

## Estudio de la expresión de polimorfismos de genes relacionados con la calidad de carne porcina

Lagadari, Mariana; Rodríguez, Viviana; Giudici, Vanesa; Jenko, Carolina; Acuña, Noelia; Martínez, Florencia M. A.; Maffioly, Agustin I.

**Autores:** Facultad de Ciencias de la Alimentación. Universidad Nacional de Entre Ríos. Monseñor Tavella 1450, E3202 BCJ, Concordia, Entre Ríos, Argentina.

**Contacto:** [mariana.lagadari@uner.edu.ar](mailto:mariana.lagadari@uner.edu.ar)

**ARK:** <http://id.caicyt.gov.ar/ark://bazgxr7j0>

### Resumen

La regulación diferencial de la abundancia de transcritos en el músculo afecta los procesos bioquímicos pos mortem de la maduración de la carne. El conocimiento de este vínculo funcional es de gran ayuda para la identificación de genes candidatos para la mejora de la calidad de la carne. El color es el indicador de apariencia más importante, ya que brinda la primera impresión visual del producto e influye directamente en las decisiones de compra. A su vez, es un rasgo cuantitativo complejo que está influenciado por numerosos genes y factores ambientales y se correlaciona con otras características de la calidad, como la merma (pérdida) por goteo y el pH. Los genes porcinos *NUDT7*, *PPARGC1A* y *CAST* se encuentran entre los varios genes cuya expresión está correlacionada con estos atributos. Por lo que, a fin de identificar procesos biológicos como marcadores para la merma por goteo y para el color en *M. Longissimus dorsi*, se analizarán las posibles relaciones entre polimorfismos de genes candidatos, su expresión y los atributos de calidad de la carne porcina.

**Palabras clave:** Calidad carne porcina; polimorfismo; genes candidatos; PCR cuantitativa.

## Objetivos propuestos y cumplidos

El objetivo general del presente trabajo es estudiar la relación entre la expresión de polimorfismos de genes candidatos para el color y la pérdida de agua, con los fenotipos observados. De esta manera, se buscará establecer patrones de divergencia de expresión génica que se utilicen como marcadores de calidad en cerdos de productores locales libres de Halotano.

Para alcanzar este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Poner a punto y establecer la técnica de PCR en Tiempo Real para el estudio de polimorfismos en genes con influencia en la calidad de carnes de cerdos.
- Analizar la variabilidad de los genes *NUDT7*, *CAST* y *PPARGC1A* en cerdos libres de Halotano de productores locales.
- Establecer la cuantificación de la expresión génica de los polimorfismos observados.
- Probar la asociación entre el nivel de expresión de los genes candidatos y los SNP observados con la calidad de la carne porcina en músculo (*Longissimus dorsi*).
- Orientar a los productores en la búsqueda de una mejor calidad de carne a partir de sus planteles reproductivos.

## Marco teórico y metodológico

Desde el inicio de la cría porcina a la actualidad, su finalidad fue cambiando según las necesidades de la población y las condiciones que el mercado fue exigiendo; actualmente, el objetivo es obtener carnes de mayor calidad al consumo (alto % magro, con buen sabor, color, terneza, etc.). La selección de genotipos en busca de un producto que brinde estas características trajo como consecuencia, la aparición de polimorfismos que deterioran la calidad de la carne, como los evidenciados para los genes Halotano y Rendement Napole. Con el avance de las investigaciones, no sólo se han encontrado variantes contraproducentes, sino también polimorfismos que influyen positivamente en las características organolépticas, que podrían ser utilizados para mejorar la producción.

Una gran variedad de herramientas moleculares y métodos estadísticos han sido empleados en el área de la mejora genética animal con el fin de conocer la base genética de la regulación de caracteres complejos, como son el crecimiento, la calidad de carne, la acumulación de grasa, la prolificidad, etc. Con la finalidad de aplicar estas técnicas en el área de calidad de los alimentos, el Laboratorio de Genética y Biología Molecular aplicada a los Alimentos (GENBIO-FCAL-UNER), viene trabajando en base a consideraciones previas con un número limitado de genes (genes candidatos), seleccionados por estar relacionados con el fenotipo vinculado a calidad de carne, que han permitido la comprensión biológica de las diferencias genéticas y fenotípicas observadas.

Los estudios de genes candidatos se enfocan en la caracterización de polimorfismos y la posterior asociación de genes que participan o están implicados en las vías de regulación de las variables de interés. Son estudios de tipos estructurales, centrados en las variaciones en la secuencia del ADN en genes como Halotano, Rendement Napole, Calpastatina y *SOX6*. Estos estudios utilizan marcadores RFLP, que permiten el genoti-

pado de marcadores tipo SNP (*Single Nucleotide Polimorphism*).

Aunque la calidad de la carne es difícil de definir con precisión, puede evaluarse mediante múltiples indicadores tecnológicos, incluyendo pH, color, capacidad de retención de agua (WHC), pérdida por goteo, textura, contenido de grasa intramuscular, potencial glucolítico (GP), así como por sabor, deterioro microbiano y contaminación. Entre estos atributos, el color es el indicador de apariencia más importante, ya que brinda la primera impresión visual del producto e influye directamente en las decisiones de compra.

