

## **Caracterización genotípica de cerdos para mejora de la calidad de carne**

*Lagadari, Mariana; Fabre, Romina M.; Jenko, Carolina; Markiewicz, Guillermo A.; Rodriguez, Viviana R.*

AUTORES: Facultad de Ciencias de la Alimentación. Universidad Nacional de Entre Ríos. (Concordia, Entre Ríos, Argentina).  
CONTACTO: [lagadarim@fcal.uner.edu.ar](mailto:lagadarim@fcal.uner.edu.ar) - [mlag2@hotmail.com](mailto:mlag2@hotmail.com)

### **Resumen**

Dado el impulso que está experimentando la producción y el consumo de carne porcina resulta de suma trascendencia elaborar estrategias que favorezcan una mejora en su calidad. En este contexto se plantea como objetivo general implementar la biología molecular como herramienta de selección a través de la búsqueda de relaciones entre marcadores moleculares y caracteres relacionados a los atributos de la carne. De esta manera es posible la detección directa de mutaciones en genes con efectos perjudiciales sobre la calidad de carne como las descritas para los genes de Halotano, Rendement Napole y Calpastatina. En este trabajo se evaluó la condición genética de cerdos de pequeños y medianos establecimientos del noreste entrerriano mediante el uso de PCR-RFLP. Los resultados evidencian una alta incidencia de los alelos perjudiciales encontrándose mayormente representados en genotipos heterocigotas. A través de la eliminación de individuos portadores de los alelos desfavorables del plantel reproductivo, el uso de esta herramienta permite brindar al mercado carnes jugosas, de buen color y con buena textura para satisfacer la demanda de carne fresca de los consumidores.

**Palabras clave:** marcadores moleculares, calidad de carne porcina, Halotano, Rendement Napole, Calpastatina

## Objetivos propuestos y cumplidos

En este proyecto se plantea como objetivo general implementar la biología molecular como herramienta de selección a través de la búsqueda de relaciones entre marcadores nucleicos y caracteres relacionados a la calidad de la carne porcina.

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

- Caracterizar poblaciones de cerdos de productores locales, en cuanto a la diversidad genética de genes candidatos, particularmente los genes Halontano, Rendement Napole y Calpastatina, asociados a características productivas y de calidad de producto en porcinos mediante el uso de marcadores moleculares.
- Establecer la frecuencia alélica así como la variabilidad del gen Hal, RN y CAST en cerdos.
- Establecer la incidencia de los genes Hal, RN y CAST en la calidad de carnes de cerdos.
- Establecer un servicio de identificación y diagnóstico a partir de muestras de pelos de animales reproductores

El completo abordaje de estos objetivos, permitió la correcta orientación a los productores para un uso apropiado de las razas/líneas a ser utilizadas en programas de cruzamientos para aprovechar los efectos de complementariedad y heterosis derivados de las diferencias genéticas entre poblaciones. A su vez, permite sentar las bases para la búsqueda e identificación de nuevos marcadores moleculares relacionados con los atributos de la carne de manera de optimizar la aceptabilidad del producto en cada mercado específico.

## Marco teórico y metodológico

El crecimiento del sector porcino en Argentina es contundente y actualmente presenta un escenario favorable con un gran potencial de crecimiento. Durante el 2017, la faena superó los 6 millones de cabezas según datos brindados por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). Contribuyendo al crecimiento del sector observado en los últimos cinco años donde la faena se incremento un 68%, la producción de cerdo un 70% y el consumo interno un 64% (extraído de [www.elsitoporcino.com.ar](http://www.elsitoporcino.com.ar)). Los sistemas de producción que prevalecen son aquellos de pequeña y mediana escala productiva (10 a 200 madres).

Dada la importancia entonces del incremento de la producción y del consumo de la carne porcina en favor del desarrollo social y económico del país, este trabajo busca contribuir al sector porcino acercando estrategias que favorezcan una mejora en la calidad de estas carnes. La definición de calidad de carne depende de percepciones subjetivas del consumidor quien no solamente está exigiendo un alto contenido magro en las canales porcinas y en especial en las piezas más costosas como los lomos y pernils (jamones), sino también que el producto reúna una serie de características que permitan producir una calidad superior con el mejor rendimiento. Además, el concepto calidad está relacionado a componentes sensoriales, nutricionales, higiénicos, tecnológicos y genéticos como así también a factores del metabolismo celular que influyen en los atributos de la carne. Por lo tanto, ante las mayores exigencias del mercado, la industria de la carne de cerdo debe abarcar todos los puntos que constituyen la cadena de producción (Chan et al., 1997; Suman et al., 2007; Faustman et al., 1998; Chan et al., 1998; Vestergaard et al., 2000).

La carga genética de los animales de las granjas porcinas es un factor fundamental que condiciona la eficiencia técnica y económica, incide en las características cuantitativas y en los caracteres físico-químicos y sensoriales de la carne. A través de herramientas propias de la genética y biología molecular, se han detectado genes que poseen efectos directos sobre estos atributos de calidad, muchos de los cuales

