

## **POLIMORFISMOS EN LAS REGIONES REGULADORAS DEL GEN *CAST*: EFECTOS *IN VIVO* Y *POSTMORTEM* EN CERDOS DE TIPO IBERICO**

Alves<sup>1</sup>, E., Benítez, R., García-Casco, J., Muñoz, M., Caraballo, C., García, F., Silió, L. y Rodríguez, C.

<sup>1</sup>Departamento de Mejora Genética Animal, INIA, 28040 Madrid  
silio@inia.es

### **INTRODUCCIÓN**

La Calpastatina (*CAST*) es una proteína que actúa como inhibidor endógeno específico de proteasas no lisosomales como las calpaínas, con influencia en la degradación *in vivo* de las proteínas miofibrilares y en su degradación *postmortem* durante la transformación del músculo en carne. Por ello, el gen *CAST* es un potente candidato para explicar la variación genética en la terneza de la carne que ha sido objeto de múltiples estudios en vacuno y porcino (Kemp et al., 2010). Se trata de un gen de gran tamaño y complejidad y, en el caso de la especie porcina, consta de 35 exones que cubren una longitud de 123 Kb. Asimismo su expresión podría estar regulada por cinco promotores, tres de los cuales localizados en el extremo 5' (adyacentes a los exones 1xa, 1xb y 1u) y generan diferentes transcritos y múltiples isoformas (Meyers et al., 2008; Sensky et al., 2006). Actualmente hay más de 10.000 polimorfismos referidos en la base de datos *Ensembl*, para varios de los cuales se han descrito efectos sobre la terneza de la carne de cerdo (Ciobanu et al., 2004; Nonneman et al., 2011). En la mayoría de estos estudios, incluyendo las asociaciones detectadas por nosotros en cerdos de tipo Ibérico (Alves et al., 2013), se han utilizado SNPs localizados en la región codificante del gen. Los objetivos del presente trabajo fueron: a) identificar polimorfismos en regiones promotoras del gen *CAST* en cerdos de tipo Ibérico; b) estudiar la asociación entre las variantes génicas detectadas de mayor interés y la terneza de la carne, y c) estudiar la asociación con caracteres relacionados con el desarrollo muscular, dado el papel regulador del mismo atribuido a la Calpastatina.

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

**Animales, Secuenciación y Genotipado.** Los animales, muestras biológicas y registros empleados en este estudio proceden de dos ensayos: a) 268 cerdos Duroc x Ibérico alimentados *ad libitum* en cebadero y sacrificados con 131 kg de peso medio (Muñoz et al., 2011) y b) 490 Ibéricos puros engordados en Montanera y sacrificados con 165 kg de peso medio (Alves et al., 2016). Como medida de terneza se determinó la resistencia al corte Warner-Blatzer en muestras de lomo utilizando un equipo Texture Analyzer TA-XTplus. Se secuenció casi completa la región codificante del gen (2064 pb-cDNA), así como de las regiones reguladoras (1692 y 1905 pb DNA genómico), en 10 animales Duroc y nueve Ibéricos de distintas procedencias. Un SNP y una InDel detectados en la región promotora adyacente al exón 1xb se genotiparon mediante secuenciación Sanger y un segundo SNP, detectado en la posible región promotora adyacente al exón 1u, fue genotipado por pirosecuenciación.

**Análisis estadístico.** El análisis de los registros de resistencia al corte (kg/cm<sup>2</sup>) y rendimiento de lomos (% sobre peso de canal) se llevó a cabo separadamente para cada ensayo, carácter y marcador genético mediante un modelo animal básico con diferentes efectos fijos y como covariables el peso de la canal, así como las requeridas para la estimación de los efectos aditivos (*a*) y dominantes (*d*) de los SNPs o el número de copias de cada alelo de la InDel analizada. Para la realización de los cálculos se utilizó el programa Qxpak v.5.02 (Pérez-Enciso y Misztal, 2011).

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Las secuencias obtenidas de 19 animales mostraron un total de 16 SNPs y cinco InDels en las posibles regiones reguladoras adyacentes a los exones 1xa, 1xb y 1u. Se eligieron los SNPs g.5669 T>C y g.49346 C>T y la InDel presente en g.5670\_5684 para su genotipado y realización de estudios de asociación. Los polimorfismos se nombran de acuerdo con su posición en la secuencia de GenBank, con número de acceso EU137105. Los dos SNPs presentaron frecuencias alélicas no extremas tanto en los animales Duroc x Ibérico (MAF = 0,37 y 0,40) como en los Ibéricos (MAF = 0,28 y 0,29). Los animales cruzados presentaron

tres alelos para la InDel, dos de ellos con delección de 15 pb (g. 5670\_5684 delGGGGCGGGGCGGGGC) y de cinco pb (g. 5670\_5674 delGGGGC), y el tercero sin delección alguna (alelo *wild*), con frecuencias respectivas de 0,41, 0,17 y 0,42. En los Ibéricos puros únicamente se detectaron los alelos *wild* y g. 5670\_5684 delGGGGCGGGGCGGGGC (delección de 15 pb) con frecuencias idénticas (0,50) en ambos.

