



**Universitat
de Lleida**



TRABAJO FINAL DE GRADO

MEJORA DE LA CALIDAD DE CARNE EN PORCINO

**Estudio del locus *PCK1* como marcador de
engrasamiento y de la composición de
grasa en porcino**

Clara ORNO BADIA

Grau d'Enginyeria Agrària i Alimentària, UdL

Tutor: Romi PENA i SUBIRÀ

Departamento: Ciència Animal, ETSEA

Lleida, a 27 de Septiembre de 2016

AGRADECIMIENTOS

A Romi Pena por ser la tutora de este trabajo y por todo lo que he aprendido con ella. Gracias por ayudarme siempre.

A Joan Estany por su colaboración, principalmente en el apartado económico, con una alumna que ni siquiera conoce.

A Daniel Villalba por su positivismo y confianza en mí.

A Carlos Cantero por ser mi tutor durante el Grado, por su ayuda constante, en especial, durante el proceso de elección del tema de mi TFG. Costó, pero al final valió la pena. Muchas gracias por todo.

A Sofia Gol por su alegría y buen humor en las horas de laboratorio. También por su paciencia durante la preparación de las muestras de PCR para mandarlas a secuenciar a Portugal.

A Emma Solé, Teresa Giró y Anna Ñaco por los buenos ratos libres.

A Raquel Ibarz por darme ánimos en los momentos de bajón durante la redacción de este trabajo.

A mi familia, por el esfuerzo y dedicación a lo largo de estos cuatro años. Y “sobretot a tú Pare”, por tus conocimientos e ilusión.

Este TFG se ha llevado a cabo en el marco del proyecto AGL2015-65846-R financiado por MINECO.

ESQUEMA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	I
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
RESUMEN	X
RESUM.....	XI
SUMMARY	XII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Contexto del TFG.....	1
1.2. La composición de la grasa intramuscular	2
1.3. La grasa intramuscular y la calidad de la carne de cerdo.....	3
1.3.1. Calidad organoléptica.....	3
1.3.2. Calidad tecnológica	4
1.3.3. Valor nutricional.....	4
1.4. Principales factores que determinan el depósito y composición de grasas en cerdos	5
1.4.1. Relación entre el contenido de grasa y la composición	5
1.4.2. Dieta	6
1.4.3. Fondo genético y marcadores moleculares	7
1.5. Genes mayores relacionados con la calidad de la carne de cerdo. Consecuencias de sus mutaciones.....	9
1.5.1. Gen <i>RYS1</i>	9
1.5.2. Gen <i>RN</i>	10
1.5.3. Genes <i>LEP</i> y <i>LEPR</i>	11
1.5.4. Gen <i>SCD</i>	12
2. ANTECEDENTE: LA MUTACIÓN C.2456C>A DEL GEN <i>PCK1</i> EN CERDOS	13
3. OBJETIVOS.....	15
4. MATERIALES Y MÉTODOS	16
4.1. Material Animal.....	16
4.2. Genotipado del gen <i>PCK1</i>	19
4.2.1. Diseño de los cebadores y sondas de genotipado	19
4.2.2. Preparación del ADN genómico	21
4.2.3. Preparación de la reacción de PCR cuantitativa.....	22

4.3. Análisis estadístico	23
4.4. Caracterización del promotor del gen <i>PCK1</i> :	24
5. RESULTADOS	29
5.1. Comparación de los datos productivos de las dos poblaciones seleccionadas	29
5.2. Resultados del genotipado.....	30
5.3. Estudio de asociación entre la mutación <i>c.2456C>A</i> del gen <i>PCK1</i> y caracteres productivos:..	32
5.3.1. Datos de crecimiento	32
5.3.2. Datos de engrasamiento	33
5.3.3. Datos de composición de grasa.....	34
5.4. Caracterización del promotor	35
6. DISCUSIÓN.....	40
6.1. Implicaciones de la investigación sobre el sector porcino.....	42
7. CONCLUSIONES.....	48
8. BIBLIOGRAFÍA.....	49

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

14:0 Ácido mirístico

16:0 Ácido palmítico

16:1 Ácido palmitoleico

18:0 Ácido esteárico

18:1 Ácido oleico + vaccénico

18:1 n9 Ácido oleico

18:1 n7 Ácido vaccénico,

18:2 Ácido linoleico

18:3 Ácido linolénico

20:0 Ácido eicosanoico

20:1 Ácido eicosenoico

20:2 Ácido eicosadienoico

20:4 Ácido araquidónico

Du: Raza Duroc

GD: Grasa Dorsal

GIM: Grasa IntraMuscular

LD: Raza Landrace

LW: Raza Large White

MUFA: Ácidos Grasos Monoinsaturados (del inglés, *Monounsaturated Fatty Acid*)

PCK1: Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1 (del inglés, *Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1*)

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés, *Polymerase Chain Reaction*)

PUFA: Ácidos Grasos Poliinsaturados (del inglés, *Polyunsaturated Fatty Acid*)

qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real

SEM: Error estándar (del inglés, *Standard Error of the Mean*)

SFA: Ácidos Grasos Saturados (del inglés, *Saturated Fatty Acid*)

SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido (del inglés, *Single Nucleotide Polymorphism*)

TFG: Trabajo Final de Grado

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Nomenclatura de los ácidos grasos más relevantes. (IUPAC 2001)	2
Figura 2. Relación entre el contenido de lípidos neutros (NL) y la composición de ácidos grasos asociados en M. bíceps femoral de las razas Landrace, Duroc, Hampshire y sacrificados a las 6, 7,5 y 9 meses de edad. SFA, ácidos grasos saturados totales; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados totales; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados totales. (Storrukløkken et al. , 2014)	6
Figura 3 Efecto del pH en diferente tiempo post-mortem para distintas calidades de carne. La carne PSE tiene un descenso muy rápido del pH en momentos iniciales del post-mortem, mientras que la carne ácida o efecto Hampshire inicialmente tiene un pH muy similar a la carne normal, pero al pasar un par de horas, el pH ya empieza a decrecer. (Murray, 1995)	11
Figura 4. Esquema de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga, donde la enzima SCD (actividad $\Delta 9$) interviene la ruta de desaturación convirtiendo los ácidos grasos saturados (18:0 y 16:0) en ácidos grasos monoinsaturados (18:1 y 16:1). (Guillou et al., 2010)	12
Figura 5. La acción de la PCK1 (PEPCK) sintetiza fosfoenolpiruvato a partir de oxalacetato (OAA). Su producto puede derivar a distintas rutas metabólicas para producir glucosa (gluconeogénesis), glicerol (gliceroneogénesis) o triglicéridos. (Yang et al., 2009)	13
Figura 6. Los músculos analizados previamente al inicio de este TFG marcados con un recuadro. Vistas laterales de la canal. Adaptación de: (http://www.recipesforlinux.com/2013/12/26/cerdo-despiece-cortes-partes/)	16
Figura 7. Esquema de los cebadores (subrayados) y sonda TaqMan (resaltada en verde) utilizadas para el genotipado de la mutación c.2456C>A del gen PCK1 (en negrita). Intron 3 (en rojo), exon 4 (en azul) y otras posibles mutaciones marcadas con N.....	20
Figura 8. Componentes y funcionamiento de las sondas TaqMan [®] MGB. (http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_053175.pdf)	21
Figura 9. Gráfica en cluster de genotipado obtenida con el programa 7500 Sequence Detection System, Applied Biosystems, como resultado de la PCR cuantitativa en tiempo real.	23
Figura 10. Resultado del programa NCBI Primer-BLAST utilizado para diseñar cebadores del promotor del gen PCK1 con un fragmento de entre 1000 y 1300 bp. Se ha elegido el Primer pair 1 (recuadro en naranja), puesto que es el que mejor abarca los 1200 bp del promotor más proximal.....	25
Figura 11. Secuencia del promotor proximal (en negro) y del primer exón (en rojo) del gen PCK1. La posición correspondiente a los dos cebadores utilizados para su amplificación se muestran resaltados en azul.	25
Figura 12. Resultado de la amplificación con las condiciones optimizadas descritas en las Tabla 13 y Tabla 14. Se observa una banda del tamaño esperado (1200 bp) en las 4 muestras y no en el negativo.....	27
Figura 13. A la izquierda, comprobación del “touch down” con 5 μ l de producto de PCR, el resto se utilizará para realizar una secuenciación. De izquierda a derecha, el primer pocillo del gel de agarosa corresponde al marcador de peso molecular (100 bp), los cinco pocillos siguientes son muestras de ADN de genotipo AA, los cinco que continúan de genotipo CC y el último pocillo corresponde al control negativo. En las muestras 1, 2 y 7 la banda es muy tenue, se repite la PCR de nuevo, por duplicado y se corre un gel (a la derecha).	27
Figura 14. Arriba, gel de agarosa con los productos de PCR limpiados con el QIAquick Gel Extraction Kit. En las muestras 1, 2 y 7 la banda es muy tenue, se repite de nuevo la PCR y la limpieza. En la imagen de	