son utilizados como marcadores moleculares. Entre ellos se encuentra el gen de Halontano (Hal), gen ubicado en el cromosoma 6 porcino que codifica para el receptor de liberación de calcio en el músculo esquelético, también denominado RYR1 (Bastos et al., 2001). El gen Hal tiene efectos pleiotrópicos sobre diferentes caracteres de producción. Cierta constitución alélica de éste fue ampliamente difundida en Argentina por sus efectos deseables sobre el magro y la apariencia hipermusculada de los cerdos. Sin embargo, también se conoce que ciertos polimorfismos de este gen manifiestan acciones perjudiciales sobre los distintos caracteres de calidad de carne. La detección de la mutación no sinónima C1843T del gen de Hal donde en el nucleótido 1843 se reemplaza una citosina por una timina (C1843T) produce carnes PSE (Fujii et al., 1991; Shen et al., 1992). Las carnes PSE (de sus siglas en inglés pale, soft, exudative) son carnes pálidas, blandas y exudativas consideradas de menor calidad y de menor valor para procesos industriales (Schilling et al., 2003; Cassens 1999). El gen Hal se encuentra relacionado con el incremento en el metabolismo causado por el estrés, las carnes tienen una tasa rápida de glucólisis post-mortem que da lugar además a una disminución muy rápida del pH (por debajo de 5.5-5.8) en la primera hora luego del sacrificio (Guardia et al. 2004). El descenso en el pH junto a la elevada temperatura muscular se traduce en la desnaturalización de proteínas que produce un aumento en la pérdida de agua y palidez. Además, otra consecuencia de carnes PSE es la condición bicolor de los jamones, músculos claros y oscuros, que los desvalorizan para su industrialización. El desencadenamiento de carnes PSE está afectado también por factores ambientales - temperatura, humedad, tiempo de transporte, ayuno, densidad - cuando los animales son sometidos a factores estresantes antes de su sacrificio (Bastos et al., 2001; Marini et al., 2012). Esta mutación puntual en el gen Hal es causa del Síndrome de Estrés Porcino (SEP) o Síndrome de Hipertermia Maligna, síndrome que fue descubierto en la década de los 70s donde la selección por caracteres observables era la que prevalecía. Se detectó que los resultados de una selección de animales hipermusculados iban unidos a una alta tasa de mortalidad por estrés (Calvo et al., 1997; Otsu et al., 1992). Razas como Pietrain, Poland China y Landrace con características magras y con gran desarrollo muscular, implicaban animales portadores del SEP. El SEP se ha descrito como una enfermedad hereditaria autosómica recesiva (Christian, 1972). Cuando los cerdos homocigotas recesivos (tt) son expuestos a situaciones de estrés, como situaciones traumáticas durante el manejo de los animales o previas a la faena, puede desencadenarse la muerte súbita del animal y la generación de carnes PSE (Harrison, 1981). A pesar de presentar una disminución de la grasa dorsal y mayor porcentaje de carne magra, los animales heterocigotas (Ct) también producen carnes de menor calidad. La baja capacidad de retención de agua y la palidez de las carnes en cerdos portadores de la mutación, consecuencias de un bajo pH y elevada temperatura muscular, exteriorizan un fenotipo intermedio entre el homocigota para la mutación y el homocigota portador de alelos normales (Silveira et al., 2011).

Otro gen que presenta polimorfismos con efecto negativo en la calidad de la carne es el denominado Rendement Napole (RN) o efecto Hampshire (Naveau et al., 1986). El gen RN se asocia con la acidez de la carne de cerdo y su nombre se debe a que causa una disminución en el rendimiento tecnológico de la carne (Fernández & Monin, 1994). Este gen que se ubica en el cromosoma 15 del cerdo, codifica para la subunidad gama de la PRKAG3, Proteína Quinasa activada por AMP (Milán et al. 1995). Se han descrito dos mutaciones en este gen: una sustitución de una arginina (R) por una glutamina (Q) en la posición número 200 de la secuencia (R200Q) detectado en cerdos con algún componente de la raza Hampshire (Milan et al., 2000) y una sustitución de valina (V) por una isoleucina (I) generándose la mutación V199I encontrada en cerdos de diferentes razas (Ciobanu et al., 2001). Con estas dos mutaciones se presentan tres alelos para el gen RN: RN<sup>-</sup> (199V/200Q), rn<sup>+</sup> (199V/200R) y rn<sup>\*</sup> (199I/200R) y se observan seis posibles genotipos RN<sup>-</sup>/RN<sup>-</sup>, RN<sup>-</sup>/rn<sup>+</sup>, RN<sup>-</sup>/rn<sup>\*</sup>, rn<sup>+</sup>/rn<sup>+</sup>, rn<sup>+</sup>/rn<sup>\*</sup> y rn<sup>\*</sup>/rn<sup>\*</sup> (Josell et al., 2003; Lindhal et al., 2004). Los tres alelos resultantes de la combinación de las mutaciones V199I y R200Q en el locus RN afectan parámetros de calidad de carne importantes para su industrialización. El alelo dominante RN<sup>-</sup> es responsable del menor valor tecnológico debido a una menor concentración proteica de la carne

y a un mayor contenido de glucógeno en músculo (>70% que el contenido normal). Este alto potencial glucolítico resulta en un pH final muy bajo. La menor concentración proteica junto a la desnaturalización por pH resulta en carne con muy poca capacidad de retención de agua aunque el color y la ternura puedan ser las adecuadas (Ellis et al., 1997). Sin embargo, hembras el alelo  $rn^*$  manifiestan un bajo contenido de glucógeno y cuando este último conforma genotipos que no acarrean  $RN^-$ , es responsable de un alto pH final de la carne (Josell et al 2003, Lindhal et al 2004).