El color de la carne es un rasgo cuantitativo complejo que está influenciado por numerosos genes y factores ambientales. El progreso reciente en genómica ha llevado a la identificación de más y más regiones cromosómicas, genes y mutaciones que subyacen a la variación fenotípica de los animales domésticos. Estos avances impulsan la aplicación de la selección asistida por marcadores (MAS) en el campo de la cría de animales. Además de la influencia ejercida por genes mayores como Rendement Napole (Fernández y Monin, 1994; Milán et al., 2000; Ciobanu et al., 2001) y Halotano (Fujii et al., 1991; Shen et al., 1992) surgen otros genes novedosos como *NUDT7*, también asociado con el color. *NUDT7*, gen que codifica para una enzima hidrolasa con motivo NUDIX (nucleósido difosfato vinculado a fracción-X), está asociado con la biosíntesis de hemo (Taniguchi et al., 2010a). Según se ha descrito, existe una relación entre la expresión de *NUDT7* y el contenido de hemo que explicaría la diferencia en el color de la carne de la raza de cerdo jabalí japonés y cerdos Large White, donde se observan diferencias en la eficiencia de transcripción de *NUDT7* (Taniguchi et al., 2010a). Este análisis incluyó la región promotora 5', donde se encontraron 3 SNPs en sitios de reconocimiento de factores de transcripción que podrían afectar la expresión. De esta manera, la diferencia de color observada en la población porcina evaluada podría deberse a la expresión diferencial de este gen. En otro trabajo del mismo grupo de investigación, la sobreexpresión de *NUDT7* condujo a la biosíntesis de hemo suprimida en mioblastos L6 de rata (Taniguchi et al., 2010b). Por lo tanto, *NUDT7* es un gen candidato posicional y funcional para el color de la carne porcina.

A su vez, el color de la carne de cerdo se correlaciona con otros atributos de la calidad: un color más claro se asocia con una mayor pérdida por goteo, una capacidad de retención de agua más pobre y una disminución del pH (Malek et al., 2001). Los genes porcinos como *PPARGC1A* y *CAST* han surgido también como candidatos funcionales y posicionales para características de la calidad (Gandolfi et al., 2011). *PPARGC1A* o *PGC1* alpha codifica para un coactivador transcripcional que regula la adipogénesis, diferenciación de adipocitos y biogénesis mitocondrial (Handschin y Spiegelman, 2006). Asimismo, este gen tiene un papel crucial en el metabolismo energético y la termogénesis adaptiva; está muy expresado en tejidos con alta demanda de energía, como músculo esquelético, tejido adiposo marrón, riñón e hígado (Puigserver y Spiegelman, 2003). En el músculo esquelético porcino, *PPARGC1A* se encuentra involucrado en la determinación del tipo de fibra muscular, promoviendo la conversión hacia fibras de tipo oxidativo (Lin et al., 2002). Debido a su papel en el metabolismo energético y en la determinación del tipo de fibras musculares, el gen *PPARGC1A* ha sido considerado candidato para la calidad de la carne (Erkens et al., 2010; Kim et al., 2010; Stachowiak et al., 2007). Este gen se ha mapeado en SSC8 p21 (Jacobs et al., 2006), dentro de una región en la que han sido detectados diferentes QTL que afectan los atributos

de la carne<sup>1</sup> y, junto con *CAPNS1* (codifica para la subunidad pequeña de calpaínas), se encuentran entre los varios genes cuya expresión esta correlacionada con la merma por goteo en cerdos (Ponsuksili et al., 2008a; Ponsuksili et al., 2008b; de Koning et al., 2001). Calpastatina (*CAST*) es un inhibidor endógeno de las calpaínas, responsable de la degradación de proteínas estructurales *post mortem* y juega un papel importante en el ablandamiento de la carne (Wendt et al., 2004). Se encontró que los polimorfismos de *CAST* estaban asociados con el color de la carne, el pH, el WHC y los parámetros de textura para el músculo LD y SM de la raza porcina Poland (Ropka-Molik et al., 2014). Además, en población porcina de Duroc-Landrace-Yorkshire los polimorfismos de *CAST* mostraron efectos sobre su expresión y la terneza del músculo LD (Lindholm-Perry et al., 2009).

La variabilidad en los rasgos de calidad de la carne, como la capacidad de retención de agua (CRA), es una gran preocupación tanto para la industria cárnica como para los consumidores. La pérdida de agua y componentes solubles ocurre durante el almacenamiento de la carne en diferentes niveles: es causada principalmente por encojimiento de miofibrillas debido a los cambios en el pH y la temperatura *post mortem* (Offer y Knight, 1988). La rápida disminución del pH mientras la temperatura muscular es aún alta provoca la desnaturalización de muchas proteínas, incluidas las que participan en la unión del agua. Las propiedades musculares determinadas genéticamente y los efectos ambientales influyen en el WHC y el cambio de velocidad del pH *post mortem*, aunque aún no se conoce exactamente como ocurre (Jennen et al., 2007; Lonergan y Lonergan, 2007).

La identificación de genes con expresión relacionada a estos atributos y la investigación sobre la regulación de su expresión, base de la genómica funcional, podrían proporcionar información sobre los procesos moleculares subyacentes a la calidad de la carne (Ponsuksili et al., 2007; Bernard et al., 2007). En este contexto, y ante la evidencia reciente de la expresión diferencial de ciertos genes candidatos, surge la necesidad de realizar estudios funcionales y/o de expresión de genes relacionados a la calidad de la carne.

Para el completo abordaje de los objetivos planteados, en una primera instancia se establecieron y pusieron a punto las diferentes técnicas que se utilizaron en los experimentos durante el proyecto de manera tal de obtener resultados confiables y reproducibles. Las metodologías implementadas en el transcurso del proyecto para responder a las actividades planteadas fueron las siguientes:

## 1. Colecta y manejo de muestras

Se obtuvieron muestras de animales sacrificados de forma industrial pertenecientes a establecimientos del noreste entrerriano, previamente marcados. A continuación, se colectaron en carnicería, con ayuda de personal experto, muestras de músculo *Longissimus dorsi* (costillas 9-11 de la media res derecha). Éstas fueron llevadas al laboratorio inmediatamente después del desposte, etiquetadas y empaquetadas para mantener su integridad y evitar su contaminación. De cada muestra se separó material para realizar extracción de ADN y ARN, y para llevar a cabo las determinaciones de calidad de carne. Si bien resulta complejo considerar cada uno de los factores que condicionan la cali-

1. [www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb](http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb)

dad de carne (factores ambientales, manejo de los animales previo a la faena, dieta, estado del ciclo estral, etc.) y considerando que las muestras provienen de un grupo de productores muy heterogéneo, el trabajo planteó ciertos factores controlados y constantes: peso al momento de la faena entre 90-120 kg, alimentación con balanceado (maíz, soja, núcleo; no pasturas) y con un manejo previo a la faena donde se priva a los cerdos de alimentos durante 12-18 horas, pero con acceso a agua y descanso.