abajo a la derecha, no se observa la banda de la muestra 7 (tercer pocillo) porque al cargar el gel, la muestra se salió del pocillo. Aunque se sabe que contiene ADN por el gel anterior (previa purificación) que se corrió (abajo izquierda).	28
Figura 15. Gráfica que muestra el genotipado del PCK1 de algunos animales de la población Duroc (izquierda) y LWxLD (izquierda), como resultado de la PCR cuantitativa en tiempo real. En rojo, representa los animales CC, en azul los AA y en verde los heterocigotos.....	30
Figura 16. Electroferograma de un animal de raza Duroc y genotipo AA para el gen PCK1, con el primer Forward. En naranja se redondea una mutación tipo SNP entre una timina (T, curva roja) y una guanina (G, curva negra). Por defecto, el programa coloca una T (rodeado en verde), por lo que habrá que sustituirla por el código oficial para ambigüedades de dos nucleótidos de la IUPAC (Tabla 20).	35
Figura 17. Con el apoyo de la lista de códigos oficiales para ambigüedades de dos nucleótidos de la IUPAC, se ha cambiado la T inicial por una K. Una K significa que puede ser una timina o una guanina...36	
Figura 18. Resultado que muestra el programa MULTALIN al introducir todas las secuencias Forward, excepto la secuencia 7 puesto que no ha amplificado bien y provoca una peor visualización. En rojo se muestra la secuencia del promotor del gen PCK1 común para todas las secuencias, y en azul y negro las mutaciones. En la posición 409, desde el primer nucleótido del promotor, se encuentra la mutación del electroferograma de la Figura 16 y Figura 17.	37
Figura 19. Secuencia del promotor proximal (en negro) y del primer exón (en rojo) del gen PCK1. En ella, se muestran las nueve mutaciones de tipo SNP (en rosa) y los dos cebadores utilizados (resaltados en azul). Los secuencias potenciales de unión de factores de transcripción afectados por los SNPs se señalan con un recuadro o con doble subrayado (ver Tabla 21).	38
Figura 20. Correlación entre el grosor de la grasa dorsal y el porcentaje de magro en la población Duroc (n=1362) de la que proviene el grupo de cerdos Duroc utilizados en este TFG.	44
Figura 21. Correlación entre el grosor de la grasa dorsal y el porcentaje de magro en la población Duroc (n=251) utilizados en este TFG	45
Figura 22. A la izquierda, distribución del % magro inicial en las canales de la población Duroc (n=251), dado el escenario hipotético 2. A la derecha, porcentaje de magro final, en el cual, se ha añadido un 1,23% más de magro en los genotipos CC y AC. En la parte superior de cada intervalo se indica el número de animales que pertenecen a éste. Con flechas se indican las categorías de clasificación de las canales según el BOE, 2011.....	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Atributos relacionados con la calidad de la carne porcina (Coma & Piquer, 1999)	3
Tabla 2. Heradabilidad (h^2) de la grasa intramuscular (IMF, intramuscular fat) y espesor de grasa dorsal (BFT, backfat thickness) en cerdos. (Switonski et al., 2010).	7
Tabla 3. Variabilidad del contenido de grasa intramuscular (IMF) del músculo longissimus dorsi en razas seleccionadas de cerdo. (Switonski et al., 2010).	8
Tabla 4. Algunos ejemplos de genes candidatos relacionados con la producción porcina, en especial, aquellos que afectan al crecimiento y a la calidad de la carne de cerdo. Modificada de (Ernst & Steibel, 2013), (Switonski et al., 2010).....	8
Tabla 5. Número de cerdos (n), media y error estándar (SEM=Desviación estándar/ \sqrt{n}) de los caracteres utilizados en este trabajo, disponibles al inicio de éste, tanto de los animales de raza Duroc como de los cruzados Large White X Landrace.	17
Tabla 6. Secuencias de los cebadores Forward (PCK1_M139L_F) y Reverse (PCK1_M139L_R), y sondas TaqMan. Los primeros se utilizan a una concentración stock mayor.	20
Tabla 7. Número de muestras de ADN de cada placa de dilución.	21
Tabla 8. Ejemplo de diluciones a 30 ng/ μ l y un volumen final de 50 μ l.....	22
Tabla 9. Componentes de la mix que se añadirán en un eppendorf para posteriormente depositar 5 μ l en cada pozo de la placa de PCR. Se ha cogido de ejemplo un número de 100 muestras.	22
Tabla 10. Temperatura y tiempo de cada ciclo de la qPCR.....	23
Tabla 11. Ejemplo de resultado de genotipado por discriminación alélica. Símbolos que aparecen en la gráfica de análisis del genotipado y su significado.	23
Tabla 12. Secuencia de los cebadores del promotor proximal al gen PCK1.	25
Tabla 13. Concentraciones optimizadas para la PCR del promotor PCK1.....	26
Tabla 14. Programa “touch down” optimizado para amplificar el promotor PCK1. Al aumentar la temperatura de hibridación los primeros ciclos, forzamos que solo se amplifiquen los fragmentos que estén bien unidos. Posteriormente, al disminuir la temperatura, se acelera la PCR con aquellos fragmentos de ADN bien unidos.	26
Tabla 15. Frecuencias genotípicas y génicas de la población Duroc en función del número de individuos que presentan cada genotipo. Número de cerdos esperados en cada categoría en equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W)	31
Tabla 16. Frecuencias genotípicas y génicas de la población Large White x Landrace en función del número de individuos que presentan cada genotipo. Número de cerdos esperados en cada categoría en equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W).....	31
Tabla 17. Medias mínimas cuadráticas \pm desviación estándar (SEM) de caracteres de crecimiento en función del genotipo para el gen PCK1 en la población Duroc y Large White x Landrace (LWxLD).	32
Tabla 18. Medias mínimas cuadráticas \pm desviación estándar (SEM) de caracteres relacionados en el depósito de grasa en función del genotipo para el gen PCK1 en la población Duroc y Large White x Landrace (LWxLD).....	33
Tabla 19. Medias mínimas cuadráticas \pm desviación estándar (SEM) de caracteres de composición de la grasa en varios tejidos en función del genotipo para el gen PCK1 en la población Duroc y Large White x Landrace (LWxLD).....	34

Tabla 20. Lista de códigos oficiales para ambigüedades de dos nucleótidos de la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada; International Union of Pure and Applied Chemistry).	35
Tabla 21. Polimorfismos, según el código de IUPAC, la posición en la que se localizan respecto a primer nucleótido del exón 1 y el factor de transcripción que podría reconocer.	38
Tabla 22. Frecuencias alélicas del marcador PCK1 c.A2456C en varias razas y cruces porcinos. Datos de Latorre et al. 2016 y propios de este TFG	41
Tabla 23. Criterio de clasificación de las canales porcinas según RD 1028/2011. (BOE, 2011).	43
Tabla 24. Clasificación de las canales de la población Duroc según su porcentaje de magro.	44
Tabla 25. Número de animales pertenecientes a cada genotipo en el momento inicial y tras el cruzamiento de un alelo A (padre) con uno A o C (madre).....	46
Tabla 26. Número de animales según la categoría de clasificación de las canales en la población inicial y tras cruzar con machos AA (aumento 1,23% magro de los genotipos CC y AC). Entre paréntesis se indica el porcentaje que representa cada categoría en función del total. La columna central señala el porcentaje del cambio de una categoría a otra. También se indican dos semanas de precios de mercado muy diferente; en negrita lo valores más altos.	47

RESUMEN

Una carne de porcino de calidad necesita una cantidad óptima de grasa intramuscular (GIM), que varía en carne fresca o en productos curados. El depósito y la composición de la grasa están relacionados con el fondo genético de cada raza. Por lo que es posible utilizar información de marcadores genéticos para seleccionar por estos caracteres. Dada la correlación genética positiva que existe entre la GIM y la grasa dorsal (GD), la selección por magro conlleva a una disminución indirecta de la GIM. Sin embargo, en la mutación *c2456C>A* descrita por Latorre et al., 2016, el alelo A es el que presenta un mayor contenido de GIM pero una disminución en la GD. Ante esta situación, en este TFG se han genotipado cerdos de la raza Duroc y cruce Large White x Landrace, para validar estos resultados y estudiar el efecto de la mutación en crecimiento y composición de la grasa. Los resultados no han permitido validar los resultados de Latorre et al., 2016 y el marcador tuvo poca influencia sobre la composición de la grasa, particularmente en Duroc. Estos resultados tampoco permiten validar la mutación *PCK1 c2456C>A* como causal. Esto podría ser debido a la interacción de otros genes (pleiotropía) o a la existencia de otra mutación próxima, como las que hemos identificado en el promotor *PCK1*, que sería la causal del efecto diferencial sobre GIM y GD.

Palabras clave: *PCK1*, porcino, polimorfismo, mutación, grasa intramuscular, espesor de grasa dorsal, ácidos grasos

RESUM

Una carn de porcí de qualitat necessita una quantitat òptima de greix intramuscular (GIM), que varia en carn fresca o en productes curats. El dipòsit i la composició del greix estan relacionats amb el fons genètic de cada raça. Pel que és possible utilitzar informació de marcadors genètics per seleccionar per aquests caràcters. Donada la correlació genètica positiva que existeix entre la GIM i el greix dorsal (GD), la selecció per magre comporta una disminució indirecta de la GIM. No obstant això, en la mutació *c2456C>A* descrita per Latorre et al., 2016, l'al·lel A és el que presenta un major contingut de GIM però una disminució en la GD. Davant d'aquesta situació, en aquest TFG s'han genotipat porcs de la raça Duroc i el creuament Large White x Landrace, per validar aquests resultats i estudiar l'efecte de la mutació en creixement i composició del greix. Els resultats no han permès validar els resultats de Latorre et al., 2016 i el marcador va tenir poca influència sobre la composició del greix, particularment en Duroc. Aquests resultats tampoc permeten validar la mutació *PCK1 c2456C>A* com causal. Això podria ser degut a la interacció d'altres gens (pleiotropia) o a l'existència d'una altra mutació pròxima, com les que hem identificat en el promotor *PCK1*, que seria la causal de l'efecte diferencial sobre GIM i GD.

Paraules clau : *PCK1*, porcí, polimorfisme, mutació, greix intramuscular, profunditat de greix dorsal, àcids grassos

SUMMARY

A quality pigmeat need an optimal intramuscular fat content (IMF), which differs from fresh meat and cured products. The deposit and fat composition are related to the genetic background of each breed. So, it is possible to use information from genetic markers to select for these characters. Because of the positive genetic correlation between IMF and backfat thickness (BT), selection for lean results in an indirect decrease in IMF. However, allele A of the mutation *c2456C>A*, described by Latorre et al., 2016, is having a larger content of IMF but a decrease in BT. In this situation, pigs Duroc and Large White x Landrace crossing were genotyped to validate these results and to study the effect of the mutation in growth and fat composition. The results differ from the results of Latorre et al., 2016 and the marker had little influence on the composition of fat, particularly in Duroc. These results confirm that the mutation *PCK1 c2456C>A* is not causal. This could be due to the interaction of other genes (pleiotropy) or to the existence of another close mutation, as we have identified in the promoter, which would be the causal of differential effect on IMF and BT.

Keywords: *PCK1*, pig, polymorphism, mutation, intramuscular fat, backfat thickness, fatty acids

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Contexto del TFG

La selección del cerdo, basada en el control de los rasgos fenotípicos, ha permitido cambios importantes en las propiedades del cerdo y de su carne. Durante el último medio siglo, el objetivo principal de la selección ha sido la obtención de canales magras y cerdos con un eficiente índice de conversión alimenticia. Desde los años sesenta, dicho índice se ha reducido desde 4.3 hasta 2.2 Kg pienso/Kg peso vivo y el espesor de grasa dorsal (GD) de unos 3 cm hasta unos pocos mm. Se ha comprobado que hay una fuerte correlación genética negativa entre la medida de ultrasonido de la grasa dorsal en animales vivos y el contenido magro de la canal de manera que seleccionando por valores menores de grasa dorsal se consiguen canales más magras. Sin embargo, la reducción de grasa dorsal también ha propiciado un descenso del contenido de grasa intramuscular (GIM) de cerca del 3% inicial hasta valores cercanos o inferiores al 1%, según la raza. Ello se debe a que existe una correlación genética positiva de hasta 0.60 entre estos dos rasgos y al seleccionar en contra de uno, se selecciona también indirectamente en contra del otro.