El gen de la Calpastatina (CAST) se localiza en el cromosoma 2 porcino y se lo ha relacionado con la ternura de la carne (Ciobanu et al., 2004). Existen evidencias que indican que en diferentes especies, la actividad de la calpastatina post-mortem está altamente relacionada con la ternura de la carne (Koochmaraie et al., 1991). Sobre la base de la función de este gen, CAST es también considerado un marcador molecular para la calidad de la carne. El enternecimiento post-mortem de la carne se produce por la degradación de las proteínas miofibrilares, que conduce a una desorganización de la estructura del tejido. Este proceso es llevado a cabo por el complejo enzimático calpaínas - calpastatina. CAST es un inhibidor específico de las calpaínas y éstas son proteasas que degradan las proteínas miofibrilares (Koochmaraie et al., 1992) y entre ellas la  $\mu$ -calpaína es la principal responsable del enternecimiento. La calpastatina inhibe la actividad enzimática de la  $\mu$ -calpaína y por lo tanto la tenderización post-mortem (Kent et al., 2004). Resulta entonces que este sistema calpaína-calpastatina juega un papel importante en la calidad de la carne, entre muchos otros de su sensibilidad, capacidad de retención de agua y la ternura (Geesink y Koochmaraie 1999; Melody et al, 2004, Krzeczio et al 2008). La solubilidad y localización celular de la calpastatina está determinada por su fosforilación por parte de la enzima Proteína Quinasa A (PKA) (Averna et al., 2001). La fosforilación de CAST aumenta la proporción de CAST unida a membrana y también disminuye su capacidad inhibitoria (Adachi et al., 1991; Salamino et al., 1997). De esta manera la fosforilación de CAST podría tener un efecto sobre algunos atributos de la carne como la ternura. Análisis de polimorfismos de CAST sugieren que hay posibles mutaciones de un solo nucleótido que podrían afectar el sitio de reconocimiento de la enzima PKA como ocurre con el cambio de Serina por Arginina en el nucleótido 638, S638A (Ciobanu et al., 2004). Más recientemente se ha identificado otro SNP en el intrón 6 de la secuencia de CAST, G por A en el nucleótido 76872 (G872A), que tendría su efecto sobre la actividad de la calpaína y a su vez también en la calidad de la carne. Según Gandolfi y colaboradores, los animales portadores del genotipo 872 AA muestran menores valores de pérdida de agua así como menor tiempo de activación post-mortem de la calpaína (Gandolfi et al., 2011).

Debido a que la producción porcina de Argentina se desarrolla en un nuevo escenario de oportunidades y desafíos fundamentado en un mercado interno con una plena disposición a la carne de cerdo como carne sustituta y dado el creciente reconocimiento de la industria respecto a la importancia de la palatabilidad de la carne resulta invaluable implementar tácticas que favorezcan una mejora en la calidad de modo tal de aprovechar esta oportunidad. Se necesita para esto, seguir informando sobre las características y bondades de la carne de cerdo y a su vez satisfacer la demanda de los consumidores con carnes de mejor calidad y mayor valor nutritivo. Surge así la necesidad de capacitar e informar a los pequeños y medianos productores tradicionales sobre estos efectos genéticos para poder obtener mejores carnes y mejores productos. Provincias como Córdoba, Santa Fe, Chaco y Tucumán presentan una tasa de incidencia de carnes PSE alrededor de un 25% (Marini et al. 2012) donde no solo está en juego el efecto genético sino también hay un gran aporte del manejo pre-faena (factor ambiental). Esta elevada incidencia del gen de Hal se debe en gran medida a que los productores desconocen muchas veces la presencia del gen y sus efectos negativos. Existen estrategias, factibles de ser implementadas pero de escasa accesibilidad para pequeños y medianos productores locales, que permitirán brindar al mercado carnes jugosas, de buen color y con buena textura para satisfacer la demanda de los consumidores.

El uso de técnicas de biología molecular como los marcadores moleculares *RFLP* o bien "Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción" facilita la detección directa de los alelos del gen Hal, del

gen RN y del gen de CAST. En este sentido, los alelos de estos genes fueron identificados por el método de PCR-RFLP a partir de muestras de pelo de los animales y utilizando los primers y enzimas de restricción (ER) que se detallan en la Tabla 1.

**TABLA 1.** Nombre y secuencias de los primers.

Nombre	Secuencia Forward (F)	Secuencia Reverse(R)	ER
Hal	5'-GTGCTGGATGTCCTGTGTTCCCT-3'	5'-CTGGTGACATAGTTGATGAGGTTTG-3'	Hhal
RN	5'-GGAACGATTCACCCTCAACT-3'	5'-AGCTCTGCTTCTTGCTGTCC-3'	Mbil (R200Q) Hsp91(V199I)
CAST <sub>Ser638Arg</sub>	5'-AAACCTATTTTCAGGGATATGGG-3'	5'-CCTTTGTTGTGTTCTCTGAGG-3'	PvuII
CAST <sub>G872A</sub>	5'-AATGAGCAGCCAACATCAGA-3'	5'-TTCCCATAGCCCACAAGAAG-3'	Hinfl

La aplicación de la selección asistida por marcadores moleculares contribuirá a disminuir la incidencia de los alelos con efectos perjudiciales sobre la calidad de carne porcina contribuyendo a evitar el deterioro en los componentes fisicoquímicos y organolépticos de la carne. A los fines de determinar el efecto que produce la presencia de los diferentes genotipos en los atributos de la carne se analizaron muestras de carne (*M. longissimus dorsi*) obtenidas de establecimientos donde fue posible seguir la trazabilidad de algún miembro de la progenie, cuyos parentales habían sido incluidos en el estudio por PCR-RFLP. Estas muestras fueron analizadas durante la faena en cuanto a pH (45 minutos y 24 hr) y posteriormente en cuanto a color (Minolta 700), terneza (Stable Micro Systems TA-XT2i utilizando la célula Warner-Bratzle), pérdida de agua por goteo (Honikel, 1987) y pérdida por mermas de agua por descongelación y por cocción, todos factores que determinan la calidad de carne.

La caracterización genética de los cerdos favorece a nivel productivo una selección directa mediante la eliminación de individuos portadores de los alelos desfavorables del plantel reproductivo; evitando también las pérdidas económicas como por ejemplo las causadas por muertes súbitas resultantes del síndrome de estrés porcino. A su vez, los productores podrán ofrecer a los consumidores carne y productos de calidad y mejorar la industria que permita la expansión de los pequeños productores con su beneficio económico.