## 2- Técnicas moleculares

- Extracción de ADN a partir de muestras de músculo: Se pesaron, en duplicados, entre 0,02 y 0,03 g de carne procesada previamente con mortero. Luego, cada muestra se resuspendió en buffer TE y se utilizó el método de bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB) ya establecido en el laboratorio (Rodríguez et al., 2022).

- PCR-RFLP: Se genotipificó cada muestra para los polimorfismos de los genes candidatos mediante PCR-RFLP. Se amplificó el gen o región de interés mediante PCR convencional. Luego de la amplificación, una alícuota del producto de PCR se digirió con enzimas de restricción, de acuerdo al protocolo del fabricante.

- Extracción de ARN de las muestras de *L. dorsi* y síntesis de cDNA: Se trabajó con cortes debidamente conservados como fuente de ARN, sumergidos en RNAlater y almacenadas a -80 °C, en duplicado. Con ayuda de un mortero y N<sub>2</sub> líquido se extrajo ARN total de músculo porcino por homogeneización con reactivo TransZol® (AP-Biotech), siguiendo el protocolo del fabricante. Luego, se cuantificó el ARN utilizando espectrofotometría UV/Visible a 260 nm y su integridad se evaluó mediante una corrida electroforética en un gel de agarosa al 1 %. El ARN se transcribió de forma inversa utilizando el kit comercial EasyScript First-Strand cDNA Synthesis Super Mix (Transgen, AP-Biotech) con un primer aleatorio oligo (dT)<sub>18</sub>.

- PCR en tiempo real: Para el análisis de expresión se llevó a cabo la qPCR utilizando el reactivo SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (BioRad). El protocolo para la qPCR se puso inicialmente a punto para *CAST* y *PPARGC1A* en particular, utilizando el equipo CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System. El diseño de los diferentes *primers* surgió del análisis de secuencias, la bibliografía y considerando las condiciones que optimizaron las reacciones. Se puso a punto además la reacción para diferentes genes *housekeeping*: *TBP* (TATA box binding protein, GenBank: DQ845178.1), *TOP2B* (DNA topoisomerase II beta, XM\_008266069.2) y *ACTB* (beta actina, GenBank: DQ178122).

## 3- Técnicas de determinación de calidad de carne

Se caracterizaron las muestras en cuanto al pH, color, humedad, terneza, y CRA. Estos análisis fueron llevados a cabo en el Laboratorio de Industrias Cárnicas (LIC) de la Facultad de Ciencias de la Alimentación (UNER), bajo la supervisión de la Dra. Romina Fabre.

- Determinación del pH: Se determinó el pH inicial sobre una sección adyacente a la 10<sup>a</sup> costilla a los 45 minutos de sacrificado el animal en el predio destinado a la matanza. Luego se realizó una segunda medición a las 24 horas. Las determinaciones se realizaron con el auxilio de un pHmetro portátil (Oakton, pH11) equipado con electrodo de vidrio de penetración (Oakton modelo 35805-18), registrándose un promedio de tres lecturas en distintos lugares de la misma sección.

- Determinación de color: Se determinó a las 24 horas luego del sacrificio, sobre una sección correspondiente a la 10ª costilla. Las muestras se dejaron oxigenar por 30 minutos y se realizaron las determinaciones por triplicado. Se empleó un equipo Minolta CM-700d, utilizando el espacio de color CIELAB (CIE, 1978), iluminante A y ángulo de observador de 2° (Bertram et al., 2000).

- Mermas de agua por goteo: Siguiendo a Honikel (1987), se determinó la merma de agua por goteo de una sección correspondiente a la 11ª costilla. Se midió la pérdida de peso del músculo escurriendo en una bolsa plástica a 4 °C, a las 24 y 48 horas *post mortem*. Se expresa en forma porcentual respecto del peso de la muestra fresca.

- Mermas por descongelación: 24 horas previas a la cocción, las muestras se colocaron en heladera a 4 °C y se determinó la merma por diferencia de peso.

- Mermas por cocción: Se procedió a la cocción de la carne siguiendo la metodología propuesta por el AMSA (2015). En un grill George Foreman se colocó una sección correspondiente a la 10ª costilla de aproximadamente 2 cm de grosor. Se colocó un sensor de temperatura en el centro geométrico del bife. Cuando la temperatura alcanzó 71 °C, se retiró del grill, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se pesó para determinar la merma. Son expresadas en porcentaje respecto del peso de los bifes previo a la cocción. La temperatura se monitoreó usando un múltiple registrador de temperatura (Yokogawa, mod. DX106-1-2).

- Humedad: Se determinó por desecación en estufa a 125 °C durante 4 horas, de acuerdo con el método 950.46 descrito por la AOAC (2007).

