar después el programa a la hora de realizar las mediciones.



Cámara de conteo

Procesado de las imágenes

1. Acceder al programa (pinchar el icono, seleccionar el modo completo "Complete" y cerrar el recuadro titulado "Macro Player").

2. Calibrar: Para ello, abrir la foto guardada de la calibración: Usar el icono  o seguir la ruta: *File* → *Open*, localizar la imagen, seleccionarla y abrirla.

Seguir la ruta: *Measure* → *Calibration* → *Spatial*. Se abrirá el cuadro *Spatial Calibration*. Seleccionar la ventana *Name*, elegir la opción *Spatial Cal 0* y cambiarle el nombre por *Adipocitos Cal 0*, o el nombre que se quiera dar.

En la ventana *Unit* seleccionar *microns* (micras).

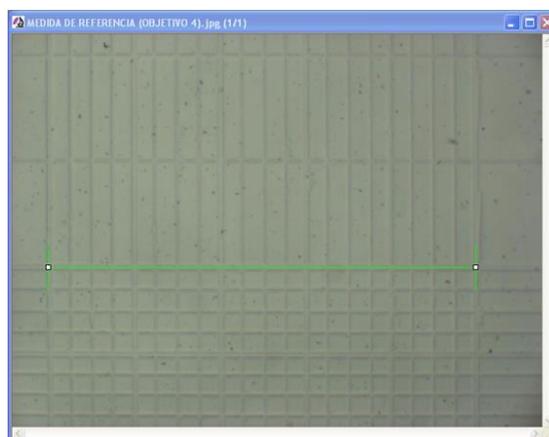
En la ventana *Pixels/Unit*, elegir la orden *Image*:

Se abrirá el cuadro *Scaling* y aparecerá una línea verde (en la parte superior izquierda de la imagen). Al pinchar en sus extremos se moverá hasta la medida de referencia. Hacer el *Zoom* necesario para minimizar el error y ajustar la línea con la medida de referencia conocida de imagen de la cámara de coteo.

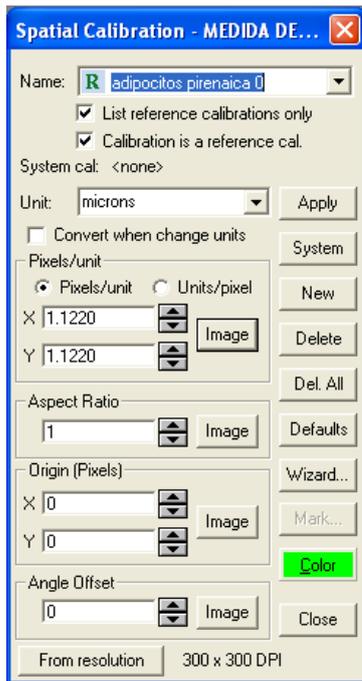
Se puede hacer *Zoom* y modificar la línea de manera simultánea, para ello sólo hay que pinchar el icono . Cuando se haya ajustado la línea, escribir las unidades de la medida conocida (en micras) en el cuadro *Scaling* y aceptar pulsando *OK*.

Inmediatamente, aparecerá el cuadro *Spatial Calibration*, donde para guardar la aplicación, hay que pulsar sobre *apply* y cerrar el cuadro de dialogo.

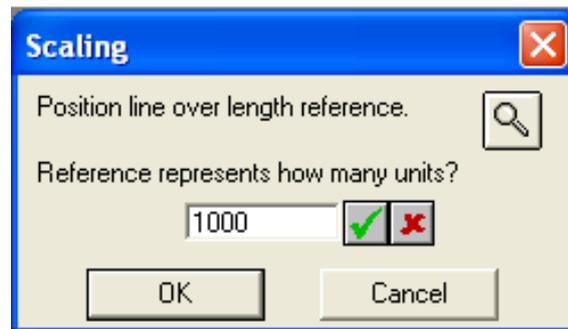
Este proceso permite tener guardada la calibración, de tal manera que solo es necesario realizarlo la primera vez. Sin embargo tendremos que aplicar esta calibración a todas las imágenes que analicemos (una por una), como se explica en el punto 6.



Marcar la superficie conocida con la línea verde



Cuadro de dialogo: "Spatial Calibration"



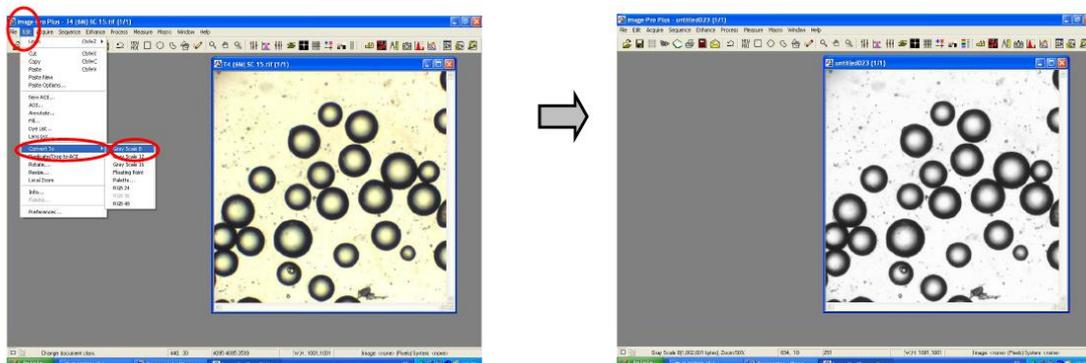
Cuadro de dialogo: "Scaling"

3. Abrir imagen:

Usar el icono  o seguir la ruta: *File* → *Open*, localizar las imágenes, seleccionarlas y abrirlas. Es recomendable hacerlo de una en una; es decir, se abre una, se analiza y después se abre la siguiente.

Antes de empezar a trabajar con una imagen, se recomienda echar un vistazo a todas las fotografías que correspondan al mismo grupo (por ejemplo, mismo animal y mismo depósito) y seleccionar el orden con el que sea más cómodo el trabajo.

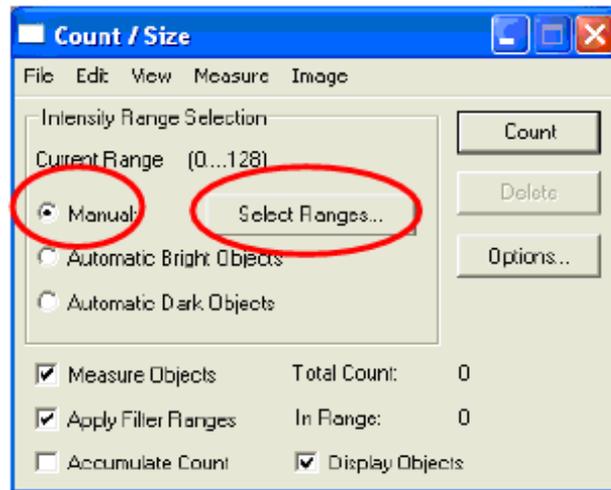
4. Convertir la imagen a la escala de gris: *Edit* → *Convert to* → *Gray scale 8*.



Conversión a: Gray Scale 8

5. Seleccionar *Measure* → *Count/Size* o usar el icono .

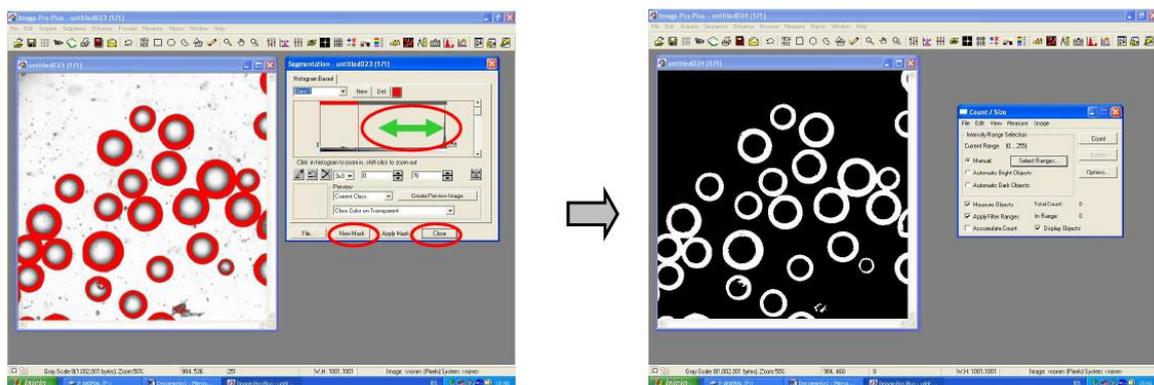
En *Count/Size*, elegir la opción *Manual* y seleccionar *Select Ranges*



Cuadro de diálogo: "Count/Size"

En el cuadro *Segmentation* se selecciona el nivel de escala de gris desplazando con el ratón la línea (señalada en verde en la figura) hacia izquierda o derecha.

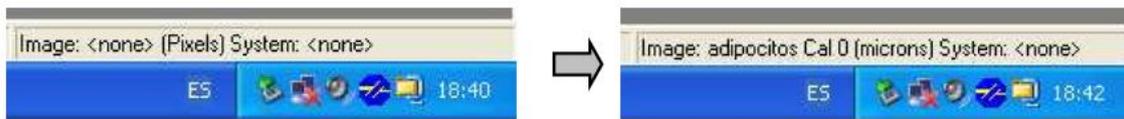
Cuando se obtenga la escala de gris adecuada, pinchar en *New Mask* y cerrar el cuadro *Segmentation* empleando el botón *Close*.