## Resultados y discusión

Los consumidores desean carne de cerdo sin exceso de grasa, con buen color, con buena capacidad de retención de agua, con buen sabor y buen aroma. La mejor estrategia para mejorar la calidad de la carne porcina consiste en hacerlo desde la genética de manera de reducir la frecuencia de alelos con efectos perjudiciales para la calidad. A través de la implementación de la técnica de PCR-RFLP se pudieron distinguir los dos alelos para Hal: C representa el alelo normal donde se encuentra una citosina en la posición 1843 y t representa el alelo mutado donde se encuentra una timina en la posición 1843. De 166 animales analizados, 65,06% fueron CC, 34,94 fueron Ct, no evidenciándose el genotipo tt. El número y porcentaje de animales con diferentes genotipos para el gen Hal se muestran en la Tabla 2. Estos datos concuerdan con los observados por el grupo de Marini para estudios realizados en otras provincias argentinas (Córdoba, Santa Fe, Chaco y Tucumán) (Marini et al. 2012). Si bien no se han encontrado genotipos homocigotas tt, la incidencia del genotipo heterocigota evidencia la aún alta presencia del alelo mutado en la población analizada.

**TABLA 2.** Frecuencias genotípicas y alélicas del gen Hal

Frecuencias genotípicas	N	%
CC	108	65,06
Ct	58	34,94
tt	0	0
Total	166	100
Frecuencias alélicas	N	%
C	138	82,64
T	29	17,36

Los animales heterocigotas (Ct) también pueden producir carnes de menor calidad. La baja capacidad de retención de agua y la palidez de las carnes en cerdos portadores de la mutación, consecuencias de un bajo pH y elevada temperatura muscular, exteriorizan un fenotipo intermedio entre el homocigota para la mutación y el homocigota portador de alelos normales. En este contexto, teniendo en cuenta las pérdidas económicas asociadas a la mortalidad y menor calidad de la canal, la presencia del alelo t en el plantel reproductor debe ser evitado. La determinación del genotipo de los animales por el método de PCR-RFLP que se describe en este trabajo es conveniente ya que utiliza el pelo como fuente de ADN que permite un rápido screening del plantel sin someterlos a técnicas invasivas que generen estrés.

Para el gen RN o PRKAG3 fueron identificadas tres variantes alélicas: RN<sup>-</sup> (199V-200Q), rn<sup>+</sup> (199V-200R) y rn<sup>\*</sup> (199I-200R) y los cerdos estudiados muestran los siguientes genotipos: RN<sup>-</sup>/RN<sup>-</sup>, RN<sup>-</sup>/rn<sup>+</sup>, RN<sup>-</sup>/rn<sup>\*</sup>, rn<sup>+</sup>/rn<sup>+</sup>, rn<sup>+</sup>/rn<sup>\*</sup> o rn<sup>\*</sup>/rn<sup>\*</sup> (Tabla 3). Solo se encontró un animal con el genotipo RN<sup>-</sup>/RN<sup>-</sup> que es el que presenta la mutación R200Q en ambas cadenas de ADN pero no tiene la mutación en V199I y 10 animales que no presentan ningún de las mutaciones. De modo tal que, no se observó supremacía del alelo RN<sup>-</sup> como se encuentra descrito en la literatura (Josell et al., 2003; Lindahl et al., 2004) sino en una proporción semejante al alelo rn<sup>\*</sup> en la población en estudio (Tabla 3). Sin embargo, al igual que estos autores, se encontró que el genotipo RN<sup>-</sup>/rn<sup>\*</sup> fue el predominante con 88 animales.

**TABLA 3.** Frecuencias genotípicas y alélicas del gen RN

Frecuencias genotípicas	N	%
RN <sup>-</sup> /RN <sup>-</sup>	1	0,6
RN <sup>-</sup> /m <sup>+</sup>	28	16,87
RN <sup>-</sup> /m <sup>*</sup>	88	53,01
m <sup>+</sup> /m <sup>+</sup>	10	6,02
m <sup>+</sup> /m <sup>*</sup>	27	16,27
m <sup>*</sup> /m <sup>*</sup>	12	7,23
Total	166	100
Frecuencias alélicas	N	%
RN <sup>-</sup>	69	41,56
m <sup>*</sup>	69,5	41,87
m <sup>+</sup>	27,5	16,57

La carne de los cerdos portadores del alelo mutado RN<sup>-</sup> contiene en las fibras musculares blancas, una cantidad elevada de glucógeno, mostrando un descenso rápido del pH post-mortem en músculo y un potencial glucolítico elevado. También aumenta las pérdidas por goteo y pérdida de líquido durante la cocción, lo que reduce el rendimiento. Incluso el color es más pálido por el alto contenido de poten-

cial glucolítico. El gen RN $\cdot$  no exhibe ningún efecto positivo sobre otros caracteres de importancia, en consecuencia, la presencia del mismo es enteramente perjudicial. Por otro lado, se considera que el alelo 199I tiene efectos beneficiosos sobre la calidad de la carne debido al bajo potencial glucolítico y a un elevado pH final (Ciobanu et al., 2001; Fields et al., 2002) que se asocia a una mejor capacidad de retención de agua, traduciéndose en un menor goteo durante el almacenamiento y un mayor rendimiento durante el procesamiento (Fields et al., 2002). No habiéndose encontrado trabajos publicados sobre la incidencia de estos alelos en Argentina, resulta de interés intensificar el estudio de este gen para tener un panorama completo de su comportamiento genotípico a lo largo del país

El gen CAST es un potente candidato para explicar la variación genética en la ternura de la carne que ha sido objeto de múltiples estudios en vacuno y porcino (Kemp et al., 2010). Para este gen se estudiaron dos polimorfismos diferentes: CAST<sub>S638A</sub> y CAST<sub>G872A</sub>. Estas mutaciones tienen su efecto en la actividad de la calpaina, enzima blanco de la calpastatina. De 166 animales analizados para el polimorfismo CASTS638A 61.44% resultaron SA, 32.53% AA y un 6.02% SS. Mientras que para el SNP CASTG872A, 57,8% fueron GA, 34,94 fueron GG, y solo 7,20% fueron AA. El número y porcentaje de animales con diferentes genotipos del gen CAST se muestran en la Tabla 4.