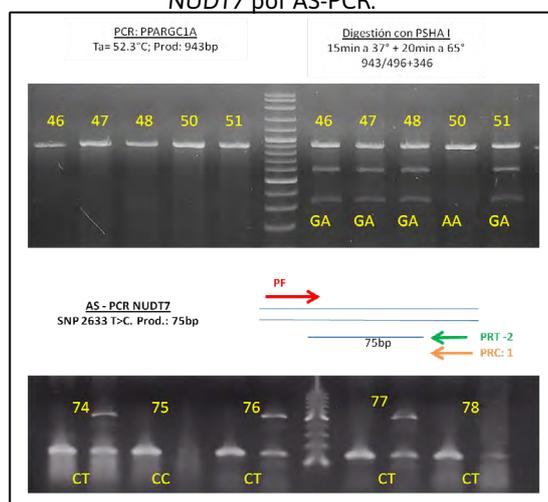
- Determinación de la terneza: Se evaluó la fuerza máxima de corte con el equipo Stable Micro Systems TA-XT2i, utilizando la célula Warner-Bratzler, sobre cilindros de 1,27 cm de diámetro cortados con la fibra paralela al eje longitudinal. Se determinó fuerza máxima de cizalla en kgf (AMSA, 2015) y se registró el valor medio de un mínimo de 8 cilindros extraídos de cada muestra. La muestra corresponde a una sección de la 10ª costilla cocida 24 horas antes.

## **Síntesis de resultados y conclusiones.**

Se sumaron 95 muestras de carne procedentes de la progenie de aquellos animales sometidos a análisis de variabilidad genética, previamente marcados, vigilando su trazabilidad hasta el momento de su faena y desposte, logrando conseguir las muestras una vez en las carnicerías. Esta tarea resultó ardua y para nada sencilla, por lo que el número de muestras se vio limitado a estas acciones y a la buena predisposición de los diferentes productores. Esto sumado a que las restricciones por la pandemia han impactado en la detección de actividades y la reticencia de muchos productores en recibir visitas a sus establecimientos. En la región en estudio, el noreste entrerriano, se encuentran establecimientos de pequeña y mediana escala con predominio de productores familiares que trabajan con un número de entre 3 y 10 madres que generalmente poseen cerdos criollos. Por otro lado, algunos pocos establecimientos de mayor envergadura trabajan con animales híbridos. Los animales considerados *criollos* son aquellos que no responden a una línea genética determinada, mientras que los llamados *híbridos* son líneas comerciales producto del cruzamiento de dos o más razas. Estos últimos pertenecen a establecimientos donde se cuentan con entre 20-80 madres. Parte del equipo de investigación participa del seguimiento de los animales a ser analizados y se encuentra en comunicación constante con los productores.

Se analizó la variabilidad de genes candidatos para calidad de carne como Hal/RYR1, RN/PRKAG3, CAST y SOX6 en las muestras de los diferentes establecimientos porcinos de la región noreste de la provincia de Entre Ríos. Estos genes presentaron una alta variabilidad genética a nivel de los marcadores RYR11843C>T, PRKAG3199I>V/200R>Q, CAST76872G>, CAST638C>A, SOX6A y SOX6B, un alto nivel de polimorfismo y heterocigosidad (Rodríguez et al., 2022). De este análisis se destaca una alta incidencia de los alelos perjudiciales de los genes mayores (T y RN) en las poblaciones analizadas, a pesar de que se han llevado a cabo muchas iniciativas para eliminar los alelos deletéreos de RYR1 y PRKAG3. Para aquellas muestras que resultaron libres de Halotano, se ha sumado el *screening* de los genes PPARGC1A y NUDT7. Para CAST, el genotipo CAST638C> fue analizado mediante PCR-RFLP como ya había sido establecido previamente. Para PPARGC1A, se procedió también mediante PCR-RFLP para el SNP c.2894A>G, mientras que para el análisis del SNP en el nucleótido 11850 del exón 2 de NUDT7 (11850T>C) se estableció una PCR alelo específica (AS-PCR) (Figura 1).

**Figura 1:** Patrones de bandas obtenidas para los polimorfismos observados en PPARGC1A por PCR-RFLP y para NUDT7 por AS-PCR.



Para el estudio de la expresión diferencial de los genes, en primer lugar se realiza la genotipificación de las muestras por PCR convencional para luego, mediante PCR en tiempo real, obtener los perfiles de transcripción y comprender así los procesos biológicos involucrados en la aparición de los fenotipos relacionados al color y a la merma por goteo. Hasta el momento, de las 95 muestras de carne obtenidas, 62 resultaron libres del alelo perjudicial t para Hal. Éstas fueron genotipificadas para CAST638A>C en su totalidad. CAST 638 Ser>Arg (EU137105.1:g.114650A>C) presentó tres genotipos: el homocigota CC con productos de restricción de 142 y 41 pb, el heterocigota AC con bandas de 183, 142 y 41 pb y el homocigota AA con bandas de 183pb, tal y como fue descrito por Ciobanu y col., (2004). Resta completar la genotipificación para PPARGC1A SNP C2894A>G, dado que para continuar con esta práctica es necesaria la compra de una nueva enzima de restricción PsHal, que se realizará en el próximo desembolso del PICT-2019-00867: "Estudio de la expresión de polimorfismos de genes candidatos para color y capacidad de retención de agua en carne porcina", dirigido por la Dra. Lagadari. Para NUDT7, se ha avanzado con la AS-PCR. Se han caracterizado 40 muestras, resultando presentes solo los genotipos CC y CT, por el momento. Debido a que, en su

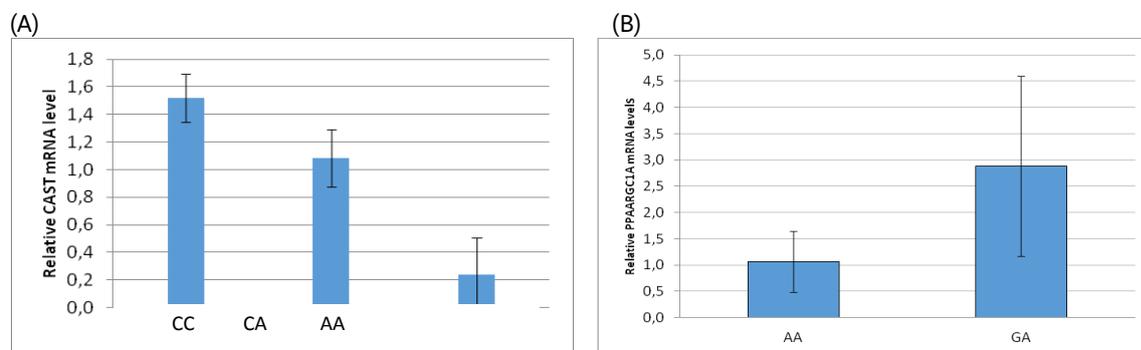
mayoría, las muestras analizadas representan el genotipo CC, se ha decidido la compra de una enzima sin actividad *proofreading* para corroborar estos resultados.