Selección del nivel de escala de gris

6. Una vez tengamos la imagen con la máscara, procedemos a aplicarle la calibración.

Para ello pinchamos el icono  y seleccionamos la opción *Adipocitos Cal 0* (o el nombre que hayamos puesto). Tras activar esta calibración, aparecerá en la barra de herramientas inferior el mensaje: *Image: adipocitos Cal 0*.



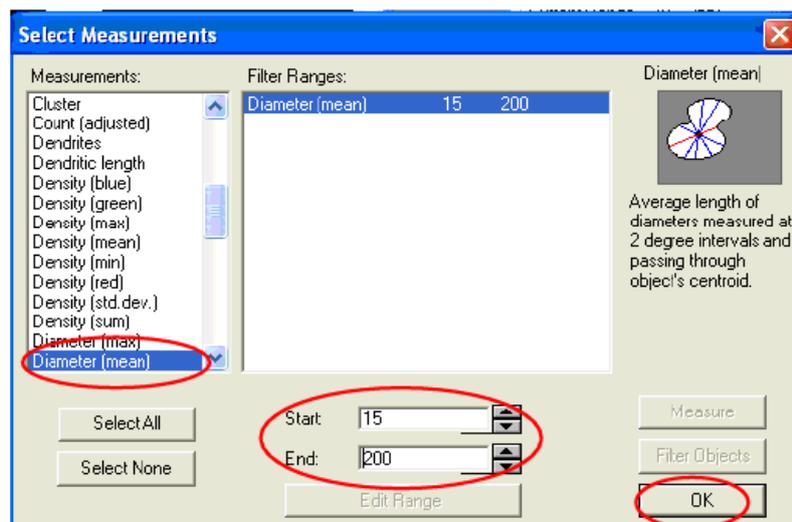
Comprobación de tener calibrada la imagen con la que se está trabajando

7. En el cuadro *Count/Size*, seguir la ruta: *Measure* → *Select Measurements*.

Por defecto, el programa mide el Área, por lo que hay que eliminarlo (pinchando sobre él dos veces) y elegir la opción *Diameter (mean)*, tomando como límite inferior (*Start*) 15 μm y como superior (*End*) 200 μm . Para finalizar, pinchar *Ok*.

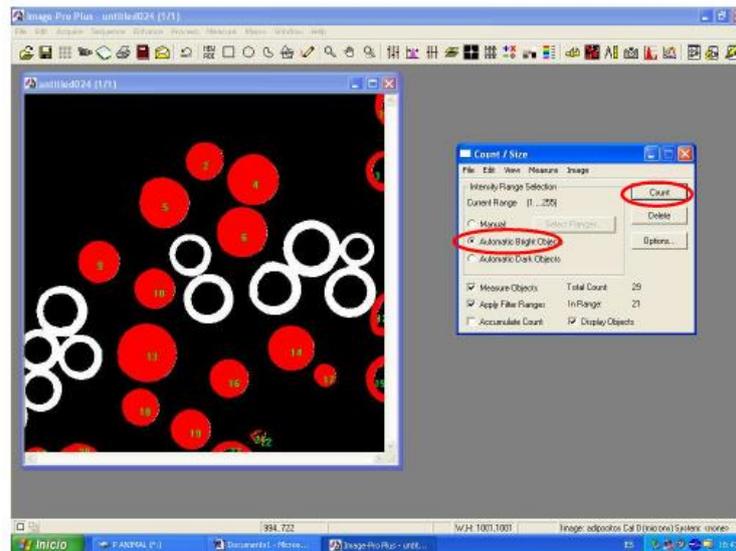
El valor inferior (15 μm) sirve para que el programa no reconozca como adipocitos a otras partículas, como motas de polvo. Sin embargo, en depósitos como el Longissimus, pueden encontrarse bastantes adipocitos más pequeños que ese tamaño, por lo que se recomienda disminuir el valor inferior hasta 10 μm .

Es importante realizar este proceso con todas las imágenes, ya que al abrir una nueva estará sin calibrar.



Cuadro de diálogo: "Select Measurements"

8. Para seleccionar de manera automática los adipocitos a medir, seleccionar la opción *Automatic Bright Objects* y aceptar la orden con *Count*.



Selección de adipocitos de manera automática

9. Cortar todos los adipocitos pegados entre sí:

- De forma automática: Seleccionar *Edit* (en el cuadro *Count/Size*) → *Watershed Split*.
- De forma manual: Seleccionar *Edit* (en el cuadro *Count/Size*) → *Split Objects* → dibujar la línea de corte utilizando el botón derecho del ratón: Pinchar en el inicio de la línea 1 sola vez el botón derecho, desplazar el ratón y al final de dicha línea volver a pinchar el botón derecho. Cuando se hayan realizado todos los cortes (de manera manual) hay que confirmar la orden pulsando el botón *OK* del cuadro *Split Objects*. Normalmente esta opción es más aconsejable.

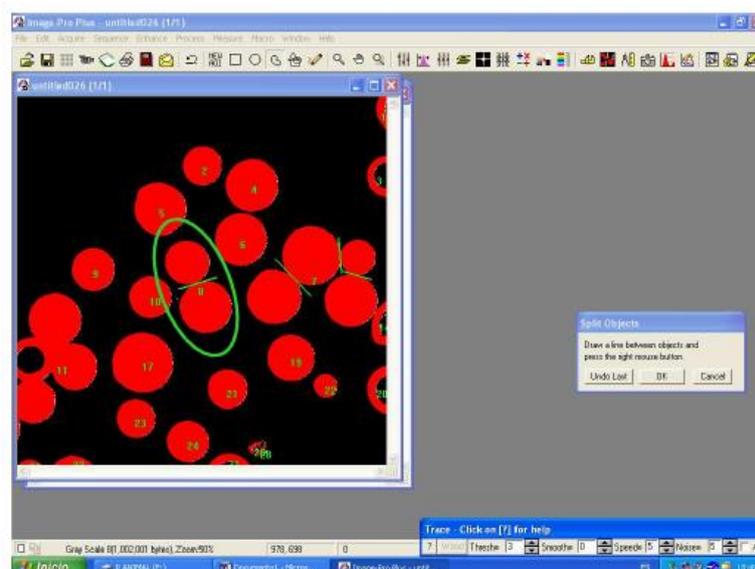
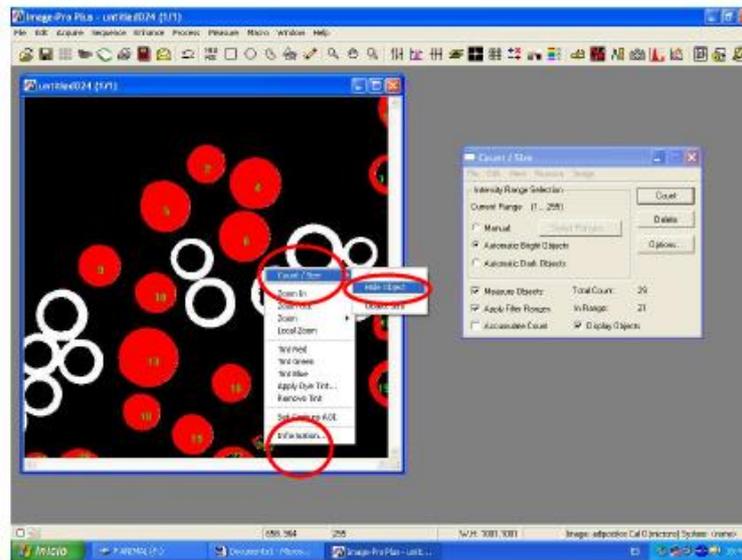


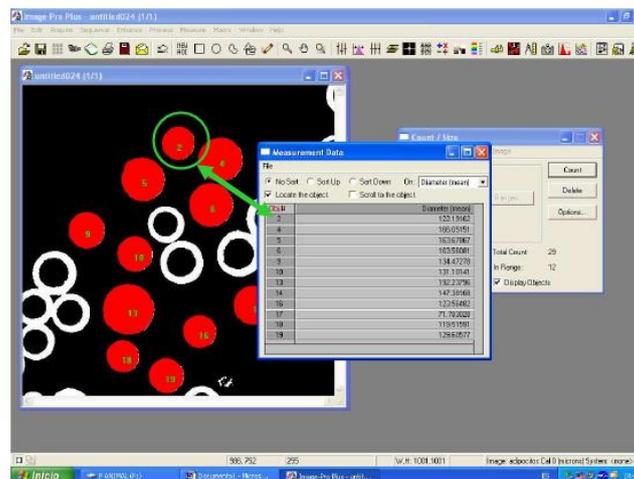
Ilustración 1 Corte de adipocitos pegados

10. Eliminar aquellos objetos que no sean adipocitos: Pinchar sobre cada uno de los objetos con el botón derecho del ratón y pulsar *Count/Size hide* → *object*.