Actualmente, los cerdos son muy eficientes en cuanto a la conversión del alimento en músculo. Sin embargo la carne necesita de cierto contenido de grasa intramuscular para garantizar una óptima calidad (sección 1.3). Muchos rasgos de la calidad sensorial de la carne tales como el sabor y la jugosidad son fuertemente dependientes del contenido de grasa intramuscular. Otros parámetros más relacionados con la calidad tecnológica de la carne, como la capacidad de retención de agua o la capacidad de enranciamiento de la grasa dependen del contenido y la composición de la GIM. Pero conseguir canales magras y con un óptimo contenido de grasa intramuscular no es fácil debido a la correlación genética positiva entre la GIM y la GD, y por la dificultad en la medición de la grasa intramuscular *in vivo*. Así, por todo lo anterior, los objetivos de selección van actualmente dirigidos a aumentar la grasa intramuscular sin modificar la dorsal o, alternativamente, a disminuir la grasa dorsal sin reducir la grasa intramuscular.

Una de las posibles vías para facilitar este objetivo es disponer de marcadores moleculares asociados a estos efectos. La selección asistida por marcadores se ha estado llevando a cabo en las últimas dos décadas con marcadores de genes con un efecto directo sobre las características de la carne o canal (sección 1.4). Muchos de estos marcadores genéticos son polimorfismos de un único nucleótido (*SNP*; por sus siglas en inglés *Single Nucleotide Polymorphism*). El más utilizado en porcino ha sido el *RYR1* c.1843C>T, o gen del halotano, que tiene una fuerte influencia en calidad de la carne y conformación de la canal. Otros se encuentran en el locus de *IGF2*, que tiene fuertes efectos sobre la musculatura, o en *MC4R*, que está implicada en la regulación del comportamiento de alimentación, modificando de esta manera el contenido de grasa de la canal y de carne. Todos estos marcadores de genes fueron descubiertos en el cerdo mediante estudios de mapeo genético y utilizando información de mutaciones observadas en ratones o seres humanos.

El presente trabajo se centra en el estudio de un marcador molecular en el gen *PCK1*. La motivación para escoger este gen se describe en el apartado 2.

1.2. La composición de la grasa intramuscular

La grasa intramuscular comprende los lípidos tanto en el tejido adiposo intramuscular (células grasas localizadas a lo largo de las fibras y en las zonas interfascicular) como en las fibras musculares (Gandemer, 2002). Mientras que el tejido adiposo intramuscular tiene una función de almacenamiento y en su mayoría contiene lípidos neutros (principalmente triglicéridos), la principal contribución de las fibras musculares a GIM son fosfolípidos (lípidos de la membrana celular con una función estructural).

El contenido y la composición de la grasa intramuscular son dos de las características más importantes que afectan a la calidad de la carne de cerdo, y en especial, de los productos curados de alta gama. Desde una perspectiva bioquímica, los ácidos grasos son moléculas formadas por cadenas de hidrocarburos no ramificadas con un residuo carboxílico (COOH) en uno de sus extremos (Frayn, 1998). Los ácidos grasos que componen la grasa se pueden agrupar en tres grupos (ver Figura 1): saturados (SFA, sin dobles enlaces entre las cadenas de carbono), monoinsaturados (MUFA, con un doble enlace entre las cadenas de carbono) y poliinsaturados (PUFA, con varios dobles enlaces entre las cadenas de carbono).

En el caso de la carne de cerdo, los MUFA son los ácidos grasos más abundantes (aproximadamente el 45-50% de los ácidos grasos totales), seguidos por SFA (30-35%) y PUFA (10-15%) (Fraga et al., 2009). En general, los principales ácidos grasos en la carne de cerdo son el ácido oleico (18:1; >30% de ácidos grasos totales, alcanzando 45% en la población Duroc aquí estudiada), ácido palmítico (16:0; ~ 20%), ácido esteárico (18:0; ~ 10%), y el ácido linoleico (18:2; ~ 10%).

El contenido y la composición de la GIM están relacionados entre sí y están afectadas por varios factores, incluyendo la genética, lo que los hace susceptibles de ser mejoradas genéticamente a través de la selección.

Nombre común	Nombre sistemático	Fórmula química
Saturados		
Ácido Butírico	butanoico	4:0
Ácido Mirístico	tetradecanoico	14:0
Ácido Palmítico	hexadecanoico	16:0
Ácido Esteárico	octadecanoico	18:0
Monoinsaturados		
Ácido Palmitoleico	hexadeca-9-enoico	16:1(ω -7)
Ácido Oleico	octadeca-9-enoico	18:1(ω -9)
Ácido Vacénico	octadeca-11-enoico	18:1(ω -7)
Poliinsaturados		
Ácido Linoleico	octadeca-9,12-dienoico	18:2(ω -6)
Ácido γ -Linolenico	octadeca-6,9,12-trienoico	18:3(ω -6)
Ácido α -Linolenico	octadeca-9,12,15-trienoico	18:3(ω -3)
Ácido Araquidónico	eicosa-5,8,11,14-tetraenoico	20:4(ω -6)

Figura 1. Nomenclatura de los ácidos grasos más relevantes. (IUPAC 2001)

1.3. La grasa intramuscular y la calidad de la carne de cerdo

La definición de calidad de carne engloba diferentes propiedades y atributos de gran importancia para el sector productivo, la industria y el consumidor (Davoli & Braglia, 2008) definiendo la calidad de la carne como la suma de todos los aspectos y propiedades sensoriales, nutricionales y tecnológicas que influyen el valor del producto para el consumidor y la industria cárnica (López-Bote et al., 1998).

Tabla 1. Atributos relacionados con la calidad de la carne porcina (Coma & Piquer, 1999)

Categoría	Atributos
Calidad sensorial	Color Terneza Jugosidad Sabor Olor Cantidad de grasa visible Veteado
Calidad nutritiva	Cantidad de grasa Composición de ácidos grasos Valor proteico
Calidad tecnológica	pH Capacidad de retención de agua Consistencia de la grasa Separación de tejidos Estabilidad oxidativa

Tal y como muestra la Tabla 1 son varios los atributos relacionados con la calidad de la carne, destacando entre ellos la jugosidad, la terneza, la textura, la capacidad de retención de agua y el sabor por su especial interés sobre la aceptación del consumidor. Estos atributos dependen de la composición del músculo, es decir, del tipo de fibras musculares que está compuesto, así como del porcentaje y ratio músculo/grasa que éste posee en el momento del sacrificio y de los cambios que se derivan del proceso de maduración de músculo a carne. A su vez, la composición del músculo viene determinada por factores dietéticos, de manejo, bienestar animal y genéticos siendo el contenido y la composición de la GIM dos de los parámetros con más efecto sobre la calidad sensorial, nutricional y tecnológica de la carne, afectando la textura, la jugosidad, la capacidad de retención de agua y el sabor de la carne (Olsson & Pickova, 2005).

1.3.1. Calidad organoléptica

En general se reconoce que el contenido en GIM tiene un efecto favorable sobre los atributos sensoriales de la carne de cerdo. Los mecanismos por los que la GIM podría mejorar la calidad organoléptica no son totalmente claros tampoco. Se especula que las células de grasa entre fascículos de fibras musculares pueden separar físicamente y promover la ternura (Wood, et al., 2003). La jugosidad podría ser mejorada por los lípidos que atrapan la humedad (Wood et al., 2003) y la

estimulación de la secreción de saliva (Ruiz-Carrascal et al., 2000). La oxidación de lípidos y las reacciones de Maillard durante la cocción, transforman los ácidos grasos en compuestos volátiles que contribuyen al sabor característico de la carne de cerdo (Cameron et al., 2000; Gandemer, 2002). Algunos informes sugieren que hay un umbral, estimado en 1,5% (Fortin et al., 2005), por encima del cual un aumento en el nivel de GIM no mejora atributos sensoriales relacionados con la aceptabilidad del producto fresco por parte del consumidor. Sin embargo el veteado (o marmoleo) de grasa infiltrada entre las fibras musculares afecta a la percepción de los consumidores de carne. Varios estudios determinaron los niveles óptimos de GIM para la aceptabilidad del consumidor. Esto varía dependiendo de las preferencias culturales y también del tipo de producto. Por ejemplo, para carne fresca de cerdo, el óptimo se encuentra en la 1,5 a 3,5%, pero en productos curados de cerdo ibérico de alta calidad niveles de hasta un 12% son muy valorados (Ventanas et al., 2007).

La composición de GIM también afecta a la calidad organoléptica de la carne. En general, SFA y MUFA se relacionan positivamente con mejores atributos, en oposición a PUFA. Esto es válido para el sabor, terneza y jugosidad (Ruiz-Carrascal et al., 2000). Cameron et al. (2000) describieron correlaciones positivas de 18:1 con sabor a carne de cerdo y la aceptabilidad general (0,36-0,40). Sin embargo, ya que el contenido y la composición GIM están relacionados entre sí (Sección 1.4), sigue siendo incierto si esto refleja el efecto del contenido de GIM en lugar de los propios ácidos grasos.

1.3.2. Calidad tecnológica

El contenido en GIM está relacionado con la capacidad de retención de agua, y un cierto porcentaje de GIM es indispensable para un adecuado sabor y una correcta maduración durante el proceso de secado de los productos curados (López-Bote et al., 1998). Por estos y otros motivos, entre los caracteres relacionados con la calidad de carne, la cantidad de GIM ha sido hasta la fecha uno de los caracteres más estudiados y es uno de los objetivos de selección más al alza. En general, una mayor concentración de ácidos grasos poliinsaturados son indeseables en cuanto a calidad tecnológica (Wood et al., 2003; Webb & O'Neil, 2008). El punto de fusión de los ácidos grasos disminuye con la insaturación y, como consecuencia, el contenido de PUFA afecta negativamente a la firmeza de la grasa y también el color de la grasa, que es más amarillento cuando los ácidos grasos con puntos de fusión bajos son más abundantes. Al mismo tiempo, los ácidos grasos más insaturados son más propensos a la oxidación, ya sea por la acción química directa o por actividad enzimática lipolítica. La oxidación de lípidos afecta negativamente a la vida útil del producto, causando problemas de enranciamiento de las grasas.