En la Tabla 1 se resumen los efectos de estos polimorfismos sobre la resistencia al corte en los animales cruzados e Ibéricos puros. Los tres marcadores presentan importantes efectos en los animales Duroc x Ibérico, en los que la media del carácter es 4,3 kg/cm<sup>2</sup> (SD= 1,2). En los animales Ibéricos puros, solamente la InDel presenta un sustancial efecto sobre la resistencia al corte, con una media en esta población de 4,6 kg/cm<sup>2</sup> (SD= 1,3). En ambos tipos de animales el alelo *wild* - sin delección- está asociado a una carne significativamente más dura. Conforme a la hipótesis, en cruzados y puros se observan efectos significativos de los tres marcadores sobre rendimiento de lomos, carácter elegido como representativo del desarrollo muscular (Tabla 2). La magnitud de estos efectos puede valorarse mejor considerando las diferentes medias del rendimiento de lomos: 5,5% (SD= 0,7) en Duroc x Ibérico y 2,5% (SD= 0,2). De modo consistente con los resultados de terneza, en ambos grupos el alelo *wild* -sin delección- está asociado a mayor rendimiento de lomos.

En estudios previos, se ha determinado mediante q-PCR la expresión del gen *CAST* en muestras de tejido muscular obtenidas en animales de los dos tipos genéticos (diafragma en los cruzados y lomo en los Ibéricos puros), con resultados coherentes con los efectos fenotípicos descritos. El alelo *wild* de la delección afecta positiva y significativamente la transcripción del gen (Alves et al., 2016). En el estudio de expresión en animales puros se diferenció la transcripción de las isoformas *CAST*-1xa, -1xb y -1u, observándose un efecto positivo significativo del alelo g.49346C sobre la expresión global del gen, atribuible al transcrito de la isoforma *CAST*-1u, conforme a la posición del SNP g.49346 C>T, adyacente a la posible región promotora al exón 1u. Estos efectos sobre la transcripción darían lugar a una mayor inhibición de las calpaínas y de los procesos *in vivo* y *postmortem* asociados a estas proteínas. Debe tenerse en cuenta que el SNP g.49346 C>T altera la diana de unión a un factor de transcripción (Myoblast determining factors family, Myf5) relacionado con la regulación temprana del desarrollo del músculo esquelético (Francetic y Li, 2011), lo que explica la relación entre este polimorfismo y el rendimiento del lomo.

Dada su localización próxima, los tres polimorfismos analizados presentan desequilibrio de ligamiento (DL), especialmente fuerte entre los SNPs g.5669 T>C y g.49346 C>T ( $r^2 = 0,95$ , en Ibéricos y 0,46 en Duroc x Ibérico), siendo menor en ambos tipos genéticos el DL entre la InDel y los dos SNPs ( $r^2$  de 0,18 a 0,40). Ello dificulta la interpretación individualizada del conjunto de resultados, haciendo aconsejable la identificación y análisis de los haplotipos presentes: tres en Ibéricos y seis en los cruzados. Los contrastes entre haplotipos (resultados no detallados) permiten descartar la causalidad del SNP g.5669 T>C, indican que los efectos sobre terneza son atribuibles primariamente a la InDel, y confirman que el SNP g.49346 C>T afecta al rendimiento de lomos, con interacción entre ambos polimorfismos.

En nuestro conocimiento las asociaciones detectadas no se han descrito previamente en razas seleccionadas convencionales. ¿Estamos ante unas asociaciones específicas de los cerdos Ibéricos, tanto puros como cruzados?. Está pendiente la comparación de las frecuencias de la InDel y del SNP g.49346 C>T observadas en este estudio con las de razas convencionales. Pero, la singularidad de estos efectos debe atribuirse a un aspecto característico del cerdo Ibérico: su elevada tasa de recambio proteico. Hace más de una década, Rivera-Ferre et al. (2005) mostraron que los animales Ibéricos tienen un potencial de síntesis proteica suficiente para que su deposición de proteína fuera similar a la de la raza Landrace, si bien su elevada degradación proteica limite notablemente su desarrollo muscular, muy inferior a la de la raza citada. Aunque existen distintos sistemas intracelulares de degradación proteica (lisosomales y no lisosomales), los polimorfismos citados de las regiones reguladoras del gen *CAST* pueden afectar sustancialmente a uno de los segundos dando lugar a los efectos estimados sobre terneza y desarrollo muscular.