Eliminación de objetos que no son adipocitos

11. Para obtener los datos seguir la ruta: *View* → *Measurement Data*.



Visualización de los datos obtenidos

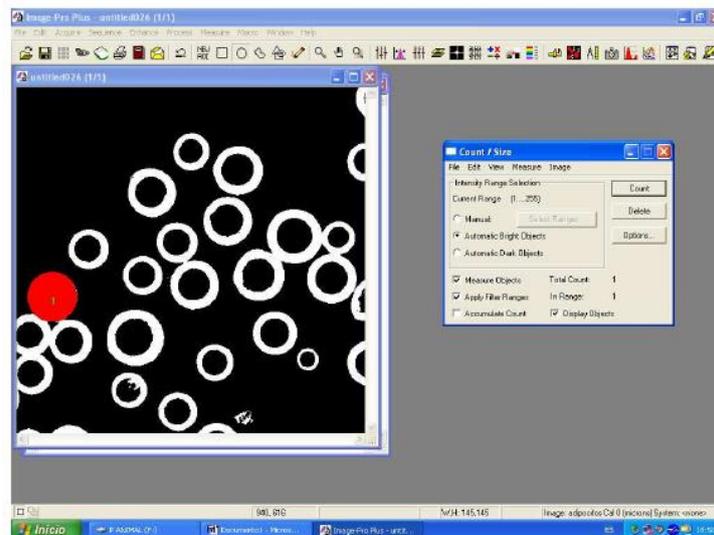
12. Antes de exportar los datos, es necesario crear (y guardar) una hoja de Excel con el nombre de las muestras (por ejemplo el nombre del animal y del depósito).

Los datos se exportan siguiendo la ruta: *File* → *DDE To Excel*.

Si, en el Excel, no se nos colocan los datos en el lugar que queremos (debajo de los anteriores, a la derecha, etc.) podemos modificarlo siguiendo la ruta: *File* → *DDE Options*.

13. A veces, de forma automática, no se consiguen medir todos los adipocitos de una imagen, por lo que deberemos medir manualmente los que se hayan quedado sin medir de forma automática. Para dibujar el contorno de estos adipocitos hay que pinchar el icono , dibujar un adipocito, pulsar *Count* y, como ya se ha explicado anteriormente, obtener el diámetro y exportarlo a Excel, añadiéndolo a los datos obtenidos de forma automática.

El proceso manual es más costoso, pero hay que realizarlo para que las medidas que obtengamos sean representativas.



Medición manual de adipocitos

Una vez obtenidos los valores en Excel, se repite el proceso (desde el punto 3) con la siguiente imagen.

ANEXO III: Datos individuales del tamaño de vetas y distribución de adipocitos por animal

1. Medidas veteadas

Datos del número y tamaño de las vetas analizadas para cada filete

Nº Identificación	P1 SUPERIOR	P1 INFERIOR	P2 SUPERIOR	P2 INFERIOR	P3 SUPERIOR	P3 INFERIOR	P4 SUPERIOR	P4 INFERIOR	
ÁREA TOTAL (cm ²)	2.247	2.091	1.431	1.827	2.219	2.605	2.348	2.790	
TAMAÑO MEDIO (cm ²)	0.132	0.091	0.080	0.122	0.111	0.145	0.073	0.096	
Nº VETAS	17	23	18	15	20	18	32	29	
TAMAÑO VETAS (cm ²)	1	0.675	0.126	0.03	0.651	0.253	0.118	0.049	0.012
	2	0.102	0.019	0.169	0.03	0.053	0.058	0.096	0.135
	3	0.039	0.026	0.052	0.072	0.066	0.069	0.032	0.044
	4	0.022	0.038	0.026	0.045	0.036	0.057	0.031	0.057
	5	0.102	0.182	0.072	0.062	0.022	0.056	0.058	0.111
	6	0.1	0.032	0.115	0.076	0.082	0.034	0.128	0.112
	7	0.1	0.019	0.235	0.088	0.045	0.010	0.038	0.148
	8	0.33	0.048	0.11	0.1	0.176	0.074	0.185	0.210
	9	0.093	0.253	0.208	0.297	0.031	0.089	0.085	0.076
	10	0.013	0.28	0.056	0.108	0.094	0.035	0.126	0.064
	11	0.022	0.072	0.048	0.114	0.042	0.234	0.046	0.026
	12	0.162	0.083	0.038	0.051	0.046	0.046	0.011	0.036
	13	0.105	0.102	0.015	0.024	0.905	0.079	0.119	0.096
	14	0.046	0.009	0.062	0.058	0.093	1.195	0.109	0.179
	15	0.073	0.064	0.127	0.051	0.052	0.092	0.019	0.478
	16	0.144	0.127	0.022	-	0.035	0.260	0.015	0.158
	17	0.119	0.08	0.026	-	0.067	0.057	0.138	0.034
	18	-	0.224	0.02	-	0.034	0.042	0.086	0.051
	19	-	0.044	-	-	0.038	-	0.125	0.041
	20	-	0.062	-	-	0.049	-	0.121	0.021
	21	-	0.046	-	-	-	-	0.129	0.229
	22	-	0.031	-	-	-	-	0.020	0.101
	23	-	0.124	-	-	-	-	0.064	0.066
	24	-	-	-	-	-	-	0.033	0.054
	25	-	-	-	-	-	-	0.051	0.054
	26	-	-	-	-	-	-	0.021	0.076
	27	-	-	-	-	-	-	0.048	0.055
	28	-	-	-	-	-	-	0.058	0.042
	29	-	-	-	-	-	-	0.067	0.024
	30	-	-	-	-	-	-	0.038	-
	31	-	-	-	-	-	-	0.126	-
	32	-	-	-	-	-	-	0.076	-

2. Distribuciones del tamaño de los adipocitos de los depósitos estudiados

Depósito intramuscular:

Longissimus Dorsi

Tests BC y Dip para determinar la distribución de los adipocitos en Longissimus Dorsi:

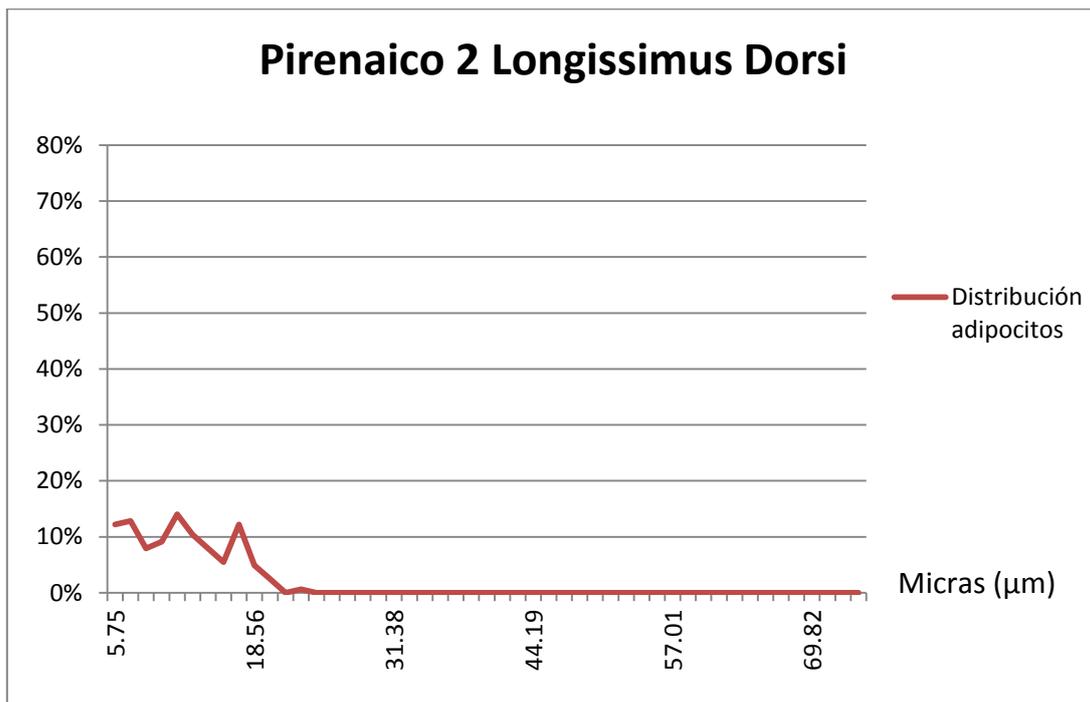
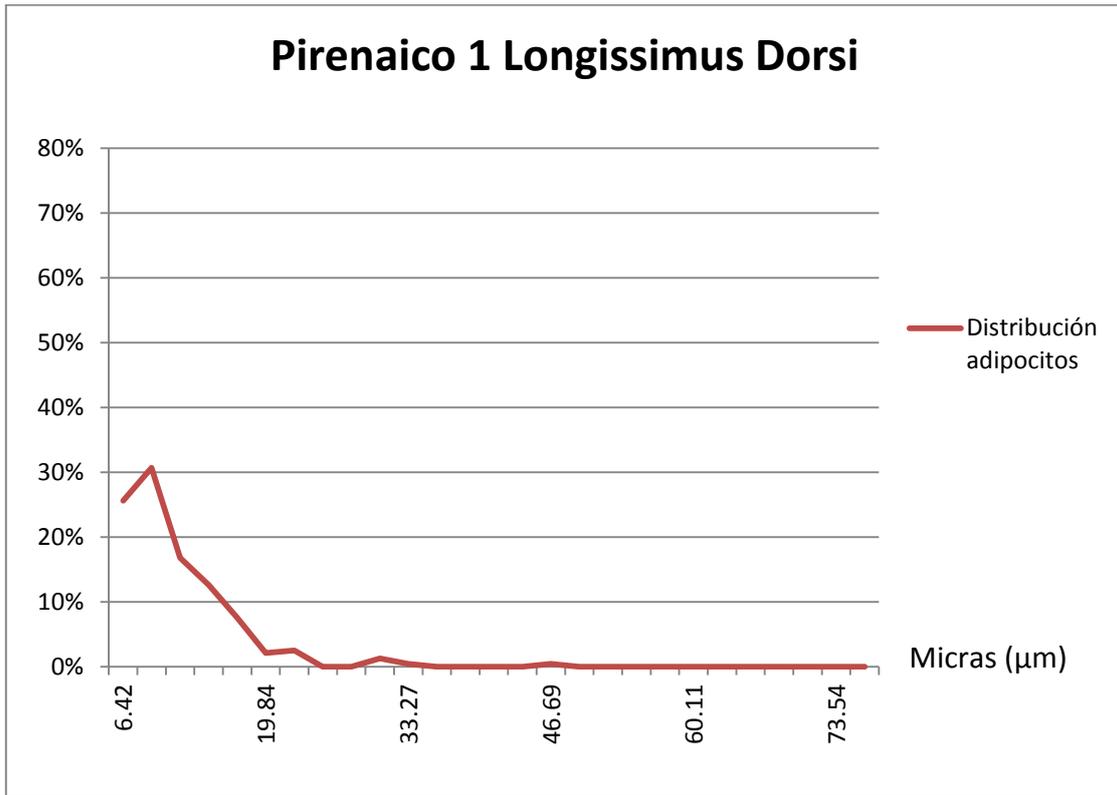
LONGISSIMUS DORSI	BC test				DIP test	
	Valor	Curtosis	Asimetría	Inferencia*	Valor	Inferencia
P1 LONGISSIMUS DORSI	0.522	9.725	2.379	No se rechaza unimodalidad	0.017	Dip < 0.034 ($\alpha=0.05$) Dip < 0.032 ($\alpha=0.10$) No se rechaza unimodalidad
P2 LONGISSIMUS DORSI	0.494	-0.929	0.227	No se rechaza unimodalidad	0.033	Dip < 0.041 ($\alpha=0.05$) Dip < 0.038 ($\alpha=0.10$) No se rechaza unimodalidad
P3 LONGISSIMUS DORSI	0.830	1.522	1.755	Se rechaza unimodalidad	0.054	Dip < 0.094 ($\alpha=0.05$) Dip < 0.087 ($\alpha=0.10$) No se rechaza unimodalidad
P4 LONGISSIMUS DORSI	0.681	17.364	3.592	Se rechaza unimodalidad	0.028	Dip < 0.041 ($\alpha=0.05$) Dip < 0.038 ($\alpha=0.10$) No se rechaza unimodalidad