Se realizó exitosamente la puesta a punto de las técnicas para la cuantificación de la expresión génica de los genes candidatos, utilizando métodos actualizados y descritos en la literatura. Se instruyó a los becarios en cuanto a los protocolos, materiales, uso correcto de los reactivos y preservación de las muestras. En este sentido, se establecieron satisfactoriamente los protocolos de extracción de ARN y de la síntesis de ADN copia (cDNA) provenientes de las muestras de carne. También se han establecido los protocolos de PCR en tiempo real para *PPARGC1A* y *CAST*, como así también para los genes de referencia actina (*ACT*) y *TOP2B* (Topoisomerase [DNA] II beta), trabajando con SYBR® Green Master Mix, que contiene una molécula fluorescente de unión a ADN de doble cadena útil para rastrear el progreso de la amplificación de ADN en experimentos de PCR en tiempo real.

Se ha avanzado con los análisis de expresión sobre los genes *PPARGC1A* y *CAST*. Para estos, como material de partida se obtuvo ADNc de cada muestra libre de Halotano. Luego, se determinó la eficiencia de la qPCR del gen de interés (*target*) y el gen de referencia (*housekeeping*) para la validación de los ensayos de qPCR y los genes de referencia *ACT* y *TOP*. En la Figura 2 se presentan los resultados representativos de tres experimentos independientes para los polimorfismos *CAST638S>A* y para el SNP *C2894A>G* de *PPARGC1A*. Estos resultados son preliminares, dado que hasta el momento no se obtienen suficientes muestras representativas de cada genotipo libres del alelo perjudicial de Hal. Para el caso de *CAST638S>A* -SNP en el gen *CAST* (accesión del GeneBank EU137105), p. Ser638Arg, que corresponde a una sustitución *A>C* a nivel de nucleótidos (Ciobanu et al., 2004)- los resultados preliminares de los estudios de expresión diferencial sugerirían diferencias en el nivel de expresión de los tres genotipos de los alelos de *CAST638S>A* (Figura 2A) para animales libres de Hal. Donde el genotipo AA presentaría menores niveles de ARNm, lo que podría pensarse en una menor expresión y cantidad de la enzima *CAST*, que se traduciría en una mayor actividad de calpaína y por ende generaría carnes menos firmes (valores de RC bajos). El registro bibliográfico indica que el polimorfismo *CAST638C>A* afecta los parámetros de textura, firmeza e integridad, el pH y la CRA (Ciobanu et al., 2004; Ropka -Molik et al., 2014; Piorkowska et al., 2018). Nuestros resultados obtenidos para la población del noreste entrerriano son concordantes y vincularían al SNP *CAST638C>A* con el pH, las mermas por descongelación, la humedad y el marmoleado (manuscrito en preparación). Los mismos solo fueron evaluados para los polimorfismos AC y CC, debido a que el polimorfismo AA se encuentra representado en la población por una única muestra y no fue posible incorporarlo hasta el momento en las pruebas estadísticas. Según describen Ciobanu y col. (2004), la variación Ser638Arg podría afectar a una secuencia consenso de reconocimiento de PKA (proteína quinasa dependiente de adenosin cíclica 3', 5'-monofosfato), en la fosforilación de *CAST* por la enzima que es responsable de fosforilar a *CAST*. La solubilidad y la localización celular de la calpastatina están influidas por esta fosforilación de la PKA (Averna et al., 2001). Adachi et al. (1991) mostraron que la fosforilación aumentaba la proporción de *CAST* unida a las membranas y Salamino et al. (1997) demostraron que la fosforilación disminuía la eficacia inhibidora de *CAST*. Por lo tanto, la fosforilación de la calpastatina podría influir en la proteólisis y, en última instancia, tener un efecto sobre la terneza y otros rasgos de calidad de la carne. Los genotipos 638Arg/638Arg se asociaron con una menor firmeza (Ciobanu et

al., 2004), lo que iría en concordancia con lo que se observa en los ensayos preliminares de expresión diferencial de los alelos para este SNP. Aunque sólo existe un único gen de calpastatina en humanos, cerdos, ratones y bovinos, se han identificado más de ocho isoformas en los tejidos de estos organismos, lo que sugiere diferentes niveles de traducción desde el promotor o mecanismos alternativos de *splicing*. Estos hallazgos sugieren que las diferencias en la terneza de la carne, explicadas por los marcadores genéticos, podrían ser una consecuencia de la alteración en los niveles de ARNm, actividad, velocidad y/o extensión de la proteólisis *post mortem* en el músculo. Según Gandolfi y col. (2011), la expresión media de la calpastatina es mayor en el músculo con alta fuerza de cizallamiento, es decir, en carnes firmes. La fuerte correlación entre la actividad de la calpastatina y la terneza ha sido bien descrita (Kemp et al., 2010), pero nunca se ha informado de una relación clara entre la expresión génica y la terneza. La expresión del gen CAST podría ser un factor que regula la actividad de la calpastatina, y este análisis de la expresión génica podría proporcionar información sobre la terneza de la carne de cerdo. Se está trabajando activamente para ampliar y reproducir estos datos preliminares para obtener evidencias estadísticamente significativas que permitan una mayor comprensión de este vínculo funcional.