**TABLA 4.** Frecuencias genotípicas y alélicas del gen CAST

Frecuencias genotípicas	N	%	Frecuencias genotípicas	N	%
SS	10	6,02	GG	58	34,94
SA	102	61,44	GA	96	57,80
AA	54	32,53	AA	12	7,20
Total	166	100	Total	166	100
Frecuencias alélicas	N	%	Frecuencias alélicas	N	%
S	61	36,74	S	106	63,85
A	105	63,25	A	60	36,14

SNP CAST<sub>S638A</sub> (izquierda) y CAST<sub>G872A</sub> (derecha) analizadas para un total de 166 animales.

Estudios previos informaron una asociación del SNP Ser638Arg del gen de calpastatina con la textura de la carne de cerdo y la capacidad de retención de agua. Esto tiene su explicación en que la mutación CAST<sub>S638A</sub> podría afectar el sitio de reconocimiento de PKA, enzima que fosforila a calpastatina disminuyendo la capacidad inhibitoria de ésta hacia calpaína (Ciobanu et al., 2004). Ciobanu y colaboradores (2002) informaron que el alelo Arg638 de CAST es más beneficioso para las medidas de ternura mecánica, así como en los puntajes de los paneles de sabor, masticabilidad y jugosidad cuando se lo compara con el alelo Ser638. Dos años más tarde este mismo grupo de trabajo sugiere que el alelo Arg638 es el deseable para carne fresca de calidad y el alelo Ser638 podría ser el alelo beneficioso para procesados o carne curada ya que se asoció con un producto más firme (Ciobanu et al. 2002; Ciobanu et al., 2004; Stalder et al., 2005). Los resultados observados muestran que el genotipo SA es el más representado de modo tal que según el destino que cada productor dé a la carne deberá estudiarse los cruzamientos a realizar.

En cuanto al SNP CAST<sub>G872A</sub> según la literatura cerdos con genotipo AA mostraron una mayor actividad de  $\mu$ -calpaína autolisada (24 y 72 hr) post-mortem, así como menores valores de pérdida de agua por goteo (Gandolfi et al., 2011). La forma autolisada de la calpaina es activa y muestra requerimientos de calcio menores que la forma nativa, sin embargo el aumento de la autólisis también hace que la enzima sea menos estable y conduce finalmente a la pérdida de actividad (Goll et al., 2003).

A los fines de determinar el efecto que produce la presencia de los diferentes genotipos en los atributos de la carne se caracterizaron 15 muestras (*M. longissimus dorsi*) obtenidas de aquellos establecimientos donde

fue posible seguir la trazabilidad de algún miembro de la progenie, cuyos parentales habían sido incluidos en el estudio por PCR-RFLP. Estas muestras fueron analizadas durante la faena en cuanto a pH (45 minutos y 24 hr) y posteriormente en cuanto a color (Minolta CR-300), terneza (Stable Micro Systems TA-XT2i, utilizando la célula Warner-Bratzle), pérdida de agua por goteo (Honikel, 1987) y pérdida por mermas de agua por descongelación y por cocción, todos factores que determinan la calidad de carne. Con estas determinaciones quiso evidenciarse el efecto del genotipo en los análisis de calidad de carne teniendo en cuenta las características genotípicas de los progenitores que heredan a su descendencia y conocer el efecto de la genética en la expresión de los caracteres. A su vez, estas determinaciones permiten caracterizar no solo las propiedades de la carne que la hace apetecible para el consumidor sino también aquellas propiedades que la hacen factible de procesamiento para la elaboración de un derivado.

Los valores obtenidos para las diferentes determinaciones así como el genotipo de cada muestra fueron volcados en la Tabla 5. Las muestras se agruparon de acuerdo a los genotipos encontrados de la siguiente manera: **Grupo I:** CC RN-/rn+ GA AA; **Grupo II:** CT rn+/rn\* GA AA; **Grupo III:** CC RN-/rn\* GG AA; **Grupo IV:** CC rn+/rn\* GA SA. Los datos de pH corresponden a los 45 min y 24 hrs post-mortem, los valores de color se expresan por medio de las tres coordenadas fundamentales L\*, a\* y b\*; L\* indica la luminosidad y a\* y b\* son las coordenadas cromáticas. Drip loss es la pérdida de agua por goteo a 24 y 48 hrs, se expresa como porcentaje sobre la muestra fresca; y las mermas por cocción también son expresadas en términos de porcentaje sobre la muestra cocida. La terneza se expresa en términos de kilogramo-fuerza (Kgf) y refiere a la medición de la fuerza requerida para efectuar un corte de una muestra de carne en el sentido perpendicular a las fibras musculares.

**TABLA 5.** Características fisicoquímicas de muestras de carne de cerdo. pH45 corresponde al pH a los 45 minutos post-mortem y pH24: pH medido a las 24 hrs post-mortem. Color: L\* indica la luminosidad y a\* y b\* son las coordenadas cromáticas. Drip Loss 24 y 48: el porcentaje (%) de pérdida de agua por goteo a 24 y 48 hrs respectivamente. M. desc. y M. Cocción: porcentaje (%) de mermas por descongelación y cocción. Los animales de igual genotipo fueron agrupados de la siguiente manera: **Grupo I** CC RN-/rn\* GA AA; **Grupo II:** CT rn+/rn\* GA AA; **Grupo III:** CC RN-/rn\* GG AA; **Grupo IV:** CC rn+/rn\* GA SA. n: número de muestras. (1)  $p < 0,05$  existen diferencias significativas entre los grupos.