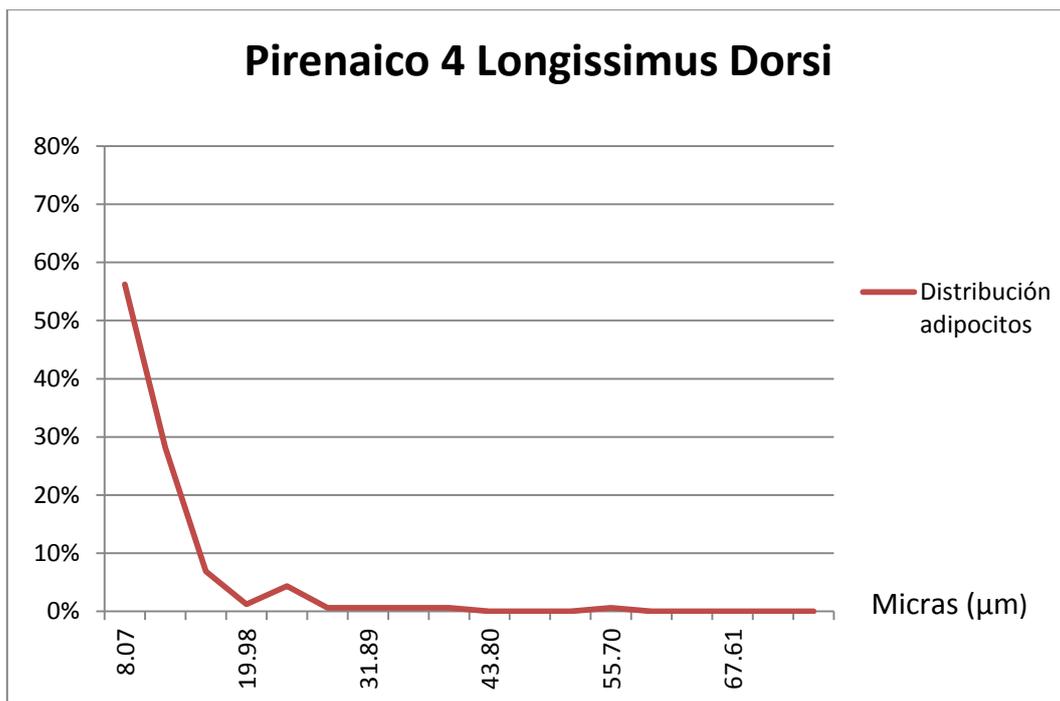
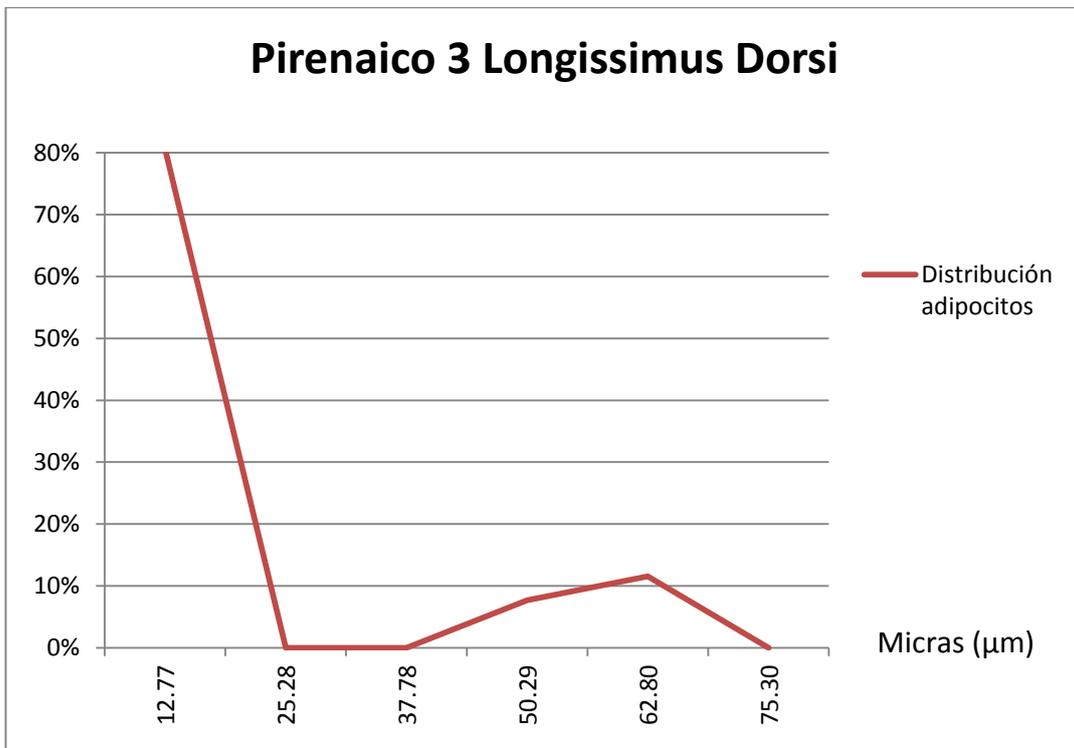
*Valores de BC < 0.555 indican unimodalidad

Descriptivos estadísticos del depósito Longissimus Doris para cada uno de los animales:

LONGISSIMUS DORSI	P1	P2	P3	P4
Mínimo (μm)	5.07	5.03	6.52	6.08
Máximo (μm)	46.49	23.27	69.05	56.30
Mediana (μm)	9.54	11.53	9.87	9.51
Media (μm)	11.00 \pm 0.34	11.73 \pm 0.33	18.64 \pm 3.80	11.60 \pm 0.51
Moda (μm)	9.10	11.44	12.77	8.07

Gráficas de las distribuciones del tamaño de los adipocitos de Longissimus Dorsi





Masseter

Tests BC y Dip para determinar la distribución de los adipocitos en Masseter:

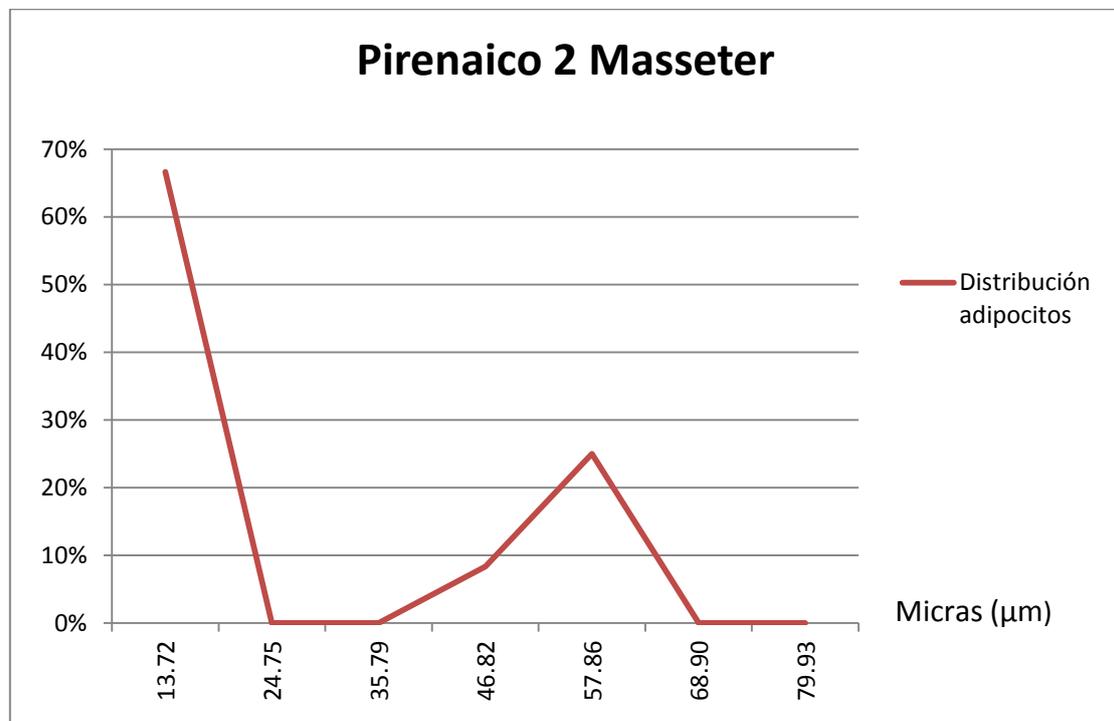
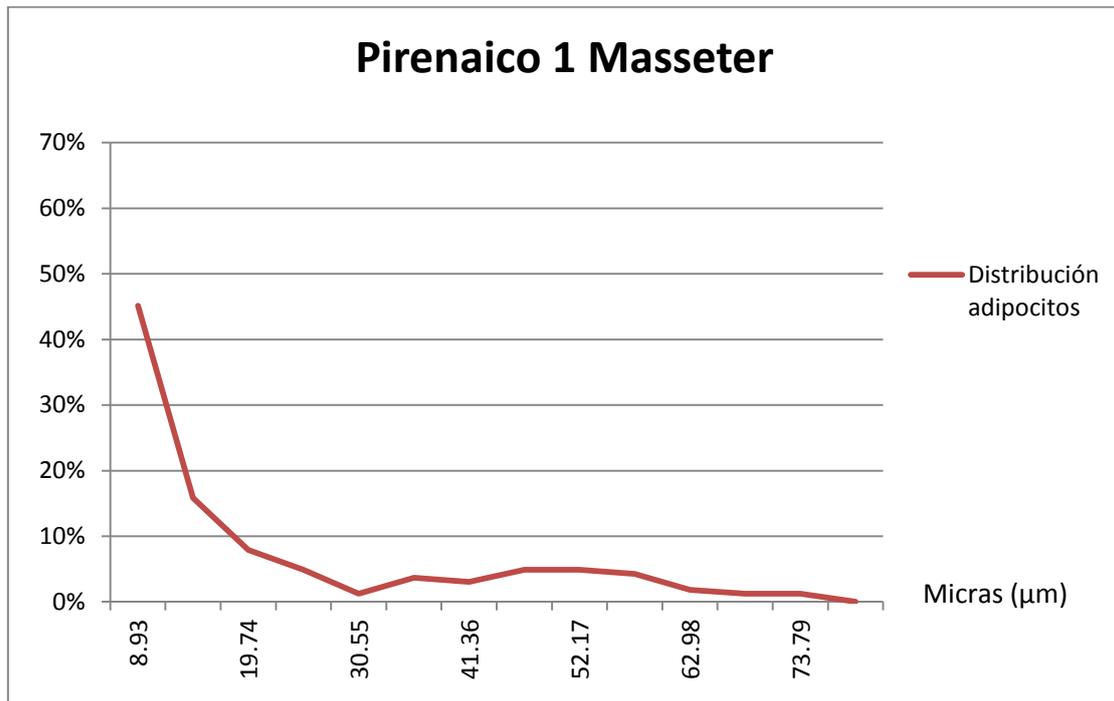
MASSETER	BC test				DIP test	
	Valor	Curtosis	Asimetría	Inferencia*	Valor	Inferencia
P1 MASSETER	0.778	0.210	1.241	Se rechaza unimodalidad	0.030	Dip < 0.041 ($\alpha=0.05$) Dip < 0.038 ($\alpha=0.10$) No se rechaza unimodalidad
P2 MASSETER	0.651	-1.187	0.923	Se rechaza unimodalidad	0.105	Dip < 0.130 ($\alpha=0.05$) Dip < 0.121 ($\alpha=0.10$) No se rechaza unimodalidad
P3 MASSETER	0.718	-1.708	0.158	Se rechaza unimodalidad	0.094	Dip > 0.061 ($\alpha=0.05$) Se rechaza unimodalidad
P4 MASSETER	0.828	-1.004	0.828	Se rechaza unimodalidad	0.056	Dip > 0.035 ($\alpha=0.05$) Se rechaza unimodalidad

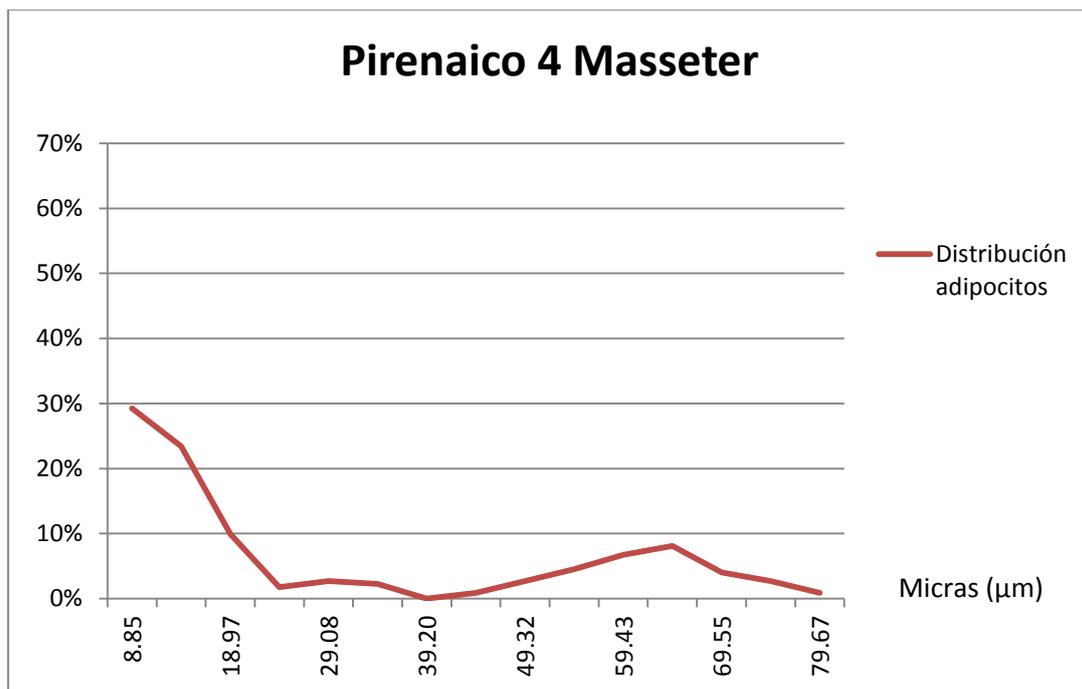
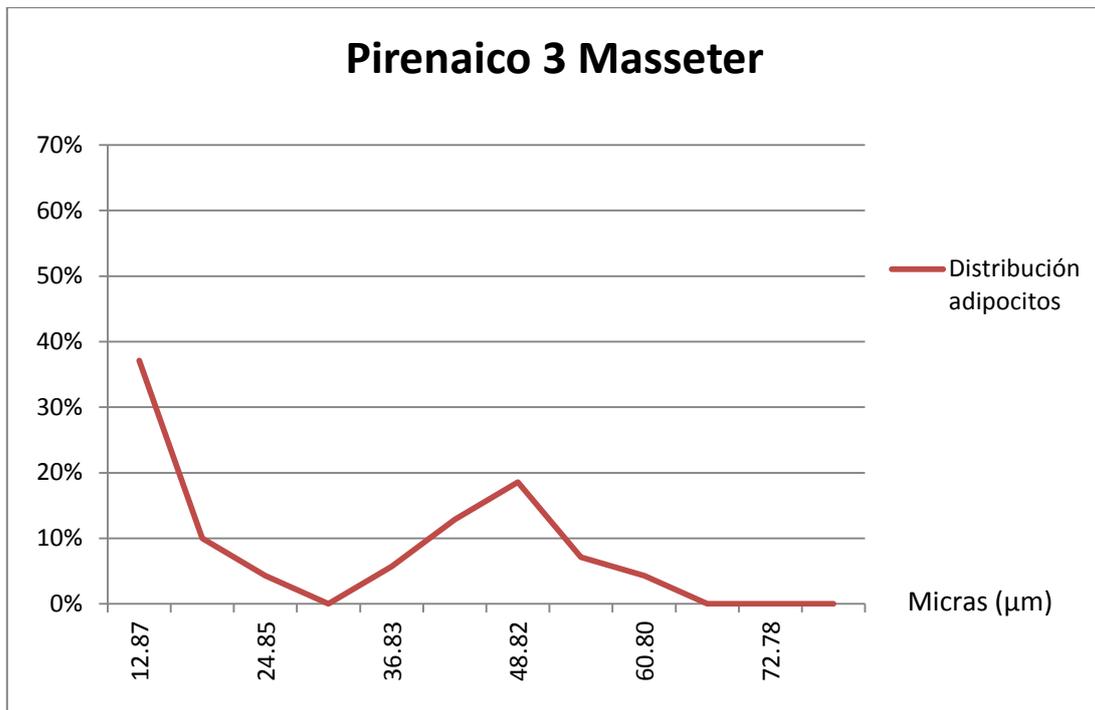
*Valores de BC<0.555 indican unimodalidad