1.3.3. Valor nutricional

La carne es una fuente principal de grasa en la dieta y su composición de ácidos grasos determina su valor nutricional. Mientras que la ingesta total de grasas está claramente asociada con enfermedades como la obesidad, no hay evidencia de efectos significativos sobre la enfermedad cardiovascular o la incidencia de cáncer (FAO, 2010). En lugar de la cantidad total de grasa, es su composición de ácidos grasos que tiene un impacto en el riesgo de enfermedad cardiovascular. La ingesta de SFA ha sido ampliamente asociada con un aumento de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y colesterol total en sangre, considerados indicadores de riesgo de enfermedad cardiovascular (FAO, 2010). La reducción de la ingesta total de grasas se ha demostrado ser una estrategia ineficaz para superar este problema

(Hooper et al., 2012). En cambio, los reemplazos de SFA con ácidos grasos insaturados pueden reducir los niveles de colesterol y el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Hooper et al., 2012).

El creciente interés por los productos saludables ha incrementado además la importancia de la composición de la grasa ligada a la carne. En este sentido, si bien la ingesta de carne de cerdo ha estado tradicionalmente sometida a recomendaciones de bajo consumo debido a su alto contenido en grasa, diversos trabajos han mostrado en los últimos años que el perfil de ácidos grasos de animales seleccionados genéticamente y/o sometidos a una alimentación especial (p. ej. el cerdo ibérico) puede resultar incluso beneficioso para los humanos desde el punto de vista del riesgo cardiovascular (Stewart et al., 2001). Por ello, en la producción de porcino de calidad, no sólo deben tenerse en cuenta aspectos sensoriales, sino también insistir en la posibilidad de conseguir un producto que presente una composición en ácidos grasos compatible con una alimentación cardiosaludable.

En cuanto a los PUFA, los ácidos grasos omega-3 y omega-6 tienen que distinguirse. Ambos son esenciales en los seres humanos, es decir, que no pueden ser sintetizados *de novo* y deben ser suministrados por la dieta, principalmente por la carne y el pescado. Sin embargo, mientras que los PUFA omega-3 son ampliamente considerados como beneficiosos para la salud humana y tienen propiedades quimioprotectoras, se conocen algunos efectos desfavorables para el PUFA omega-6 si su ingesta es excesiva. Estos ácidos grasos poliinsaturados, y principalmente el ácido araquidónico (C20:4), se oxidan fácilmente y sus productos de peroxidación podrían tener efectos adversos para la salud como el aumento del riesgo de desarrollar cáncer de mama (Jiménez-Colmenero et al., 2001).

La Organización para la Agricultura y la Alimentación y la Organización Mundial de la Salud de las Naciones Unidas (FAO, 2010) recomienda un 15-35% de grasa de la ingesta total de energía, una ingesta de SFA máximo del 10% de la energía total, y una ingesta de ácidos grasos poliinsaturados de 6 -11% de la energía total (2.5-9% y 0,5-2% de ácidos grasos omega-6 y omega-3 PUFA, respectivamente). No hay límites para la ingesta de ácidos grasos monoinsaturados en estas recomendaciones.

1.4. Principales factores que determinan el depósito y composición de grasas en cerdos

1.4.1. Relación entre el contenido de grasa y la composición

Los depósitos de grasa se pueden dividir en dos fracciones: los lípidos neutros (principalmente triglicéridos) y fosfolípidos. Debido a que los fosfolípidos son un componente de las membranas celulares en las fibras musculares, su cantidad en el músculo se mantiene casi constante a lo largo del engorde (Wood et al. 2008). Los fosfolípidos tienen un mayor contenido de PUFA que los lípidos neutros. Durante el engorde de los animales, el exceso de energía se acumula en los adipocitos (tanto intermusculares como de la grasa subcutánea). A medida que el tejido adiposo se desarrolla, la síntesis endógena de SFA y MUFA aumenta y resulta en una mayor acumulación de lípidos neutros en los adipocitos. Esto conduce a una composición diferencial de estas dos fracciones.

Así, cuando aumenta el contenido del GIM, aumenta la fracción de lípidos neutros (y por lo tanto, SFA y MUFA), mientras que la fracción de fosfolípidos (y por lo tanto, PUFA) disminuye relativamente. Por lo tanto, SFA y MUFA se correlacionan positivamente con el contenido del GIM, y el PUFA negativamente. El contenido de GIM aumenta con la edad del animal. De hecho, el depósito de GIM es

un proceso tardío en la vida de los cerdos. En consecuencia de lo anterior, con la edad aumenta la proporción de grasas SFA y MUFA, mientras que los PUFA se mantienen bastante constantes (Figura 2).

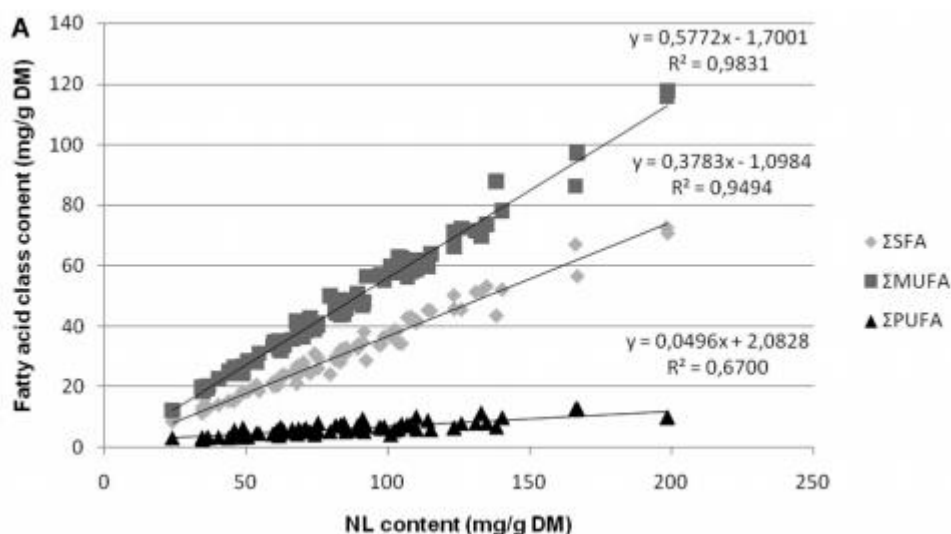


Figura 2. Relación entre el contenido de lípidos neutros (NL) y la composición de ácidos grasos asociados en M. biceps femoral de las razas Landrace, Duroc, Hampshire y sacrificados a las 6, 7,5 y 9 meses de edad. SFA, ácidos grasos saturados totales; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados totales; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados totales. (Storrustløyken et al., 2014)

1.4.2. Dieta

En oposición a los rumiantes, en los animales monogástricos, como el cerdo, los ácidos grasos de la dieta no se modifican durante su paso a través del sistema digestivo y se depositan en la GD y en el músculo. Como consecuencia, los tejidos adiposos del cerdo reflejan la composición de ácidos grasos de la dieta. La alimentación con ácidos grasos suplementarios han demostrado ser una estrategia útil en la modificación de la composición de la grasa de cerdo, y sobre todo, ha habido un interés particular para los ácidos grasos PUFA omega-3. Por ejemplo, el contenido de 18:2 y 18:3 puede ser fácilmente modificado por la dieta, del 10-15% a más del 30%, aunque pueden aparecer consecuencias adversas en los atributos sensoriales (Wood et al., 2003). Del mismo modo, el contenido en 18:1 también se puede modificar por la dieta, sin alterar negativamente la calidad organoléptica. Esta estrategia es evidente por ejemplo en los cerdos ibéricos alimentados con bellota (cuyo contenido en ácido oleico corresponde al 55-65% de los ácidos grasos totales). El jamón fresco de estos cerdos puede alcanzar contenidos de 18:1 de hasta ~ 55% de los ácidos grasos (Tejeda et al., 2002).

Sin embargo, debido a que SFA y MUFA pueden ser sintetizados de forma endógena, su contenido final se ve menos afectada por la dieta que el contenido de PUFA (Wood et al., 2008). En los cerdos, la síntesis *de novo* podría producir 86% del total de ácidos grasos no esenciales depositado (Kloareg et al., 2007). Es probable que esto suceda, especialmente en cerdos genéticamente más grasos, donde la síntesis *de novo* tiene un mayor impacto relativo.

Una estrategia alternativa para modificar el contenido de grasa y composición a través de la dieta es la alimentación de dietas bajas en proteínas. En este caso, la energía que no se puede utilizar en la síntesis muscular debido a la falta de disponibilidad de aminoácidos se gasta en la síntesis de grasa dando lugar, a un aumento de la GIM (Wood et al., 2004). Por lo tanto, las raciones bajas en proteína

(por debajo de las necesidades teóricas para optimizar la retención de magro) durante las fases de engorde y acabado, puede aumentar la GIM. No obstante, el aporte insuficiente de proteína provoca un descenso en el crecimiento, empeora la transformación del alimento y aumenta el índice de conversión de pienso.

1.4.3. Fondo genético y marcadores moleculares

Es bien conocido que el fondo genético de cada raza condiciona la capacidad de acumular grasa tanto subcutánea como intramuscular. Estos dos caracteres tienen unos valores de heredabilidad media, en torno al 0.3-0.5, aunque algunos trabajos han descrito valores más elevados (Tabla 2). Este hecho se ha utilizado para poder seleccionar en contra de la GD que, como se ha mencionado anteriormente, ha resultado también en una disminución de la GIM.

Tabla 2. Heredabilidad (h^2) de la grasa intramuscular (IMF, intramuscular fat) y espesor de grasa dorsal (BFT, backfat thickness) en cerdos. (Switonski et al., 2010).

Trait	Breed	h^2	Reference
IMF	Large White	0.38	Knapp et al. 1997
	Large White	0.44	Larzul et al. 1997
	Large White	0.35	Hermesch et al. 2000
	Landrace	0.67	Knapp et al. 1997
	Landrace	0.35	Hermesch et al. 2000
	Iberian Pig	0.25	Fernandez et al. 2003
	Duroc	0.39	Suzuki et al. 2005
	Pietrain	0.42	Knapp et al. 1997
	Mean	0.41	
BFT	Landrace	0.56	Kuhlers et al. 2001
	Duroc	0.72	Suzuki and Nishida, 2006
	Duroc	0.58	Kuhlers et al. 2001
	Large White	0.43	Nguyen and McPhee, 2005
		Mean	0.57

En la Tabla 3 se muestra la variabilidad existente en contenido de GIM en algunas de las razas porcinas. En relación a las razas con las que se ha trabajado en este TFG, la línea de cerdo Duroc utilizada tiene un contenido en GIM especialmente alto, en torno al 4.8%. Por otra parte, el cerdo blanco utilizado (cruce entre LargeWhite y Landrace) es mucho más magro y su contenido en GIM corresponde al mostrado en la Tabla 3.