Características	Grupos (n)			
	I ( 4 )	II ( 3 )	III ( 3 )	IV ( 4 )
pH45min	6.36 ± 0.74	6.5 ± 0.2	6.95 ± 0.4	6.69 ± 0.27
pH24h	6.1 ± 0.62	5.46 ± 0.13	5.52 ± 0.22	5.97 ± 0.49
L*	55.73 ± 6.05	54 ± 4.42	63.29 ± 4.42	55.14 ± 5.10
a*	12.73 ± 3.03	14.51 ± 1.57	10.39 ± 1.01	11.70 ± 2.61
b*	12.52 ± 2.97	13.78 ± 2.29	10.01 ± 2.58	11.95 ± 2.51
Drip loss 24h(%)	2.09 ± 1.87	1.08 ± 1.04	3.17 ± 2.39	3.39 ± 0.70
Drip loss 48h (%)	3.57 ± 3.21	2.54 ± 1.67	5.02 ± 1.75	4.96 ± 1.05
Merma Descongelacion (%)	1.35 ± 0.56	1.88 ± 0.43	1.96 ± 2.05	3.30 ± 3.33
Merma Cocción (%)	15.16 ± 7.42	36.43 ± 21.95	20.50 ± 10.82	19.78 ± 8.76
Terneza	3.59 ± 1.38	3.27 ± 0.54	4.15 ± 1.14	3.45 ± 1.11

Los genotipos obtenidos para las muestras de carne concuerdan con los registrados para sus parentales y fueron predecibles de acuerdo a los cruzamientos informados por los establecimientos. Sin embargo,

dada la sumatoria de los efectos aportados por la presencia de alelos perjudiciales de los genes en estudio no fue posible predecir con certeza un fenotipo determinado. La manifestación de una misma característica como es el pH final se ve influenciado por el efecto de alelos perjudiciales tanto de Hal y RN así como éstos también tienen implicancia sobre la terneza dado que afectan directamente el estado de las proteínas. A su vez el color y la capacidad de retención de agua también guardan estrecha relación y son influenciados por varios de los genes en estudio. Resulta necesario aumentar sustancialmente el número de muestras por grupo o genotipo y realizar algún *approach* estadístico que ponga de manifiesto la existencia o no de diferencias significativas de cada genotipo sobre los caracteres estudiados. A su vez, se debe considerar que se analizaron los genotipos independientemente de otros factores que tienen influencia directa sobre la calidad de la carne como son los factores ambientales, factores involucrados en el transporte de los animales y el procesamiento en toda la cadena que también tienen contribución al fenotipo observable.

Se planteo un ANOVA donde se contrasto los diferentes grupos para evaluar estadísticamente si existen diferencias en cuanto a las determinaciones realizadas. Los valores de pH45 para todos los genotipos encontrados fueron mayores a 5.8 y no se encuentran diferencias significativas, aunque se puede decir que se corresponde con un fenotipo no PSE. Aquellos animales Ct (Grupo II) portadores de la mutación en Hal, podrían generar carnes de baja calidad. Estel grupo II es el que presenta el valor más bajo de pH a 24 hr. Esto podría deberse a un fenotipo intermedio entre el homocigota para la mutación y el homocigota portador de alelos normales para el gen de Hal. Además, este grupo muestra una baja capacidad de retención de agua que se hace evidente en un porcentaje elevado de merma por cocción. También puede observarse una tendencia a un tipo de carne más oscura dado por un valor mayor de las coordenadas  $a^*$  y  $b^*$  y un indicador de luminosidad  $L^*$  menor con respecto a los otros genotipos. Cabe destacar que si se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre la media del parámetro  $a^*$  (coordenada rojo/verde) de los grupos.

La mayoría de las muestras analizadas contiene al menos una de las mutaciones en el gen RN. En la literatura se encuentran varios trabajos que concluyen que no observan diferencias significativas en el pH a 45min entre los genotipos de RN (Josell et al., 2003; Gunilla et al., 2004; Martinez-Quintana et al., 2006), hecho que coincide con la tendencia observada en la tabla. Estudios previos destacan que en cerdos portadores de la mutación RN<sup>-</sup> (portadores de 200Q, Grupos I y III), el pH final es más bajo que en cerdos rn<sup>+</sup>, libres de mutación. El pH final bajo resulta de una menor concentración proteica y un mayor contenido de glucógeno en músculo. La aparición de carnes oscuras, duras y secas (DFD) consideradas de menor calidad, se produce por un pH superior a 6 después de haber transcurrido 24 horas del sacrificio, acompañado de una mayor retención de agua.

## Conclusiones

A través del uso de marcadores moleculares como los RFLP se implementó la biología molecular como herramienta de selección a través de la búsqueda de relaciones entre estos marcadores nucleicos y caracteres relacionados a la calidad de la carne porcina. Se caracterizó una extensa zona del noroeste de Entre Ríos en cuanto a la diversidad genética de genes candidatos asociados a características productivas y de calidad de producto porcinos mediante el uso de estos marcadores moleculares. Con los datos obtenidos en este trabajo se podrá llevar a cabo un programa de mejoramiento genético en los establecimientos regionales que contemple la vigilancia de la mutación del gen Hal, del gen de RN y el gen CAST para ingresar en mercados diferenciados con carnes que atraigan a los consumidores. Con el acercamiento de estas estrategias, los porcicultores han tomado conocimiento del efecto de la genética en la expresión de las características y los elementos de la selección y mejoramiento genético. A su vez, pudieron conocer la constitución alélica de sus animales y han comprendido cómo la aplica-

ción de la selección asistida por marcadores moleculares contribuirá a disminuir la incidencia de alelos perjudiciales para llegar al mercado con carnes de mejor calidad. Por lo tanto fue posible orientar correctamente a los productores para un uso apropiado de las razas/ líneas/ animales a ser utilizadas en programas de cruzamiento para aprovechar los efectos de complementariedad y heterosis derivados de las diferencias genéticas entre las poblaciones. Así, los productores podrán seleccionar aquellos individuos genéticamente superiores en las características estudiadas con la finalidad que la siguiente generación sea mejor.