Descriptivos estadísticos del depósito Masseter para cada uno de los animales:

MASSETER	P1	P2	P3	P4
Mínimo (μm)	6.23	8.20	9.87	6.32
Máximo (μm)	75.45	63.38	60.00	81.69
Mediana (μm)	12.44	12.85	24.36	15.57
MODA 1 (μm)	8.93	13.72	12.87	8.85
MODA 2 (μm)	46.76	57.86	48.82	64.49
NADIR (μm)	30.55	24.75	30.84	24.02
% SOBRE NADIR	25.00	33.33	48.57	35.59
RATIO PEQUEÑOS/GRANDES	3.00	2.00	1.06	1.81

Gráficas de las distribuciones del tamaño de los adipocitos de Masseter





Semitendinosus

Tests BC y Dip para determinar la distribución de los adipocitos en Semitendinosus:

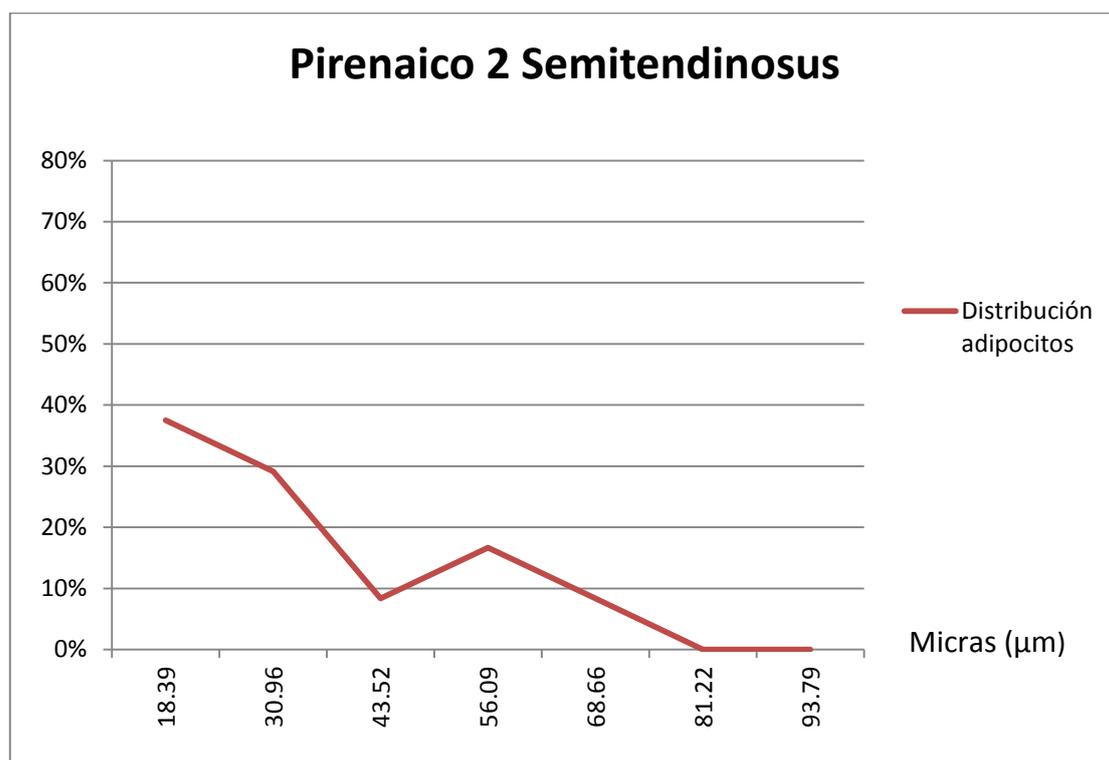
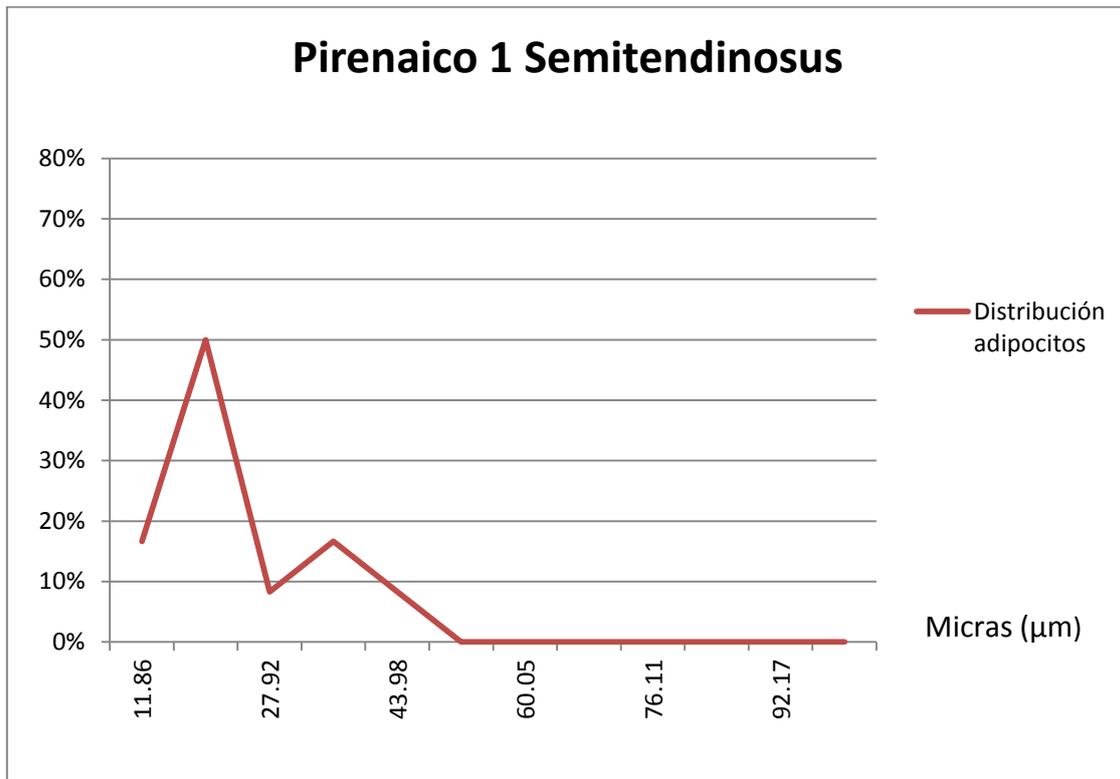
SEMITENDINOSUS	BC test				DIP test	
	Valor	Curtosis	Asimetría	Inferencia*	Valor	Inferencia
P1 SEMITENDINOSUS	0.327	1.226	0.849	No se rechaza unimodalidad	0.089	Dip < 0.130 ($\alpha=0.05$) Dip < 0.121 ($\alpha=0.10$) No se rechaza unimodalidad
P2 SEMITENDINOSUS	0.564	-0.073	0.946	Se rechaza unimodalidad	0.053	Dip < 0.097 ($\alpha=0.05$) Dip < 0.090 ($\alpha=0.10$) No se rechaza unimodalidad
P3 SEMITENDINOSUS	0.796	2.171	1.838	Se rechaza unimodalidad	0.048	Dip < 0.087 ($\alpha=0.05$) Dip < 0.080 ($\alpha=0.10$) No se rechaza unimodalidad
P4 SEMITENDINOSUS	0.528	-0.703	0.602	No se rechaza unimodalidad	0.051	Dip < 0.083 ($\alpha=0.05$) Dip < 0.076 ($\alpha=0.10$) No se rechaza unimodalidad