**Figura 2:** Comparación de los niveles de expresión de ARNm del gen porcino (A) CAST en CAST638S>A (B) PPARGC1A en SNP c.2894A>G. Se utilizó un análisis cuantitativo de PCR en tiempo real para determinar los niveles de expresión del ARNm de los genes en el músculo *Longissimus thoracis* de animales de cada indicado genotipo. Los ARNm se normalizaron con los de ACT y se compararon entre los diferentes genotipos. Todos los valores se expresados como media  $\pm$  error estándar de la media de dos experimentos independientes. (A) Nivel de ARNm de CAST en relación con los valores de Ct del genotipo *wild type*. (B) Nivel de ARNm de PPARGC1A en relación con los valores de Ct del genotipo *wild type*.



Además, se evaluó el gen *PPARGC1A*, que ha surgido también como candidato funcional y posicional para características de la calidad (Gandolfi et al., 2011). *PPARGC1A* o *PGC1* alpha codifica para un coactivador transcripcional que regula la adipogénesis, diferenciación de adipocitos y biogénesis mitocondrial (Handschin y Spiegelman, 2006). Asimismo, este gen tiene un papel crucial en el metabolismo energético y la termogénesis adaptativa, está muy expresado en tejidos con alto demanda de energía, como músculo esquelético, tejido adiposo marrón, riñón e hígado (Puigserver y Spiegelman, 2003). En el músculo esquelético porcino, *PPARGC1A* se encuentra involucrado en la determinación del tipo de fibra muscular, promoviendo la conversión hacia fibras de tipo oxidativo (Lin et al., 2002). En este contexto, se evalúa el polimorfismo c.2894A>G de *PPARGC1A* que ha sido reportado por Kim y col. con efectos significativos en la composición de las fibras musculares, mostrando el genotipo GG una mayor composición del número de fibras tipo I que el genotipo AG, mientras que el porcen-

taje de fibras tipo IIb de los animales con el genotipo GG fue menor (Kim et al., 2012). Estos resultados estuvieron relacionados con los rasgos de calidad de la carne, como el pH del músculo, donde el genotipo GG presentaba una mejor calidad de la carne. En la población en estudio, si bien aún no se ha caracterizado el total de las muestras para este gen, hasta el momento sólo se encuentran animales GA y AA para C2894A>G. Este polimorfismo que se encuentra presente en la región 5' *upstream* podría afectar a la expresión del ARNm del gen *PPARGC1A*, la formación del tipo de fibra muscular, composición de la fibra muscular y, posteriormente, la calidad de la carne. Según los resultados preliminares observados en los análisis de expresión, la presencia del alelo G se relacionaría con una mayor expresión de *PPARGC1A*, como fue sugerido por Kim y col. en poblaciones de cerdos Yorkshire y Landrace de Corea. Nuevamente, estos resultados son preliminares y es necesario evaluar un mayor número de muestras en búsqueda del genotipo GG.

Resulta necesario obtener nuevas muestras en búsqueda de genotipos GG para CAST638C>A así como GG para C2894A>G *PPARGC1A*. Luego de logrado y evidenciado los tres genotipos correspondientes a los genes candidatos analizados, se determinará la relación de la expresión de polimorfismos de genes relacionados con el color y la capacidad de retención de agua en carne porcina con fenotipos observados también en poblaciones porcinas del noreste entrerriano.

### Indicadores de producción

- I) La Dra. Rodríguez ha obtenido el título de Dra. en Ingeniería, área Ciencia y Tecnología de los Alimentos con su tesis: "Estudio de polimorfismos de ADN asociados a calidad de carne en cerdos híbridos", bajo la dirección de la Dra. Mariana Lagadari, obteniendo una clasificación de 10 Sobresaliente. Además obtuvo el pasado julio 2022 una beca de Posdoctorado Cofinanciada UNER-CONIET. Análisis de la expresión diferencial de genes candidatos para atributos de calidad de carne. Obtención de beca posdoctoral cofinanciada CONICET-UNER. Directora: Dra. Lagadari, Mariana.
- II) Publicaciones en revistas científicas con referato
  - Rodríguez, V.R., Maffioly, J.I., Zdanovicz, L.A., Fabre, R., Barrandeguy, M.E., García, M.V., Lagadari, M. (2022). Genetic diversity of meat quality related genes in Argentinean pigs. *Veterinary and Animal Science*, 15(100237), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2022.100237>
  - Rodríguez, V., Maffioly, J., Martínez, F.M.A., Jenko, C., Fabre, R., Lagadari, M. (2020). Análisis de polimorfismos en los genes *Sox6* y *Ryr1* y su relación con la calidad de carne de cerdo. *Ciencia, Docencia y Tecnología*, 31(60), 228-241. <https://doi.org/10.33255/3160/777>
  - Lagadari, M., Fabre, R., Jenko, C., Rodríguez, V. (2019). Caracterización de polimorfismos de genes candidatos para mejora de calidad de carne porcina. *Suplemento Ciencia, Docencia y Tecnología*, 9, 110-121.
- III) Presentaciones a congresos nacionales e internacionales.
- IV) Un premio a trabajo presentado en Congreso: Premio AATA 50 años. Mejor trabajo de investigación y desarrollo en tecnología de Alimentos en el marco del XXI Congreso Latinoamericano y del Caribe de Ciencia y Tecnología de Alimentos, XVII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos CYTAL-ALACCTA 2019.