Tabla 3. Variabilidad del contenido de grasa intramuscular (IMF) del músculo longissimus dorsi en razas seleccionadas de cerdo. (Switonski et al., 2010).

Breed	IMF (%)	Reference
Pietrain	1.1	Gotz et al. 2001
	1.3	Laube et al. 2000
	1.7	Florowski et al. 2006b
German Landrace	1.4	Gotz et al. 2001
Polish Landrace	1.3	Florowski et al. 2006b
	1.7	Orzechowska et al. 2008
Polish Large White	1.4	Florowski et al. 2006b
	1.7	Orzechowska et al. 2008
Duroc	2.0	Laube et al. 2000
	2.9	Florowski et al. 2006b
	3.3	Newcom et al. 2004
Zlotnicka Spotted	3.1	Florowski et al. 2006a
Pulawska	2.5	Florowski et al. 2006a
	3.6	Grzeskowiak et al. 2006
Iberian Pig	6.0	Daza et al. 2006
Mangalica	7.5	Hollo 2004

En las últimas dos décadas se ha realizado un gran esfuerzo en la identificación de mutaciones que expliquen las diferencias de engrasamiento entre y dentro de razas. Se ha identificado un gran número de marcadores moleculares asociados a la calidad de carne y de canal en porcino, aunque la gran mayoría tienen un efecto muy pequeño sobre estos caracteres o solo lo manifiestan en ciertas razas. El desarrollo de marcadores moleculares ha revolucionado los planteamientos de la mejora genética puesto que proporcionan información directa acerca del patrimonio genético de los animales desde su nacimiento, acortando así los intervalos generacionales y mejorando los índices de respuesta a la selección. Según la cantidad de información aportada, los marcadores pueden clasificarse como:

Marcadores moleculares neutros, no relacionados con ningún gen en concreto, sino con una región genómica (designada QTL por sus siglas en inglés: *Quantitative Trait Loci*) con las que pueden llevarse a cabo estrategias de selección asistida por marcadores, complementando la información fenotípica con la molecular.

Genes mayores y/o mutaciones causales. Este tipo de marcadores explican una gran parte de la variabilidad fenotípica de un carácter, debido a su acción directa. Un ejemplo es el gen *RYR1*, cuya mutación *c.1843T* aumenta la presencia de carnes PSE (del inglés: pálidas, blandas y exudativas) que constituyen grandes pérdidas para el sector (descrito en más detalle en la Introducción). En la Tabla 4 se muestran ejemplos de diferentes genes candidatos relacionados con la calidad de la carne, crecimiento, composición de la canal, etc. En el apartado 1.5 se detallan algunos de los más relevantes en relación con la calidad de la carne.

Tabla 4. Algunos ejemplos de genes candidatos relacionados con la producción porcina, en especial, aquellos que afectan al crecimiento y a la calidad de la carne de cerdo. Modificada de (Ernst & Steibel, 2013), (Switonski et al., 2010)

Nombre del gen	Símbolo	Rasgos
Acetyl-CoA carboxylase alpha	ACACA	Calidad carne cerdo
Calpastatin	CAST	Calidad carne cerdo

Estrogen receptor 1	<i>ESR1</i>	Tamaño de camada
Fatty acid binding protein 4	<i>FABP4</i>	Calidad carne cerdo
Growth hormone-releasing hormone	<i>GHRH</i>	Crecimiento y composición canal
Insulin-like growth factor 2	<i>IGF2</i>	Crecimiento y composición canal
Leptin	<i>LEP</i>	Crecimiento, engrasamiento y composición corporal
Leptin receptor	<i>LEPR</i>	Composición canal
Melanocortin 4 receptor	<i>MC4R</i>	Crecimiento y composición canal
Myopalladin	<i>MYPN</i>	Composición canal
Myostatin	<i>MSTN</i>	Crecimiento
Prolactin receptor	<i>PRLR</i>	Tamaño de camada y reproducción verraco
Retinal binding protein 4	<i>RBP4</i>	Tamaño de camada
Rendement Napole	<i>RN</i>	Calidad carne cerdo
Ryanodine receptor 1	<i>RYR1</i>	Susceptibilidad al estrés, magrez, calidad carne cerdo
Stearoyl-CoA desaturase	<i>SCD</i>	Calidad carne cerdo
Titin	<i>TTN</i>	Calidad carne cerdo

1.5. Genes mayores relacionados con la calidad de la carne de cerdo. Consecuencias de sus mutaciones

Entre los genes mayores que afectan a la calidad de la carne de cerdo, destacamos: dos genes que afectan la **calidad global del músculo**, (i) el receptor de la rianodina 1 (gen *RYR1* o *HAL*), que regula el transporte del ion calcio (Ca^{++}) a través de las membranas celulares del músculo; (ii) el gen *RN* (*Rendment Napole*) que afecta al contenido de glicógeno en el músculo; dos genes que promueven **engrasamiento**; (iii) el gen de la leptina y (iv) el gen del receptor de la leptina, los cuales están relacionados con el contenido de grasa; y (v) el gen *SCD* (Estearoil-CoA desaturasa) que no afecta al engrasamiento total pero sí a la **composición de la grasa**.

1.5.1. Gen *RYR1*

Una de las mutaciones que ha causado mayores pérdidas en el sector porcino ha sido la causante del síndrome del estrés porcino, también conocido comúnmente como Hipertermia Maligna o síndrome del halotano. El origen de este síndrome se encuentra alrededor de los años 70, cuando la selección se decantó hacia cerdos cada vez más magros. Dos autores (Eikelenboom & Minkema, 1974) demostraron la presencia de este síndrome en animales expuestos al gas anestésico del halotano momentos previos al sacrificio, de ahí su nombre. En cerdos homocigotos para la mutación, el síndrome, además de activarse por la exposición al gas halotano, se presenta bajo situaciones de estrés (por ejemplo, durante el transporte, en peleas o con un ambiente de calor intensivo), motivo por el cual se le conoce además como Síndrome del Estrés Porcino (PSS, del inglés *Porcine Stress Syndrome*).

Los cerdos con alto contenido de carne magra, principalmente las razas Piétrain y Landrace Belga, poseían una gran incidencia de esta mutación autosómica recesiva en el cromosoma 6p11-q21, concretamente en el gen *RYS1* (Receptor de la Rianodina 1), donde ocurre un cambio de un solo nucleótido, de una citosina (alelo normal) por una timina (alelo mutante) a la posición +1843 del gen. Ello provoca una alteración en la secuencia de aminoácidos, en la posición +615, de una arginina a una cisteína (Fujii et al., 1991). Los cerdos homocigotos para esta mutación presentan una intolerancia al estrés, y bajo condiciones estresantes de manejo, el canal del calcio del retículo endoplasmático de las células musculares se queda abierto. Entonces, en el citoplasma se acumula calcio en grandes cantidades, provocando así una contracción muscular, dando lugar a la glicolisis (oxidación de la glucosa para obtener energía para la célula), por lo que disminuye bruscamente el pH muscular (Figura 3) y aumenta rápidamente la temperatura corporal, provocando unos síntomas de taquipnea (aumento de la frecuencia respiratoria por encima de los valores normales), ansiedad, temblores, rigidez muscular, manchas violáceas en la piel e incluso la muerte. Si el cerdo no muere y entra en la cadena de matanza, las carnes son pálidas, blandas y exudativas, también llamadas carnes PSE (del inglés, *Pale, Soft, Exudative meat*). Estos efectos adversos en la apariencia de la carne, inaceptable por los consumidores, provocaron grandes pérdidas en el sector porcino por el decomisado de muchas canales en el matadero.

Actualmente es posible detectar los cerdos portadores de estas mutaciones por lo que se ha seleccionado en contra de ella y sólo quedan algunos cerdos portadores en raza Piétrain, que era la más afectada por esta mutación.

1.5.2. Gen *RN*

El gen Rendimiento Napole (RN) también afecta a la calidad de la carne de cerdo. También se conoce como efecto Hampshire, debido a que sus efectos solamente se han encontrado en animales de raza pura o cerdos cruzados con Hampshire. Se asocia a una reducción del rendimiento de Napole (medida del rendimiento tecnológico en la fabricación de jamón cocido sin fosfatos; ratio de peso cocido respecto al fresco de 100 g de músculo semimembranoso) y canales más magras, pero con un mayor potencial glicolítico. Durante el proceso de maduración, se produce una carne de mala calidad con un pH menor debido a la degradación post-mortem del exceso de glucógeno.

Esta condición se identificó en Francia en los años ochenta (Monin & Sellier, 1985), pero el gen afectado y la mutación responsable no se describieron hasta el año 2000 en el cromosoma 15q21-22 (Milan et al., 2000). El gen responsable es el gen de la *Protein Kinase, AMP-Activated, Noncatalytic, Gamma-3 (PRKAG3)*, que juega un papel clave en la regulación del metabolismo de la energía en el músculo esquelético. La mutación Q200R provoca el cambio de un único aminoácido en la proteína que resulta en un defecto metabólico del glucógeno. La carne de los cerdos portadores del alelo mutado contiene en las fibras musculares blancas, una cantidad elevada de glucógeno, mostrando un descenso rápido del pH post-mortem en músculo (Figura 3) y un potencial glicolítico 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 potencial glucolítico.