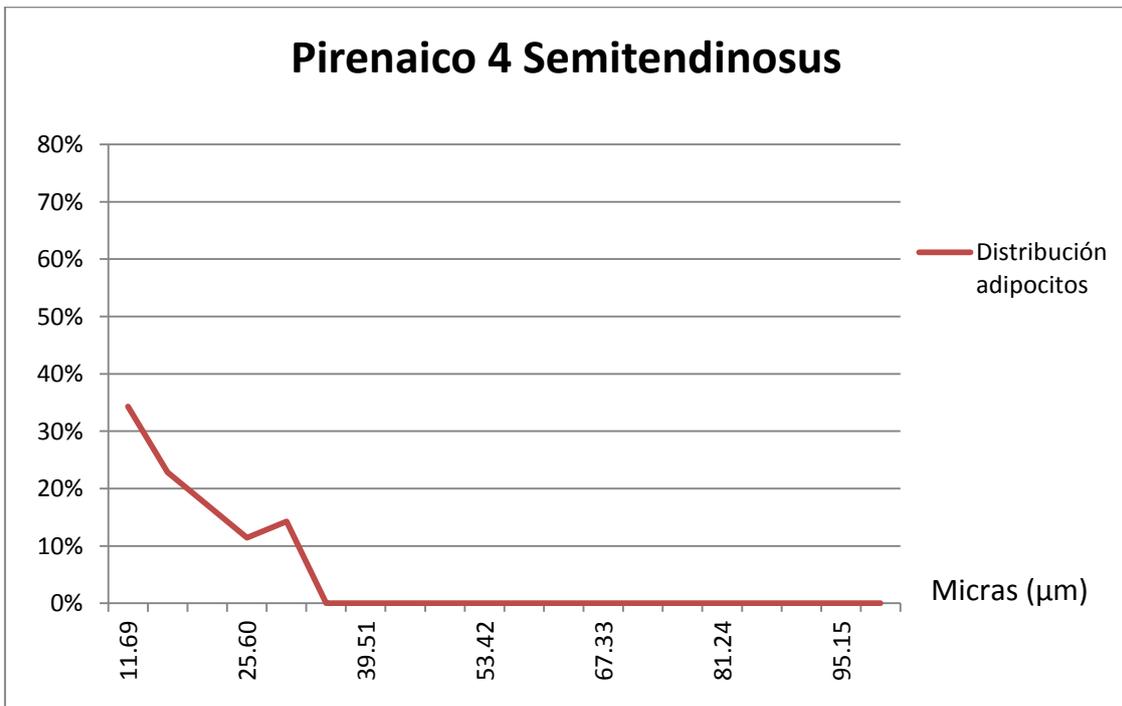
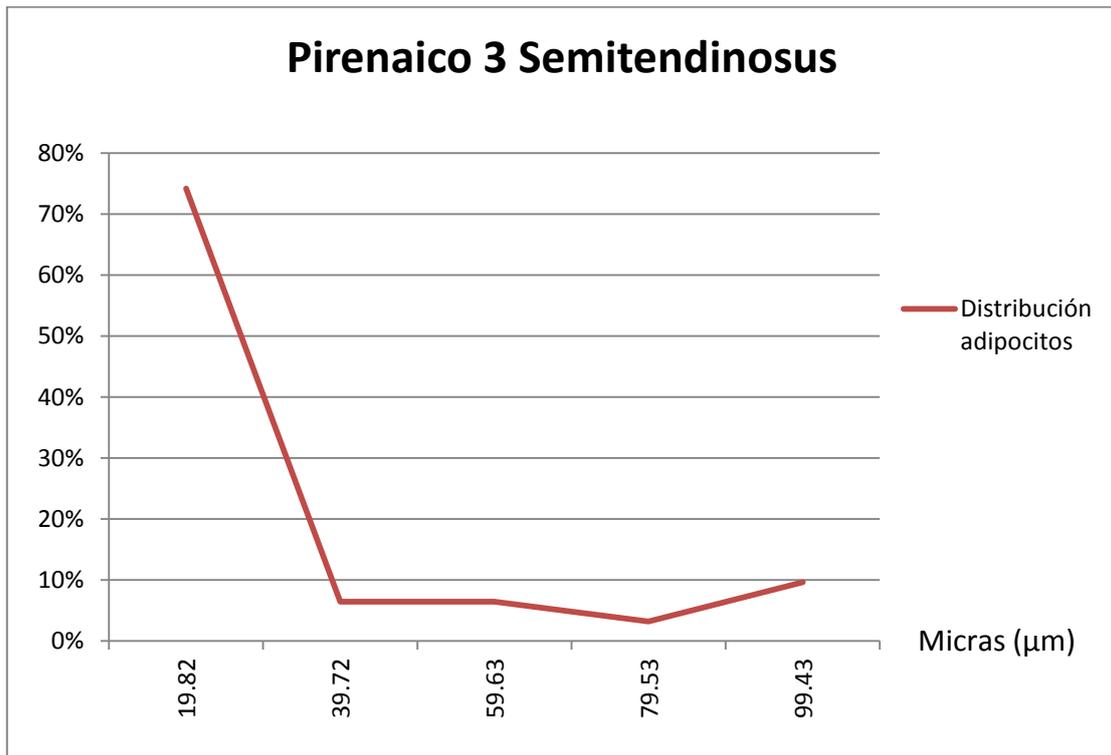
*Valores de BC < 0.555 indican unimodalidad

Descriptivos estadísticos del depósito Semitendinosus para cada uno de los animales:

SEMITENDINOSUS	P1	P2	P3	P4
Mínimo (μm)	7.84	12.11	9.87	9.38
Máximo (μm)	48.00	74.94	109.38	32.56
Mediana (μm)	22.36	26.37	19.92	16.96
Media (μm)	24.23 \pm 3.05	32.79 \pm 3.59	31.94 \pm 5.23	18.21 \pm 1.14
Moda (μm)	19.89	18.39	19.82	11.69

Gráficas de las distribuciones del tamaño de los adipocitos de Semitendinosus





Sternomandibularis

Tests BC y Dip para determinar la distribución de los adipocitos en Sternomandibularis:

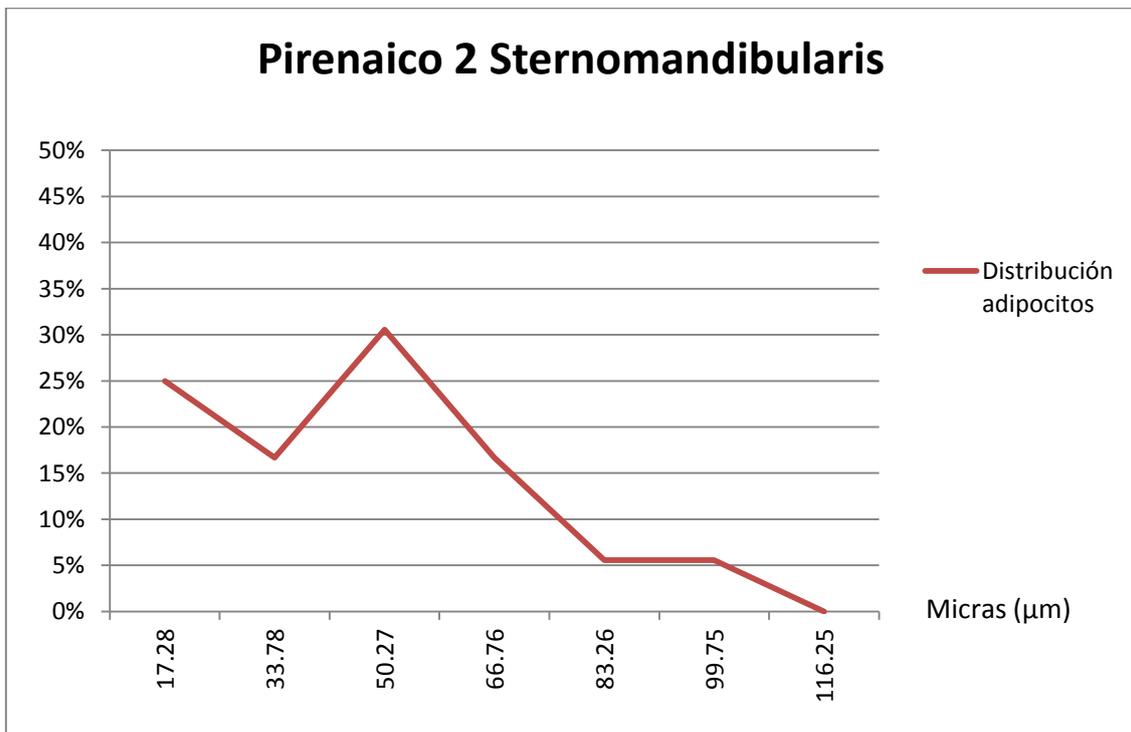
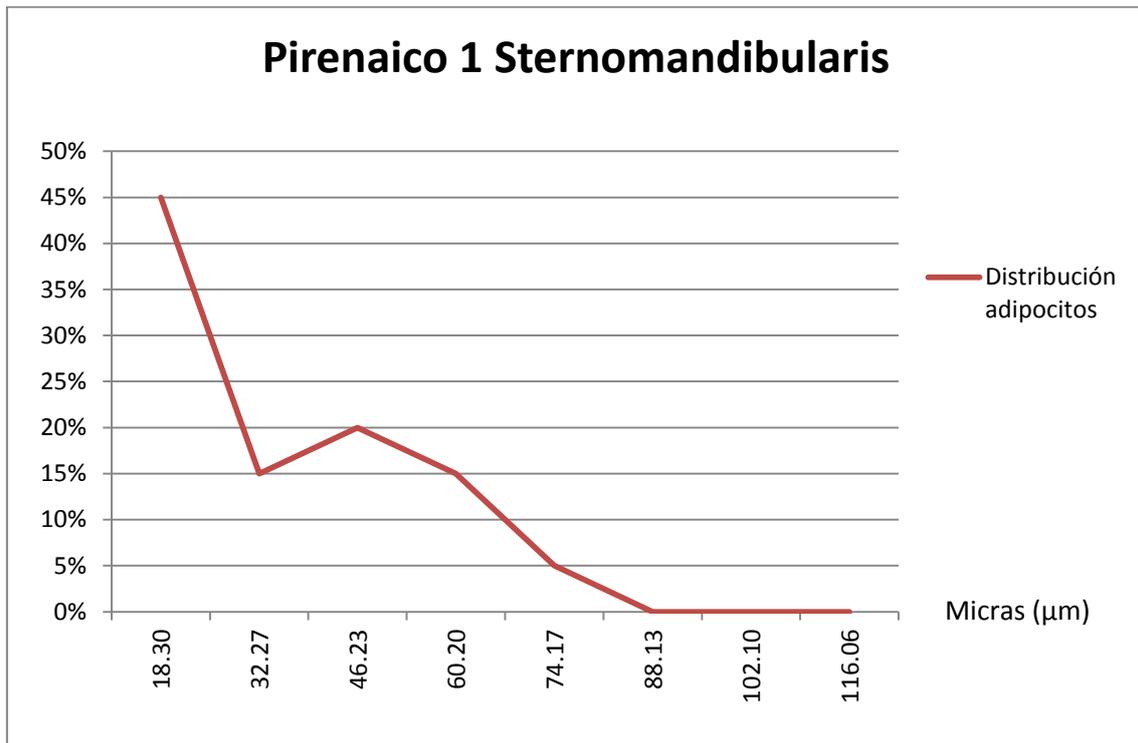
STERNOMANDIBULARIS	BC test				DIP test	
	Valor	Curtosis	Asimetría	Inferencia*	Valor	Inferencia
P1 STERNOMANDIBULARIS	0.483	-0.572	0.658	No se rechaza unimodalidad	0.058	Dip < 0.105 ($\alpha=0.05$) Dip < 0.097 ($\alpha=0.10$) No se rechaza unimodalidad
P2 STERNOMANDIBULARIS	0.393	-0.281	0.420	No se rechaza unimodalidad	0.070	Dip < 0.082 ($\alpha=0.05$) Dip < 0.076 ($\alpha=0.10$) No se rechaza unimodalidad
P3 STERNOMANDIBULARIS	0.347	0.347	-0.459	No se rechaza unimodalidad	0.027	Dip < 0.063 ($\alpha=0.05$) Dip < 0.058 ($\alpha=0.10$) No se rechaza unimodalidad
P4 STERNOMANDIBULARIS	0.706	-1.496	0.383	Se rechaza unimodalidad	0.094	Dip > 0.058 ($\alpha=0.05$) Se rechaza unimodalidad