## Bibliografía

- Adachi, Y., Ishida-Takahashi, A., Takahashi, C., Takano, E., Murachi, T. y Hatanaka, M. (1991). Phosphorylation and sub-cellular distribution of calpastatin in human hemopoietic cells. *J. Biol. Chem.*, 266(6), 3968–3972.
- AMSA (2015). *Research Guidelines for Cookery, Sensory Evaluation, and Instrumental Tenderness Measurements of Meat*. Savoy: AMSA.
- Averna, M., De Tulio, R., Passalacqua, M., Salamino, F., Pontremoli, S. y Melloni, E. (2001). Changes in intracellular calpastatin localization are mediated by reversible phosphorylation. *Biochem. J.*, 354(Pt 1), 25–30.
- Bernard, C., Cassar-Malek, I., Le Cunff, M., Dubroeuq, H., Renand, G. y Hocquette, J. F. (2007). New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. *J. Agric. Food Chem.*, 55(13), 5229–37.
- Bertram, H.C., Petersen, J.S. y Andersen, H.J. (2000). Relationship between RN (-) genotype and drip loss in meat from Danish pigs. *Meat Sci.*, 56(1), 49–55.
- Ciobanu, D.C., Bastiaansen, J.W., Lonergan, S.M., Thomsen, H., Dekkers, J.C., Plastow, G.S. y Rothschild, M.F. (2004). New alleles in calpastatin gene are associated with meat quality traits in pigs. *J Anim Sci.*, 82(10), 2829–39.
- Ciobanu, D., Bastiaansen, J., Malek, M., Helm, J., Woollard, J., Plastow, G. y Rothschild, M. (2001). Evidence for new alleles in the protein kinase adenosine monophosphate-activated gamma(3)-subunit gene associated with low glycogen content in pig skeletal muscle and improved meat quality. *Genetics*, 159(3), 1151–1162.
- de Koning, D. J., Harlizius, B., Rattink, A. P., Groenen, M. A., Brascamp, E. W. y van Arendonk, J. A. (2001). Detection and characterization of quantitative trait loci for meat quality traits in pigs. *Journal of Animal Science*, 79(11), 2812–2819.
- Erkens, T., De Smet, S., Van den Maagdenberg, K., Stinckens, A., Buys, N., Van Zeveren, A. y Peelman, L.J. (2010). Association analysis of PPARGC1A mutations with meat quality parameters in a commercial hybrid pig population. *Czech Journal of Animal Science*, 55(5), 200–208.
- Fernández, X. y Monin, G. (1994). A major gene affecting pork quality: The RN gene. *Meat Focus Int.*, 3(8), 332–334.
- Fujii, J., Otsu, K., Zorzato, F., de Leon, S., Khanna, V.K., Weiler, J.E., O'Brien, P.J. y MacLennan, D.H. (1991). Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science.*, 253(5018), 448–51.
- Gandolfi, G., Cinar, M. U., Ponsuksili, S., Wimmers, K., Tesfaye, D., Looft, C., Jüngst, H., Tholen, E., Phatsara, C., Schellander, K. y Davoli, R. (2011). Association of PPARGC1A and CAPNS1 gene polymorphisms and expression with meat quality traits in pigs. *Meat Sci*, 89(4), 478–85.
- Handschin, C. y Spiegelman, B. M. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocrine Reviews*, 27(7), 728–735.
- Honikel, K.O., Kim, C.J., Hamm, R. y Roncales, P. (1986). Sarcomere shortening of prerigor muscles and its influence on drip loss. *Meat Sci.*, 16(4), 267–282.
- Jacobs, K., Rohrer, G., van Poucke, M., Piumi, F., Yerle, M., Barthenschlager, H., Mattheeuws, M., Van Zeveren, A. y Peelman, L. J. (2006). Porcine PPARGC1A (peroxisome proliferative activated receptor gamma coactivator 1A): Coding sequence, genomic organization, polymorphisms and mapping. *Cytogenetic and Genome Research*, 112(1–2), 106–113.

- Jennen, D. G. J., Brings, A. D., Liu, G., Juengst, H., Tholen, E., Jonas, E., Tesfaye, D., Schellander, K. y Phatsara, C. (2007). Genetic aspects concerning drip loss and water-holding capacity of porcine meat. *J. Anim. Breed. Genet.*, 124(Supl. 1), 2-11.
- Kaić, A., Škorput, D. y Luković, Z. (2009). Carcass quality of crossbred pigs with Pietrain as a terminal sire. *Ital.J.Anim.Sci.*, 8(Suppl. 3), 252-254.
- Karlsson, A. H., Klont, R.E. y Fernandez, X. (1999). Skeletal muscle fibres as factors for pork quality. *Livestock Production Science*, 60(2 - 3), 255-269.
- Kemp, M. C., Sensky, P.L., Bardsley, R.G., Buttery, P. J. y Parr, T. (2010). Tenderness - An enzymatic view. *Meat Sci.*, 84(2), 248-256.
- Kim, J. M., Lee, K. T., Lim, K. S., Park, E. W., Lee, Y. S. y Hong, K. C. (2010). Effects of p. C430S polymorphism in the PPARGC1A gene on muscle fibre type composition and meat quality in Yorkshire pigs. *Animal Genetics*, 41(6), 642-645.
- Klont, R.E., Brocks, L., Eikelenboom, G. (1998). Muscle fibre type and meat quality. *Meat Science*, 49(Supl. 1), S219-S229.
- Lin, J., Wu, H., Tarr, P. T., Zhang, C. Y., Wu, Z., Boss, O., Michael, L. F., Puigserver, P., Isotani, E., Olson, E. N., Lowell, B. B., Bassel-Duby, R. y Spiegelman, B. M. (2002). Transcriptional co-activator PGC-1 drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*, 418(6899), 797-801.
- Lindholm-Perry, A. K., Rohrer, G. A., Holl, J. W., Shackelford, S. D., Wheeler, T. L., Koohmaraie, M. y Nonneman, D. (2009). Relationships among calpastatin single nucleotide polymorphisms, calpastatin expression and tenderness in pork longissimus. *Anim Genet*, 40(5), 713-721.
- Lonergan, E. H. y Lonergan, S. M. (2007). New frontiers in understanding drip loss in pork: recent insights on the role of postmortem muscle biochemistry. *J. Anim. Breed. Genet.*, 124(Supl. 1), 19-26.
- Malek, M., Dekkers, J. C., Lee, H. K., Baas T. J., Prusa, K., Huff-Lonergan E. y Rothschild M. F. (2001). A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig. II. Meat and muscle composition. *Mammalian Genome*, 12(8), 637-45.
- Milan, D., Jeon, J. T., Looft, C., Amarger, V., Robic, A., Thelander, M., Rogel-Gaillard, C., Paul, S., Lannuccelli, N., Rask, L., Ronne, H., Lundstrom, K., Reinsch, N., Gellin, J., Kalm, E., Leroy, P., Chardon, P. y Andersson, L. (2000). A mutation in PRKAG3 associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle. *Science*, 288(5469), 1248-1251.
- Offer, G. y Knight, P. (1988). The structural basis of water-holding in meat. Part 2. Drip losses. En R. Lawrie (ed.), *Developments in meat science*, Vol. 4 (p. 173). Elsevier Applied Science: Londres.
- Piórkowska, K., Żukowski, K., Ropka-Molik, K., Tyra, M. y Gurgul, A. (2018). A comprehensive transcriptome analysis of skeletal muscles in two Polish pig breeds differing in fat and meat quality traits. *Genet Mol Biol.*, 41(1), 125-136.
- Ponsuksili, S., Jonas, E., Murani, E., Phatsara, C., Srikanchai, T., Walz, C., Schwerin, M., Schellander, K. y Wimmers, K. (2008a). Trait correlated expression combined with expression QTL analysis reveals biological pathways and candidate genes affecting water holding capacity of muscle. *BMC Genomics*, 9, 367.
- Ponsuksili, S., Murani, E., Phatsara, C., Jonas, E., Walz, C., Schwerin, M., Schellander, K. y Wimmers, K. (2008b). Expression profiling of muscle reveals transcripts differentially expressed in muscle that affect water-holding capacity of pork. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 10311-10317.