## Bibliografía

- ADACHI Y, Ishida-Takahashi A, Takahashi C, Takano E, Murachi T, Hatanaka M. (1991) Phosphorylation and subcellular distribution of calpastatin in human hematopoietic system cells. *J Biol Chem.* 266(6):3968-72.
- AVERNA M, de Tullio R, Passalacqua M, Salamino F, Pontremoli S, Melloni E.(2001). Changes in intracellular calpastatin localization are mediated by reversible phosphorylation. *Biochem J.* 15;354(Pt 1):25-30
- BASTOS RG, Federizzi J, Deschamps JC, Cardellino RA, Dellagostin OA (2001). Efeito do Gene do Estresse Suíno sobre Características de Quantidade e Qualidade de Carcaça. *Rev Bras Zootec* 30(1):37-40.
- BRENIG B, Brem G (1992). Genomic organization and analysis of the 5' end of the porcine ryanodine receptor gene (*ryr1*). *FEBS Lett.* 24;298(2-3):277-9
- BERTRAM HC, Petersen JS, Andersen HJ (2000). Relationship between RN (-) genotype and drip loss in meat from Danish pigs. *Meat Sci.*; 56(1):49-55.
- CALVO JH, Osta R, Garcia-Muro E, Zaragoza P (1997). Síndrome de estrés porcino: aplicación y ventajas de la PCR para su diagnóstico. *Med. Vet.*14. 2: 110-113.
- CASSENS RG (1999). New Developments in guaranteeing the optimal sensory quality of meat. Ed. F.Tol-drá y D.J. Troy. Fundación Vaquero, Spain. pp: 1-8
- CHAN WKM, Faustman C, Decker EA (1997). Oxymyoglobin oxidation as affected by oxidation products of phosphatidylcholine liposomes. *J Food Sci* 62: 709-712.
- CHAN WK, Faustman C, Velasquez-Pereira J, McDowell LR, Batra TR (1998). Effects of alpha-tocopherol on metmyoglobin formation and reduction in beef from cattle fed soybean or cottonseed meal diets. *J Anim Sci* 76: 1421-6.
- CHRISTIAN L L. (1972). A review of the role of genetics in animal estress susceptibility and meat quality. *Proceedings of the quality symposium, Wisconsin University, Madison* 91 -115.
- CIOBANU D, Bastiaansen J, Malek M, Helm J, Wollard J, Plastow G, Rothschild M (2001). Evidence for new alleles for the protein kinase adenosine monophosphate-activated3-subunit gene associated with low glycogen content in pig skeletal muscle and improved meat quality. *Genetics* 159: 1151-1162. Ciobanu DC, Bastiaansen JW, Lonergan SM, Thomsen H, Dekkers JC, Plastow GS, Rothschild MF(2004). New alleles in calpastatin gene are associated with meat quality traits in pigs. *J Anim Sci.* 82(10):2829-39.
- FAUSTMAN C, Chan WK, Schaefer DM, Havens A (1998). Beef Color Update: The Role for Vitamin E. *J Anim Sci* 76:1019-26.
- FERNÁNDEZ X, Monin G (1994). A major gene affecting pork quality: The RN gene. *Meat Focus Int.* 3(8):332-334.
- FIELDS, B., Klont, R. E., Jungst, S. J., Wilson, E. R, Plastow, G. S., & Sosnicki, A. A. (2002). New DNA marker affecting muscle glycogen content: practical implications for pork quality. In *Proceedings 48th international congress of meat science and technology* (pp. 620–621), 25–30 August 2002, Rome, Italy.
- FUJII J, Otsu K, Zorzato F, de Leon S, Khanna VK, Weiler JE, O'Brien PJ, MacLennan DH (1991). Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science.* 26; 253(5018):448-51.