**Tabla 1.** Efectos aditivos (*a*) y dominantes (*d*) de polimorfismos localizados en promotores del gen *CAST* sobre la resistencia al corte (kg/cm<sup>2</sup>) en muestras de lomo de cerdos de tipo Ibérico

Polimorfismos	Duroc x Ibérico		Ibérico	
	<i>a</i> (SE)	<i>d</i> (SE)	<i>a</i> (SE)	<i>d</i> (SE)
SNP g.5669 T>C	-0,47 (0,16)**	1,07 (0,26)***	0,04 (0,13)	0,25 (0,15)
InDel g. 5670_5684				
- efecto delGGGGC	0,52 (0,16)***	-	-	-
- efecto alelo <i>wild</i>	0,50 (0,11)***	-	0,48 (0,08)***	-
SNP g.49346 C>T	0,43 (0,11)***	0,06 (0,14)	0,06 (0,13)	0,24 (0,15)

$P < 0,01^{**}$ ;  $P < 0,001^{***}$

**Tabla 2.** Efectos aditivos (*a*) y dominantes (*d*) de polimorfismos localizados en promotores del gen *CAST* sobre el rendimiento de lomos (% sobre peso canal) de cerdos de tipo Ibérico

Polimorfismos	Duroc x Ibérico		Ibérico	
	<i>a</i> (SE)	<i>d</i> (SE)	<i>a</i> (SE)	<i>d</i> (SE)
SNP g.5669 T>C	-0,16 (0,08)*	0,37 (0,13)**	0,05 (0,02)*	0,01 (0,02)
InDel g. 5670_5684				
- efecto delGGGGC	0,18 (0,08)*	-	-	-
- efecto alelo <i>wild</i>	0,12 (0,06)*	-	0,06 (0,02)**	-
SNP g.49346 C>T	0,15 (0,06)**	0,17 (0,07)*	0,05 (0,02)*	0,01 (0,02)

$P < 0,05^{*}$ ;  $P < 0,01^{**}$ ;  $P < 0,001^{***}$

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Alves, E. et al. 2013. VII World Dry-Cured Ham Congress, Ourique, Portugal, 22-28 Mayo 2013. • Alves, E. et al. 2016. 9<sup>th</sup> International Symposium on Mediterranean Pig, Portoalegre, Portugal, 3-5 Noviembre 2016. • Ciobanu, D.C. et al., 2004 J. Anim. Sci. 84: 2973–2982. • Francetic, T. & Li, Q., 2011. Transcription 2:3, 109-114. • Kemp, C.M. et al., 2010. Meat Sci. 84: 248–256. • Meyers, S. N. & Beever, J. E., 2008. Anim. Genet. 39: 531-543. • Nonneman, D. et al., 2011. J. Anim. Sci. 89: 2663–2672 • Pérez-Enciso, M. & Misztal, I. 2011. BMC Bioinformatics. 12: 202. • Rivera-Ferre, M.G. et al., 2005. J. Nutrition. 135: 469-478 • Sensky, P.L.K.K. et al. 2006. J. Anim. Sci. 84: 2973–2982.

**Agradecimientos:** Animales, muestras y registros utilizados se obtuvieron en el marco de los contratos CC06-057 INIA-SAT Vallehermoso y CON 12-047 INIA-SRC.

### POLIMORPHISMS ON THE REGULATORY REGIONS OF *CAST* GENE: *IN VIVO* AND *POSTMORTEM* EFFECTS IN CROSSBRED AND PUREBRED IBERIAN PIGS

**ABSTRACT:** Calpastatin (*CAST*) inhibits calpain and, hence, regulates *in vivo* and post *mortem* proteolysis. The *CAST* gene contains multiple promoters that generate different transcripts resulting in several isoforms. We estimated the effects on *longissimus* muscle tenderness and carcass loin content of three polymorphisms located on the gene regulatory regions in 490 purebred Iberian pigs and 298 crossbred with Duroc. Most relevant and consistent associations were observed between InDel g. 5670\_5684 and Warner Blatzer shear force (~ 0.50 kg/cm<sup>2</sup>) and SNP g.49346 C>T and percentage of loins on carcass weight (0.15 % in crossbred pigs and 0.05% in purebred Iberian).

**Keywords:** Iberian pig, Calpastatin, meat tenderness, muscle growth