- Ponsuksili, S., Murani, E., Walz, C., Schwerin, M. y Wimmers, K. (2007). Pre- and postnatal hepatic gene expression profiles of two pig breeds differing in body composition: insight into pathways of metabolic regulation. *Physiol. Genomics*, 29(3), 267-279.
- Puigserver, P. y Spiegelman, B. M. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocrine Reviews*, 24(1), 78-90.
- Rodríguez, V. R., Maffioly, J. I., Zdanovicz, L. A., Fabre, R. M., Barrandeguy, M. E., García, M. V. y Lagadari, M. (2022). Genetic diversity of meat quality related genes in Argentinean pigs. *Veterinary and Animal Science*, 15, 100237.
- Ropka-Molik, K., Bereta, A., Tyra, M., Rozycki, M., Piorkowska, K., Szyndler-Nedza, M. y Szmatola, T. (2014). Association of calpastatin gene polymorphisms and meat quality traits in pig. *Meat Sci.*, 97(2), 143-150.
- Salamino, F., Aversa, M., Tedesco, I., DeTillio, R., Melloni, E. y Pontremoli, S. (1997). Modulation of rat brain calpastatin by post translational modifications. *FEBS Lett.*, 412(3), 433-8.
- Shen, H., Lahucky, R., Kovac, L., O' Brien, P. J. (1992). Comparison of Hal gene status with <sup>31</sup>P NMR-determined muscle metabolites and with Ca sequestration activity of anoxia - challenged muscle from pigs homozygous and heterozygous for porcine stress syndrome. *Pig News and Information*, 13, 105-109.
- Stachowiak, M., Szydlowski, M., Cieslak, J. y Switonski, M. (2007). SNPs in the porcine PARGC1a gene: interbreed differences and their phenotypic effects. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 12(2), 231-239.
- Taniguchi, M., Hayashi, T., Nii, M., Yamaguchi, T., Fujishima-Kanaya, N., Awata, T. y Mikawa, S. (2010a). Fine mapping of quantitative trait loci for meat color on Sus scrofa chromosome 6: analysis of the swine NUDT7 gene. *J Anim Sci.*, 88(1), 23-31. Taniguchi, M., Hayashi, T., Nii, M., Yamaguchi, T., Fujishima-Kanaya, N., Awata, T. y Mikawa, S. (2010b). Overexpression of NUDT7, a candidate quantitative trait locus for pork color, downregulates heme biosynthesis in L6 myoblasts. *Meat Sci.*, 86(3), 728-732.
- Wendt, A., Thompson, V. F., Goll, D. E. (2004). Interaction of calpastatin with calpain: a review. *Biol Chem.*, 385(6), 465-472.

**PID 8107 Denominación del Proyecto**  
ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE POLIMORFISMOS DE GENES RELACIONADOS CON LA CALIDAD DE CARNE PORCINA

**Directora**  
LAGADARI, Mariana

**Unidad de Ejecución**  
Universidad Nacional de Entre Ríos

**Dependencia**  
Facultad de Ciencias de la Alimentación

**Contacto**  
[mariana.lagadari@uner.edu.ar](mailto:mariana.lagadari@uner.edu.ar)

**Cátedra/s, área o disciplina científica**  
Laboratorio de Genética y Biología molecular aplicada a los Alimentos, (GEN-BIO-FCAL-UNER) Biología. Biología Molecular, Genética.

**Integrantes del proyecto**  
Integrantes docentes: Rodríguez, Viviana; Giudici, Vanesa; Jenko, Carolina; Acuña, Noelia. Becaria: Martínez, Florencia Maria Antonella. Becario CIN: Maffioly, Agustín Ignacio

**Fechas de iniciación y de finalización efectivas**  
01/02/2019 y 31/08/2022  
Aprobación del Informe Final por Resolución C.S. N° 296/23 (01/09/2023)