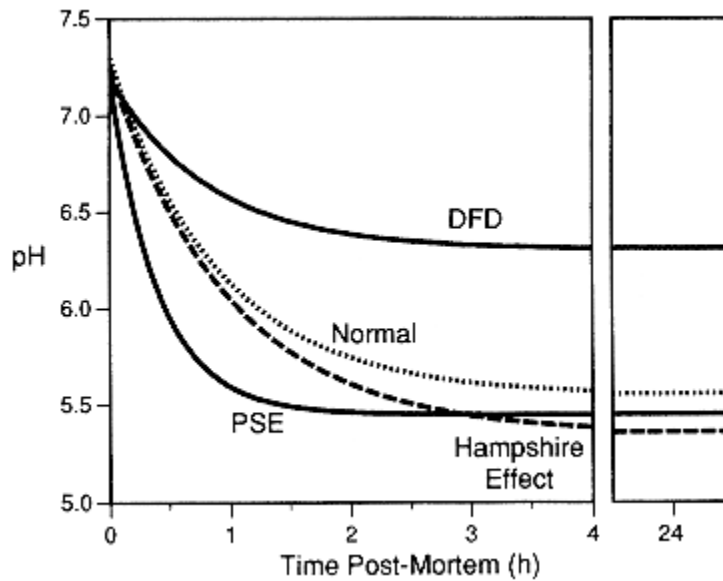


Figura 3 Efecto del pH en diferente tiempo post-mortem para distintas calidades de carne. La carne PSE tiene un descenso muy rápido del pH en momentos iniciales del post-mortem, mientras que la carne ácida o efecto Hampshire inicialmente tiene un pH muy similar a la carne normal, pero al pasar un par de horas, el pH ya empieza a decrecer. (Murray, 1995)

1.5.3. Genes *LEP* y *LEPR*

La leptina, hormona peptídica compuesta por 167 aminoácidos, fue descubierta en 1994 por Jeffrey Friedman e identificada por primera vez como resultado de una mutación genética en un ratón obeso. Es secretada principalmente por las células del tejido adiposo y actúa a través de receptores, que se encuentran en múltiples tejidos, tanto periféricos como centrales (sobre todo en el hipotálamo y tronco cerebral), para controlar el apetito y la ingesta de alimentos en función de las reservas energéticas corporales (Barb et al., 2001). Es decir, su función primordial es la regulación de la ingestión de alimentos y del gasto energético, a largo plazo, para mantener las reservas corporales, de manera que, cuando un individuo está en balance energético positivo, el tejido adiposo secreta mayores cantidades de leptina, ésta es transportada mediante el sistema circulatorio hasta el sistema nervioso central, presentando un estado de saciedad que provoca la disminución en el consumo alimentos y/o apetito (Martínez et al., 2013).

Por tanto, la leptina juega un papel clave en el crecimiento, engrasamiento y composición corporal. En porcino el gen de la leptina se localiza en el cromosoma SSC18. En este gen se han descrito varias mutaciones, tanto en el gen como en su promotor, que afectan el peso vivo y de la canal y el espesor de grasa dorsal (Pérez-Montarelo et al., 2012). El efecto de esta hormona se debe en gran parte a la interacción con su receptor específico, denominado receptor de leptina (*LEPR*). Recientes trabajos han confirmado el efecto del SNP *LEPR* c.1987C>T sobre crecimiento y deposición grasa en diversas razas porcinas (Ovilo et al., 2010). Los alelos T, tanto del *LEP* g.1387C>T como *LEPR* g.1987C>T, presentan un crecimiento, engrasamiento y contenido de ácidos grasos saturados mayor, lo que podría explicarse por un aumento del consumo de pienso. Al favorecer la ingesta de pienso y el contenido

graso de la canal, se observa también un efecto indirecto sobre la composición en ácidos grasos de la grasa (por los motivos comentados en el apartado 1.4).

1.5.4. Gen *SCD*

Las carnes más grasas, en especial, con mayor contenido en grasa saturada (SFA), pueden apreciarse como de peor calidad nutricional, relacionándose negativamente con la prevención de enfermedades metabólicas y cardiovasculares. En cambio, el contenido en MUFA, y de ácido oleico (18:1, n-9), pueden representar un valor añadido al producto. En el organismo, el ácido oleico se forma por desaturación del ácido esteárico (18:0) debido a la acción de la enzima lipogénica esteroil-coA desaturasa (SCD). Concretamente, la enzima SCD es una enzima Δ -9 desaturasa que interviene en la ruta de desaturación de los ácidos grasos de cadena larga, siendo la principal responsable de convertir los SFA en MUFA (Figura 4). En particular, su actividad se asocia a una mayor producción de ácido oleico (18:1, n-9) y palmitoleico (16:1, n-7) a partir del ácido esteárico (18:0) y palmítico (16:0) respectivamente.

Se ha mostrado la existencia de un haplotipo en la región promotora del gen *SCD* asociado con la actividad desaturasa, resultando en un incremento del porcentaje de MUFA sin modificar la cantidad de grasa total (Estany et al., 2014). La grasa intramuscular de los animales también mejora sus niveles de ácido palmitoleico. El efecto es claramente aditivo: cada copia del haplotipo favorable aumenta un 1,3% el contenido en ácido oleico. La selección por esta mutación permitirá obtener productos de alto contenido en oleico, carácter muy apreciado por el consumidor de productos curados.

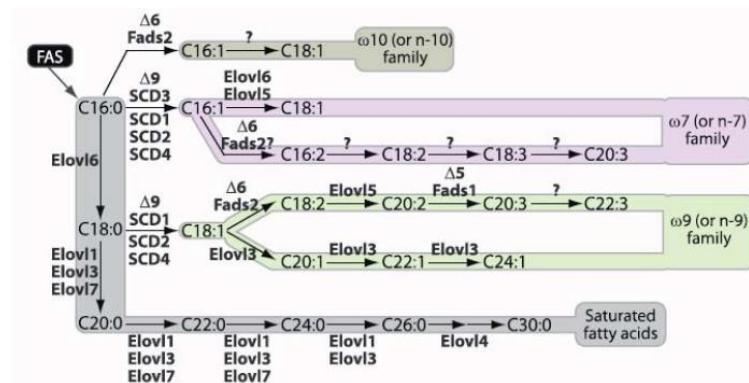


Figura 4. Esquema de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga, donde la enzima SCD (actividad Δ 9) interviene la ruta de desaturación convirtiendo los ácidos grasos saturados (18:0 y 16:0) en ácidos grasos monoinsaturados (18:1 y 16:1). (Guillou et al., 2010)

2. ANTECEDENTE: LA MUTACIÓN C.2456C>A DEL GEN *PCK1* EN CERDOS

Debido a la correlación genética positiva que existe entre la GIM y la GD, no es fácil localizar SNPs que simultáneamente puedan aumentar la GIM y reducir el espesor de GD, para mejorar la calidad de la carne, contribuyendo a la economía de la producción porcina. Sin embargo, en 2007 se describió un ratón transgénico que sobre-expresaba cien veces la forma citosólica del enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (*Pck1*) en músculo esquelético y tenía casi cuatro veces mayor contenido de grasa intramuscular y pequeñas cantidades de grasa subcutánea y visceral. En base a estas observaciones en ratón, el gen *PCK1* (situado en el cromosoma 17 en la región 65-094.783-65-100-751 bp) podría ser un buen candidato para los objetivos en porcino.

El enzima *PCK1* (también conocida como *PEPCK*) participa en el metabolismo de lípidos y carbohidratos, y juega un papel regulador en la gluconeogénesis. En tejidos donde no ocurre la gluconeogénesis, proporciona glicerol-3-fosfato como un precursor para la esterificación de ácidos grasos en la síntesis de triglicéridos, lo que se conoce por gliceroneogénesis (Figura 5).

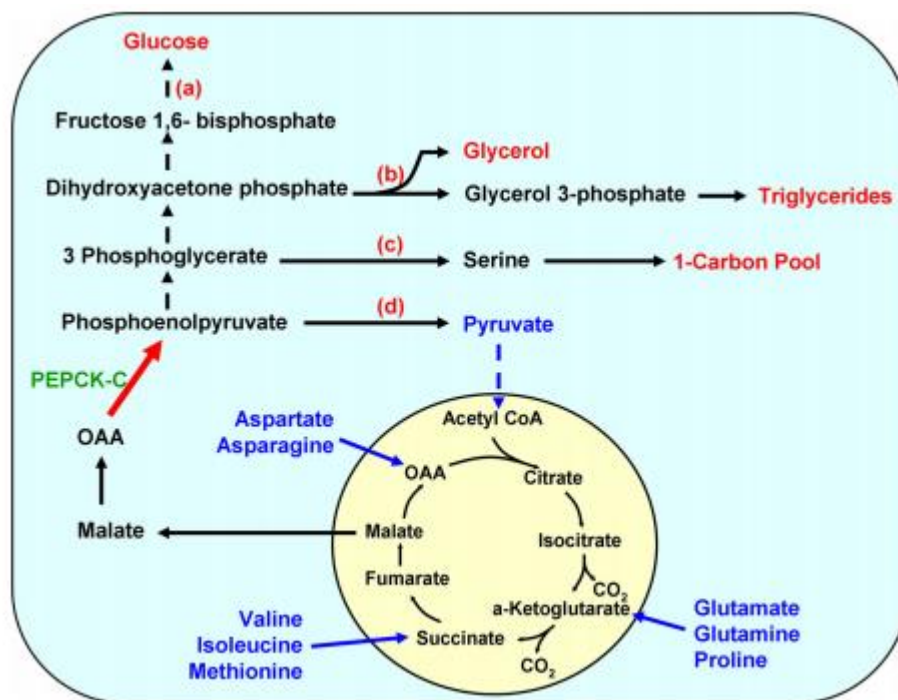


Figura 5. La acción de la *PCK1* (*PEPCK*) sintetiza fosfoenolpiruvato a partir de oxalacetato (*OAA*). Su producto puede derivar a distintas rutas metabólicas para producir glucosa (gluconeogénesis), glicerol (gliceroneogénesis) o triglicéridos. (Yang et al., 2009)

Recientemente (enero 2016), se ha descrito una mutación tipo SNP en el exón 4 del gen *PCK1* porcino fuertemente asociada a un mayor contenido de GIM (hasta un 20,4% más) y a una GD inferior (9,9% menor) (Latorre et al., 2016). Este SNP (código de acceso rs343196765 en el SNPdb del NCBI), de una adenina por una citosina, resulta en la substitución de una metionina en vez de leucina en la posición 139 de la proteína, lejos del sitio activo de la enzima. El alelo *PCK1* c.2456C, que codifica leucina y se asocia con menor GD, está presente en muchas razas o cruces. Aparece con mayor frecuencia en

razas como Piétrain, que han sido seleccionadas por alto contenido en magro. Mientras que el alelo *PCK1 c.2456A*, que codifica metionina y se asocia a una mejor calidad de la carne y distribución de la grasa, se encuentra en razas o cruces más grasos como los derivados de la raza Duroc.

La carne de los cerdos portadores del alelo *PCK1 c.2456A*, presentan una mayor capacidad de retención de agua en varios puntos de tiempo *post mortem*. Sin embargo, este estudio no indagó sobre el efecto que esta mutación podría tener sobre la composición de la GIM, otro fuerte determinante de la calidad (tanto nutritiva, como tecnológica y sensorial) de la carne. Este TFG pretende ser un primer paso a la validación de los resultados en raza Duroc y en el cruce Large White x Landrace, y a estudiar si además del contenido en GIM y GD, hay cambios en la composición de estos dos depósitos grasos.

3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este Trabajo Final de Grado consiste en investigar la relación entre la mutación c.2456C>A del gen *PCK1* porcino y la cantidad y composición de la grasa dorsal e intramuscular de carne fresca de cerdo, a partir de unas muestras de ADN de cerdo de raza Duroc y cruce LWxLD.