- GANDOLFI G, Pomponio L, Ertbjerg P, Karlsson AH, Nanni Costa L, Lametsch R, Russo V, Davoli R (2011). Investigation on CAST, CAPN1 and CAPN3 porcine gene polymorphisms and expression in relation to post-mortem calpain activity in muscle and meat quality. *Meat Sci.* 88(4):694-700.
- GEESINK GH, Koohmaraie M. (1999). Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by mu-calpain under postmortem conditions. *J Anim Sci.* 77(10):2685-92.
- GUÁRDIA MD, Estany J, Balasch S, Oliver MA, Gispert M (2004). Risk assessment of PSE condition due to pre-slaughter conditions and RYR1 gene in pigs. *Meat Science*; 67, pp:471-478.
- GUNILLA L, Enfalt A, Seth GV, Josell A, Hedebro-Velander I, Andersen HJ, Braunschweig M, Anderson L, Lundstrom K (2004). A second mutant allele (V199I) at the PRKAG3 (RN) locus -I. Effect on technological meat quality of pork loin. *Meat Sci.* 66: 609-619.
- GOLL, DE, VF. Thompson, H. Li, W. Wei, and J. Cong. (2003). The calpain system. *Physiological reviews* 83:731-801.
- HAMILTON, D.N., M. Ellis, K.D. Miller, F.K. McKeith, D. F. Parrett. 2000. The effect of the halothane and rendement napole genes on carcass and meat quality characteristics of pigs. *J. Anim. Sci.* 78:2862–2867.
- HONIKEL (1987). Influence of Chilling on Meat Quality Attributes of Fast Glycolysing Pork Muscles. Evaluation and Control of Meat Quality in Pigs. *Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science* Volume 38, pp 273-283.
- JOSELL A, Enfalt AN, Seth GV, Lindahl G, Velander IH, Andersson L, Lundstrom K (2003). The influence of RN genotype, including the new V199I allele, on the eating quality of pork loin. *Meat Sci.* 65: 1341-1351.
- KEMP CM, Sensky PL, Bardsley RG, Buttery PJ, Parr T. (2010). Tenderness--an enzymatic view. *Meat Sci.* 84(2):248-56.
- KENT MP, Spencer MJ, Koohmaraie M. (2004). Postmortem proteolysis is reduced in transgenic mice overexpressing calpastatin. *J Anim Sci.* 82(3):794-801.
- KOOHMARAIE M, Whipple G, Kretchmar DH, Crouse JD, Mersmann HJ. (1991). Postmortem proteolysis in longissimus muscle from beef, lamb and pork carcasses. *J Anim Sci.* 69(2):617-24.
- KOOHMARAIE, M. (1992). The role of Ca<sup>2+</sup>-dependent proteases (calpains) in post-mortem proteolysis and meat tenderness. *Biochimie*, 74, 239–245.
- KRZĘCIO E, Koćwin-Podsiadła M, Kurył J, Zybert A, Sieczkowska H, Antosik K. (2008). The effect of interaction between genotype CAST/RsaI (calpastatin) and MYOG/Mspl (myogenin) on carcass and meat quality in pigs free of RYR1(T) allele. *Meat Sci.* 80(4):1106-15.
- LINDAHL G, Enfält AC, von Seth G, Josell A, Hedebro-Velander I, Andersen HJ, Braunschweig M, Anderson L, Lundström K (2004). A second mutant allele (V199I) at the PRKAG3 (RN) locus- I. Effect on technological meat quality of pork loin. *Meat Sci.* 66(3):609-19
- MARINI SJ, Vanzetti, L S; Borelli V, Villareal A, Denegri, G, Cottura, G, Panichelli D, Silva P, Campagna, D, Brunori J, Spiner N, Franco R (2012). RYR1 gene variability and effect on meat pH in Argentinean hybrids swines. *In Vet Vol.* 14 N° 1.
- MARTÍNEZ-QUINTANA JA, Alarcón-Rojo AD, JA Ortega-Gutiérrez, H Janacua-Vidales (2006). Incidence of Halothane and Rendement Napole genes and their effect on quality of pork. *Publicaciones Unidad y Ciencia UJAT22* (2):131-139.
- MELODY JL, Lonergan SM, Rowe LJ, Huiatt TW, Mayes MS, Huff-Lonergan E. (2004). Early postmortem biochemical factors influence tenderness and water-holding capacity of three porcine muscles. *J Anim Sci.*; 82(4):1195-205. Erratum in: *J Anim Sci.* 82(7):2209.
- MILAN D, Jeon JT, 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, Andersson L (2000). A mutation in PRKAG3 associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle. *Science* 288:1248-1251.

- NAVEAU J (1986). Contribution á l'étude du déterminisme genetique de la qualité de la viande porcine. Heritabilité du rendement technologique Napole. J. Rech. Porcine en France. 18: 265-276.
- OTSU K, Phillips MS, Khanna VK, Leon S, Mac Lennan, DH (1992). Refinement of diagnostic assays for a probable causal mutation of porcine and human malignant hyperthermia. Genomics13: 835.
- SALAMINO F, Averna M, Tedesco I, De Tullio R, Melloni E, Pontremoli S. (1997) Modulation of rat brain calpastatin efficiency by post-translational modifications. FEBS Lett. 412(3):433-8.
- STALDER KJ, Rothschild MF, Lonergan SM (2005). Associations between two gene markers and indicator traits affecting fresh and dry-cured ham processing quality. MeatSci 69(3):451-7.
- SCHILLING MW, Mink LE, Gochenour PS, Marriott NG, Alvarado CZ (2003). Utilization of pork collagen for functionality improvement of boneless cured ham manufactured from pale, soft, and exudative pork. Meat Sci. 65(1):547-53.
- SHEN H, Lahucky R, Kovac L, O' Brien PJ (1992). Comparison of Hal gene status with PNMR-determined muscle metabolites and with Ca sequestration activity of anoxia -challenged muscle from pigs homozygous and heterozigous for porcine stress syndrome. Pig News and Information. 13: 105-109.
- SILVEIRA ACP, Freitas ASM, Cesar RC, Antunes EC, Guimaraes DFA, Batista D, Torido LC (2011). Influence of the halotane gene (HAL) on pork quality in two comercial crossbreeds. Genetics and Molecular Research 10 (3): 1479-1489FA
- STALDER KJ, Rothschild MF, Lonergan SM (2005). Associations between two gene markers and indicator traits affecting fresh and dry-cured ham processing quality. MeatSci.69(3):451-7
- SUMAN SP, Faustman C, Stamer SL, Liebler DC (2007). Proteomics of lipid oxidation-induced oxidation of porcine and bovine oxymyoglobins. Proteomics 7: 628-640.
- VESTERGAARD M, Oksberg N, Henckel P (2000). Influence of feeding intensity, grazing and finishing feeding on muscle fibre characteristics and meat colour of semitendinosus, longissimus dorsi and supraspinatus muscles of young bulls. Meat Science 54: 177-185.

**PID 8078**

**Denominación del Proyecto**

Caracterización de polimorfismos de genes candidatos para mejora de calidad de la carne porcina

**Directora del proyecto**

LAGADARI, Mariana

**Unidad Ejecutora**

Facultad de Ciencias de la Alimentación

**Dependencia**

Universidad Nacional de Entre Ríos

**Área:**

Ciencia y Tecnología de alimentos

**Contacto**

[lagadarim@fca.luner.edu.ar](mailto:lagadarim@fca.luner.edu.ar) - [mlag2@hotmail.com](mailto:mlag2@hotmail.com)

**Integrantes del Proyecto**

FABRE, Romina M.; JENKO, Carolina; MARKIEWICZ, Guillermo A.; RODRIGUEZ, Viviana R.

**Fechas de iniciación y de finalización efectivas**

01/02/2015 y 31/01/2018

Aprobación del Informe Final por Resolución CS N° 277/18 (12/11/2018)

[<<< VOLVER AL INICIO](#)