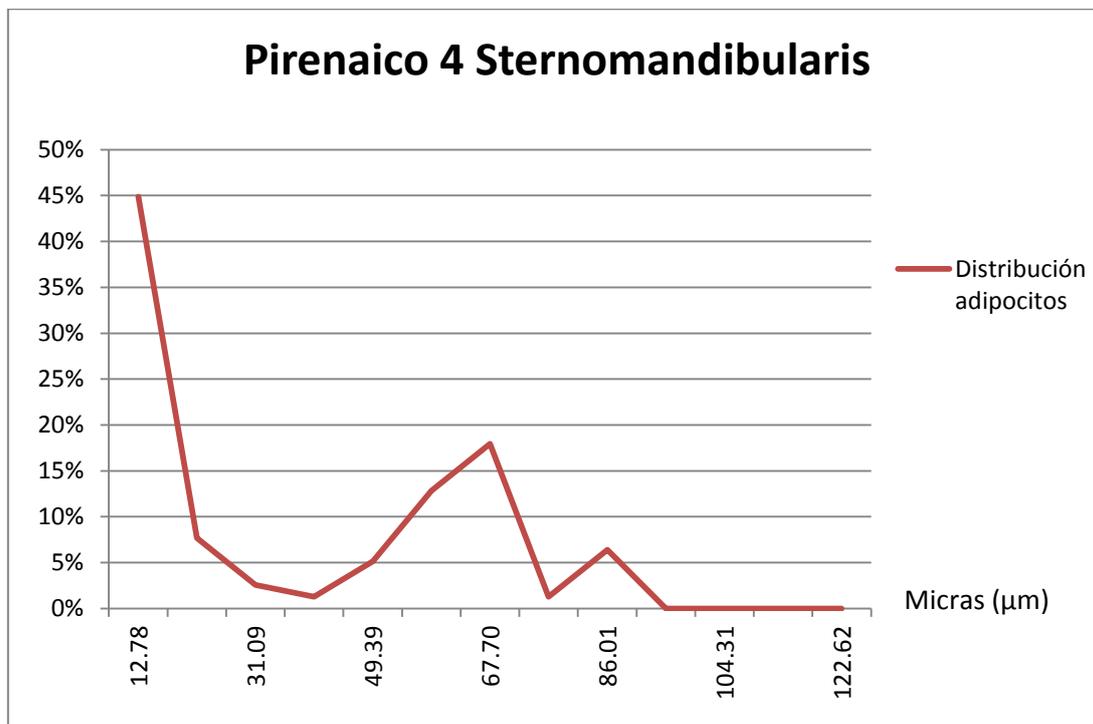
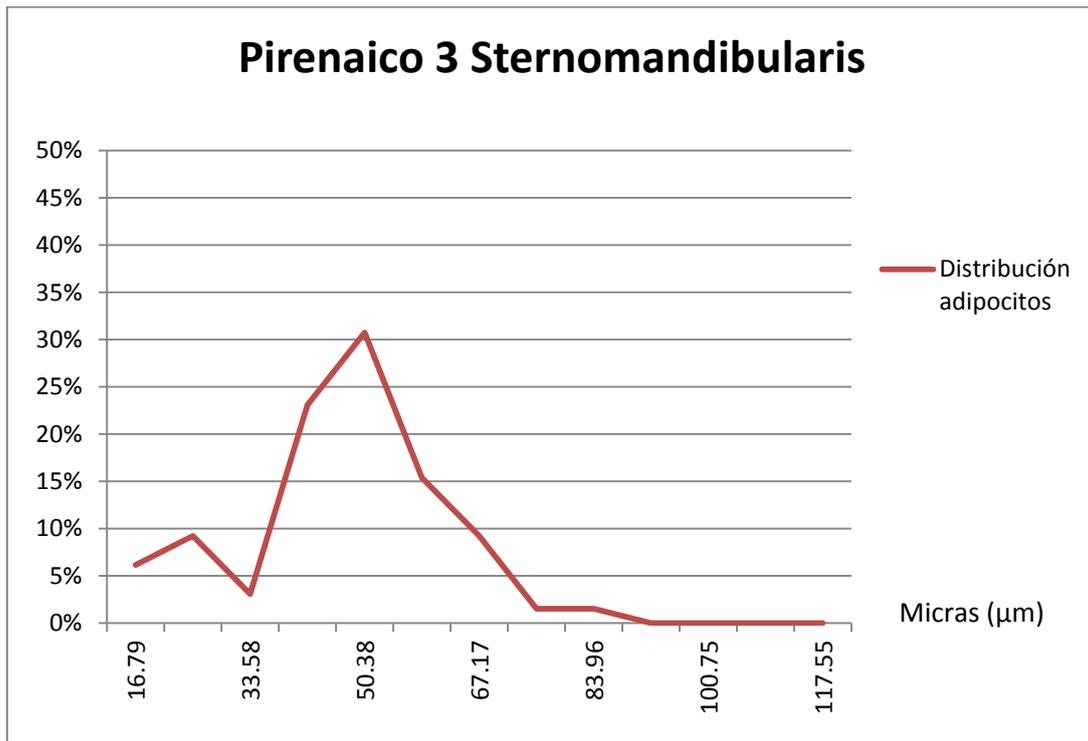
*Valores de BC<0.555 indican unimodalidad

Descriptivos estadísticos del depósito Sternomandibularis para cada uno de los animales:

STERNOMANDIBULARIS	P1	P2	P3	P4
Mínimo (μm)	11.32	9.04	12.59	8.20
Máximo (μm)	81.15	108.00	80.29	89.04
Mediana (μm)	31.76	43.30	48.39	22.89
MODA 1 (μm)	18.30	17.28	25.19	12.78
MODA 2 (μm)	46.23	50.27	50.38	67.70
NADIR (μm)	32.27	33.78	33.58	40.24
% SOBRE NADIR	40.00	58.33	81.54	43.59
RATIO PEQUEÑOS/GRADES	1.50	0.71	0.23	1.29

Gráficas de las distribuciones del tamaño de los adipocitos de Sternomandibularis





Depósito Subcutáneo:

Tests BC y Dip para determinar la distribución de los adipocitos en Subcutáneo:

SUBCUTÁNEO	BC test				DIP test	
	Valor	Curtosis	Asimetría	Inferencia*	Valor	Inferencia
P1 SUBCUTÁNEO	0.841	-1.829	-0.143	Se rechaza unimodalidad	0.148	Dip > 0.035 ($\alpha=0.05$) Se rechaza unimodalidad
P2 SUBCUTÁNEO	0.601	-1.249	0.279	Se rechaza unimodalidad	0.080	Dip > 0.036 ($\alpha=0.05$) Se rechaza unimodalidad
P3 SUBCUTÁNEO	0.820	-1.710	0.308	Se rechaza unimodalidad	0.101	Dip > 0.036 ($\alpha=0.05$) Se rechaza unimodalidad
P4 SUBCUTÁNEO	0.811	-1.150	0.743	Se rechaza unimodalidad	0.062	Dip > 0.044 ($\alpha=0.05$) Se rechaza unimodalidad

*Valores de BC < 0.555 indican unimodalidad

Descriptivos estadísticos del depósito Subcutáneo para cada uno de los animales:

SUBCUTÁNEO	P1	P2	P3	P4
Mínimo (μm)	7.29	8.20	6.00	6.05
Máximo (μm)	129.77	211.38	146.49	166.81
Mediana (μm)	86.51	65.10	17.99	20.87
MODA 1 (μm)	11.46	15.16	10.95	12.87
MODA 2 (μm)	111.46	112.61	109.79	121.95
NADIR (μm)	28.12	43.01	30.71	53.77
% SOBRE NADIR	56.94	53.52	47.03	36.69
RATIO PEQUEÑOS/GRANDES	0.76	0.87	1.13	1.73

Gráficas de las distribuciones del tamaño de los adipocitos del depósito Subcutáneo