Para llevarlo a cabo, se plantean los siguientes subobjetivos:

1. Validar el efecto descrito de la mutación c.2456C>A del gen *PCK1* sobre el contenido de grasa dorsal e intramuscular en cerdos Duroc y Large White X Landrace.
2. Estudiar si esta mutación afecta a la composición de la grasa dorsal y grasa intramuscular de carne fresca de cerdos Duroc y Large White X Landrace.
3. Caracterizar la secuencia del promotor proximal del gen *PCK1* y describir posibles mutaciones.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material Animal

El *Grup de Recerca del Porcí* del Departament de Ciència Animal (UdL) lleva quince años colaborando con la empresa Selección Batallé S.L. que, entre otras, tiene una línea de cerdos Duroc seleccionados para un alto índice de grasa intramuscular (entorno a un 4.8%). Para este TFG se ha utilizado el ADN de 271 cerdos de raza Duroc (proyecto SELGIM; criados en tres lotes de engorde), y 49 cerdos blancos cruzados Large White X Landrace (proyecto CDTI-Creuat; provenientes de dos lotes de engorde), con la intención de comparar los resultados en una raza más grasa y seleccionada por GIM y un cruce más magro seleccionada contra GD.

En ambos grupos de animales se conocen los parentales, el lote, el valor genético del animal, la fecha de nacimiento y se ha controlado un importante número de variables productivas relacionadas con el crecimiento, el engorde, la calidad de la canal y el contenido en composición de grasa en varios tejidos, tal como se describe en la Tabla 5. De todos los cerdos se dispone de datos de contenido y composición de grasa en el músculo *gluteus medius*. En la mitad de los animales estos datos también están disponibles para el músculo *longissimus dorsi* (solo Duroc), el *semimembranosus* (solo Duroc), la grasa subcutánea y el hígado. La comparación de estos datos entre las dos poblaciones se ha llevado a cabo tal como se describe en el apartado 4.3. La Figura 6 muestra la localización de estos músculos en una canal de cerdo.

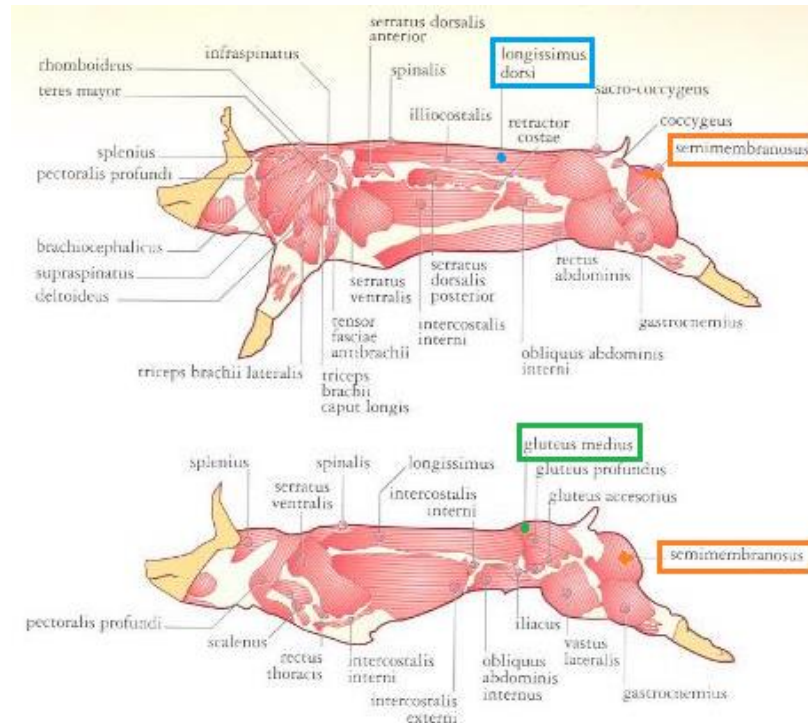


Figura 6. Los músculos analizados previamente al inicio de este TFG marcados con un recuadro. Vistas laterales de la canal. Adaptación de: (<http://www.recipesforlinux.com/2013/12/26/cerdo-despiece-cortes-partes/>)

Tabla 5. Número de cerdos (n), media y error estándar (SEM=Desviación estándar/ \sqrt{n}) de los caracteres utilizados en este trabajo, disponibles al inicio de éste, tanto de los animales de raza Duroc como de los cruzados Large White X Landrace.

Carácter	DUROC		LARGE WHITE X LANDRACE		F (nivel significación)
	n	$\bar{X} \pm \text{SEM}$	n	$\bar{X} \pm \text{SEM}$	
Edad a 80 días	-	-	56	72,14 \pm 0,39	
Peso medio a 80 días (kg)	-	-	56	29,55 \pm 0,82	
Edad a 120 días	273	120,42 \pm 0,17	33	109,82 \pm 0,13	***
Peso medio a 120 días (kg)	273	62,04 \pm 0,59	33	57,67 \pm 1,47	***
Espesor grasa dorsal a 120 días (mm)	273	11,37 \pm 0,18	33	8,71 \pm 0,3	***
Profundidad lomo a 120 días (mm)	273	40,19 \pm 0,2	-	-	
Edad a 160 días	-	-	54	163,59 \pm 0,35	
Peso medio a 160 días (kg)	-	-	54	105,81 \pm 1,34	
Espesor grasa dorsal a 160 días (mm)	-	-	54	12,22 \pm 0,38	
Profundidad lomo a 160 días (mm)	-	-	54	51,69 \pm 0,56	
Edad a 180 días	273	181,53 \pm 0,11	-	-	
Peso medio a 180 días (kg)	273	109,54 \pm 0,57	-	-	
Espesor grasa dorsal a 180 días (mm)	273	18,19 \pm 0,22	-	-	
Profundidad lomo a 180 días (mm)	273	44,8 \pm 0,22	-	-	
Edad final	273	208,05 \pm 0,41	53	199,9 \pm 0,61	***
Peso medio final (kg) a 200 días	273	123,96 \pm 0,58	53	135,59 \pm 1,79	***
Espesor grasa dorsal final (mm) a 200 días	273	21,15 \pm 0,25	53	16,82 \pm 0,49	***
Profundidad lomo final (mm) a 200 días	273	48,51 \pm 0,26	53	55,76 \pm 0,44	***
Edad sacrificio	273	210,08 \pm 0,4	52	203,95 \pm 0,5	***
Peso canal (kg)	270	94,05 \pm 0,46	52	104,52 \pm 1,48	***
Espesor grasa dorsal entre 3ª y 4ª costilla (mm)	251	21,97 \pm 0,23	52	18,47 \pm 0,49	***
Profundidad lomo entre 3ª y 4ª costilla (mm)	251	46,5 \pm 0,44	52	55,13 \pm 0,93	***
Magro (%)	251	44,45 \pm 0,32	52	50,88 \pm 0,57	***
Espesor grasa dorsal entre 3ª y 4ª costilla medido con regleta (mm)	139	27,30 \pm 0,49			
Contenido de GIM del músculo <i>gluteus medius</i> sobre materia seca (%)	268	15,56 \pm 0,31	49	8,12 \pm 0,36	***
14:0 (%) <i>gluteus medius</i>	268	1,57 \pm 0,01	49	1,74 \pm 0,04	***
16:0 (%) <i>gluteus medius</i>	268	24,34 \pm 0,06	49	22,99 \pm 0,22	***
16:1 (%) <i>gluteus medius</i>	268	3,51 \pm 0,03	49	3,43 \pm 0,08	n.s.
18:0 (%) <i>gluteus medius</i>	268	11,43 \pm 0,06	49	10,77 \pm 0,19	***
18:1 (%) <i>gluteus medius</i>	268	45,36 \pm 0,12	49	40 \pm 0,45	***
18:2 (%) <i>gluteus medius</i>	268	10,57 \pm 0,11	49	16,31 \pm 0,44	***
18:3 (%) <i>gluteus medius</i>	268	0,15 \pm 0,003	49	0,11 \pm 0,01	***
20:0 (%) <i>gluteus medius</i>	268	0,53 \pm 0,01	49	0,92 \pm 0,03	***
20:1 (%) <i>gluteus medius</i>	268	0,7 \pm 0,006	49	0,7 \pm 0,012	*
20:2 (%) <i>gluteus medius</i>	268	0,45 \pm 0,004	49	0,58 \pm 0,02	***
20:4 (%) <i>gluteus medius</i>	268	1,39 \pm 0,03	49	2,45 \pm 0,1	***
18:1 n9 (%) <i>gluteus medius</i>	110	39,68 \pm 0,11	49	36,45 \pm 0,44	***
18:1 n7 (%) <i>gluteus medius</i>	110	5,87 \pm 0,05	49	3,53 \pm 0,06	***
SFA (%) <i>gluteus medius</i>	268	37,48 \pm 0,11	49	35,6 \pm 0,36	***
MUFA (%) <i>gluteus medius</i>	268	49,57 \pm 0,13	49	44,13 \pm 0,49	***
PUFA (%) <i>gluteus medius</i>	268	12,95 \pm 0,13	49	20,26 \pm 0,52	***
Contenido de GIM del músculo <i>longissimus dorsi</i> sobre materia seca (%)	130	10,45 \pm 0,27	-	-	
14:0 (%) <i>longissimus dorsi</i>	130	1,63 \pm 0,02	-	-	
16:0 (%) <i>longissimus dorsi</i>	130	24,46 \pm 0,12	-	-	
16:1 (%) <i>longissimus dorsi</i>	130	3,69 \pm 0,04	-	-	
18:0 (%) <i>longissimus dorsi</i>	130	11,83 \pm 0,09	-	-	

18:1 (%) <i>longissimus dorsi</i>	130	46,16 ± 0,18	-	-	
18:2 (%) <i>longissimus dorsi</i>	130	8,78 ± 0,14	-	-	
18:3 (%) <i>longissimus dorsi</i>	130	0,14 ± 0,003	-	-	
20:0 (%) <i>longissimus dorsi</i>	130	0,35 ± 0,004	-	-	
20:1 (%) <i>longissimus dorsi</i>	130	0,73 ± 0,01	-	-	
20:2 (%) <i>longissimus dorsi</i>	130	0,37 ± 0,01	-	-	
20:4 (%) <i>longissimus dorsi</i>	130	1,86 ± 0,04	-	-	
SFA (%) <i>longissimus dorsi</i>	130	38,06 ± 0,2	-	-	
MUFA (%) <i>longissimus dorsi</i>	130	50,58 ± 0,18	-	-	
PUFA (%) <i>longissimus dorsi</i>	130	11,36 ± 0,18	-	-	
Contenido GIM del músculo semimembranoso sobre materia seca (%)	48			-	
14:0 (%) semimembranoso	48	13,58 ± 0,93	-	-	
16:0 (%) semimembranoso	48	1,41 ± 0,02	-	-	
16:1 (%) semimembranoso	48	22,44 ± 0,15	-	-	
16:1 (%) semimembranoso	48	3,53 ± 0,07	-	-	
18:0 (%) semimembranoso	48	10,68 ± 0,12	-	-	
18:1 (%) semimembranoso	48	46,56 ± 0,42	-	-	
18:2 (%) semimembranoso	48	11,4 ± 0,35	-	-	
18:3 (%) semimembranoso	48	0,13 ± 0,003	-	-	
20:0 (%) semimembranoso	48	0,49 ± 0,01	-	-	
20:1 (%) semimembranoso	48	0,79 ± 0,02	-	-	
20:2 (%) semimembranoso	48	0,46 ± 0,01	-	-	
20:4 (%) semimembranoso	48	2,12 ± 0,15	-	-	
18:1 n9(%) semimembranoso	48	40,04 ± 0,37	-	-	
18:1 n7(%) semimembranoso	48	6,51 ± 0,08	-	-	
SFA (%) semimembranoso	48	34,66 ± 0,25	-	-	
MUFA (%) semimembranoso	48	50,88 ± 0,45	-	-	
PUFA (%) semimembranoso	48	14,47 ± 0,49	-	-	
Contenido grasa en la grasa subcutánea sobre materia seca (%)	48		15	76,43 ± 1,52	n.s.
14:0 (%) grasa subcutánea	48	78,96 ± 1,42	30	1,44 ± 0,04	n.s.
16:0 (%) grasa subcutánea	48	1,37 ± 0,02	30	21,76 ± 0,5	n.s.
16:1 (%) grasa subcutánea	48	22,41 ± 0,18	30	2,12 ± 0,07	n.s.
18:0 (%) grasa subcutánea	48	2,13 ± 0,04	30	11,2 ± 0,3	n.s.
18:1 (%) grasa subcutánea	48	11,66 ± 0,15	30	41,98 ± 1,2	n.s.
18:2 (%) grasa subcutánea	48	43,19 ± 0,24	30	17,58 ± 0,43	**
18:3 (%) grasa subcutánea	48	15,96 ± 0,26	30	0,19 ± 0,01	***
20:0 (%) grasa subcutánea	48	0,17 ± 0,003	30	1,35 ± 0,04	*
20:1 (%) grasa subcutánea	48	0,96 ± 0,02	30	1,12 ± 0,03	***
20:2 (%) grasa subcutánea	48	0,94 ± 0,02	30	0,97 ± 0,02	***
20:4 (%) grasa subcutánea	48	0,77 ± 0,01	30	0,29 ± 0,01	***
18:1 n9 (%) grasa subcutánea	48	0,44 ± 0,01	-	-	
18:1 n7 (%) grasa subcutánea	48	38,01 ± 0,22	-	-	
SFA (%) grasa subcutánea	48	5,37 ± 0,06	30	34,58 ± 0,8	n.s.
MUFA (%) grasa subcutánea	48	35,61 ± 0,31	30	45,22 ± 1,14	n.s.
PUFA (%) grasa subcutánea	48	46,26 ± 0,26	30	20,19 ± 0,49	**
Contenido de grasa en el hígado sobre materia seca (%)	48			-	
14:0 (%) hígado	48	16,6 ± 0,43	-	-	
16:0 (%) hígado	48	0,74 ± 0,04	-	-	
16:1 (%) hígado	48	18,81 ± 0,32	-	-	
16:1 (%) hígado	48	1,34 ± 0,07	-	-	
18:0 (%) hígado	48	20,88 ± 0,51	-	-	
18:1 (%) hígado	48	23,13 ± 0,75	-	-	
18:2 (%) hígado	48	20,16 ± 0,21	-	-	
18:3 (%) hígado	48	0,11 ± 0,004	-	-	
20:0 (%) hígado	48	0,77 ± 0,03	-	-	
20:1 (%) hígado	48	0,31 ± 0,01	-	-	
20:2 (%) hígado	48	0,61 ± 0,02	-	-	
20:4 (%) hígado	48	8,45 ± 0,41	-	-	

18:1 n9 (%) hígado	48	20,12 ± 0,68	-	-	
18:1 n7 (%) hígado	48	3,01 ± 0,09	-	-	
SFA (%) hígado	48	42,57 ± 0,34	-	-	
MUFA (%) hígado	48	25,92 ± 0,81	-	-	
PUFA (%) hígado	48	31,51 ± 0,65	-	-	

14:0 ácido mirístico, 16:0 ácido palmítico, 16:1 ácido palmitoleico, 18:0 ácido esteárico, 18:1 ácido oleico (+vaccénico), 18:2 ácido linoleico, 18:3 ácido linolénico, 20:0 ácido eicosanoico, 20:1 ácido eicosenoico, 20:2 ácido eicosadienoico, 20:4 ácido araquidónico, 18:1 n9 ácido oleico, 18:1 n7 ácido vaccénico, SFA ácido graso saturado, MUFA ácido graso monoinsaturado, PUFA ácido graso poliinsaturado.
 (-) para datos no disponibles
 (n.s.) para no significativo
 (*) para $P < 0.05$
 (**) para $P < 0.01$
 (***) para $P < 0.001$

4.2. Genotipado del gen *PCK1*

El genotipado de la mutación *c.2456C>A* del gen *PCK1* (rs343196765) tanto en la población de cerdos Duroc como en los cruzados (Large White X Landrace) fue resuelto por PCR cuantitativa (qPCR) en tiempo real (7500 Sequence Detection System, Applied Biosystems) con un protocolo de discriminación alélica con sondas *TaqMan* alelo-específicas.

El objetivo de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa, del inglés, *Polymerase Chain Reaction*) cuantitativa en tiempo real (qPCR) es detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de reporteros o sondas fluorescentes en la reacción (Tamay de Dios, 2013). El producto de amplificación es monitoreado a medida que sucede la reacción, sin la necesidad de que posteriormente sea visualizado el producto de PCR en un gel de agarosa para conocer si la reacción en cadena de la polimerasa tuvo éxito, como ocurre en la PCR en punto final. Aunque el volumen utilizado sea muy pequeño, el sistema presenta una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia. Los componentes químicos de la PCR en tiempo real son los mismos que los utilizados en la PCR en punto final; la enzima (*Taq* polimerasa), los dNTPs, el $MgCl_2$, el tampón o *buffer*; pero se añade un fluorocromo para detectar los productos amplificados. Estos reactivos pueden comprarse juntos formando una «Master mix», y el agua y los cebadores o *primers* son proporcionados a parte. Éstos últimos deben ser diseñados, utilizando programas informáticos, como por ejemplo el Primer 3 Plus o NCBI Blast Primer, para conseguir una alta especificidad, generando fragmentos de entre 80-150 pb para conseguir eficiencias de amplificación cercanas al 100%. En amplicones más grandes, la eficiencia de la reacción decrece considerablemente.

4.2.1. Diseño de los cebadores y sondas de genotipado

La mutación que se quiere estudiar está al principio del exón 4 del gen *PCK1*. Es por lo tanto necesario tener información del intrón 3 precedente al exón 4. Se obtuvo esta información de la versión 10.2 del genoma porcino en la base de datos de Ensembl (http://www.ensembl.org/Sus_scrofa/). En Ensembl también hay información disponible sobre otras mutaciones descritas en este gen. Se marcaron todas las mutaciones descritas en el intrón 3 y exón 4 con una N. De esta manera, forzamos a que los programas de diseño de cebadores no los situaran en zonas afectadas por mutaciones donde los

cebadores podrían no unirse en algunos animales o unirse con menos eficiencia. En la Figura 7 se muestra la secuencia del intrón 3 y exón 4, la posición de las mutaciones, el marcador diana y los cebadores y sonda utilizados. La Tabla 6 contiene información adicional sobre los cebadores y las sondas TaqMan diseñadas.

```

GTGAGTGAAANCTTTACCTGATTGGGTGAAATATCAGNNAAACTTTTCTC
ATCGATCTGGCCTNATGGTAGTTGTAATAGAACCCTCCCGTGGCCTCNGCG
AGCTTTAAATTCCGTGTGTGAAATGGGCCGNGTATTGACACTGCCAGCG
CAGTGTGGCTGGATAGACTGACTTGCGTGGCCATGGAAACAGTTTCCACG
CACGCAGCGGAAGACAGCTTGGAGGGACCCAGCTGCGNGNTGGTGAAAA
GTCTTTCAATTTGGGGGCTCTGTTCACTCTCCAGTGGGCTCCTCCAAATCG
GGGAGGGGTGCCAGCGCAAAGGGGCGGTGTTGTCCAAGGGGGATCAGGAG
GAGGGTCNCCGGGGACACNGGGGGTGGCGGCTGGGGAGTCCGGGGTGACC
CCTCACCCGCTGCCCCCTGCTGCCCCCNAGTTTCCAAATTCCTAA
GTCATCCCCTTCAGCATGGGGCCCCCTGGGCTCGCCCCGTGCCAAGATTGG
CATCGAGCTGACGGACTCGCCCTACGTGGTGGCCAGCATGCGCATCATGA
CGCGGATGGGCTCGGCCGTCTGGACGCGCTGGGGGCGGGCGAGTTCATC
AAGGGCCTNCACTCCGTGGGNTGCCCCCTGCCTTTGNAAAGTAAGCAGGT
GCATTTCCAAATCGACAGCTGGAGNTGGGAAAAAA

```

Figura 7. Esquema de los cebadores (subrayados) y sonda TaqMan (resaltada en verde) utilizadas para el genotipado de la mutación c.2456C>A del gen PCK1 (en negrita). Intron 3 (en rojo), exon 4 (en azul) y otras posibles mutaciones marcadas con N.

Tabla 6. Secuencias de los cebadores Forward (PCK1_M139L_F) y Reverse (PCK1_M139L_R), y sondas TaqMan. Los primeros se utilizan a una concentración stock mayor.

Nombre cebador/sonda	Marcaje	Secuencia 5' → 3'	Concentración stock 10x
PCK1_M139L_F		GGCGTGTGTCCAAGGG	9 uM
PCK1_M139L_R		CCCATGCTGAACGGGATGA	9 uM
PCK1_M139L_V	VIC (verde)	AGGTCGCACGATGTAT	2 uM
PCK1_M139L_M	FAM (azul)	AGGTCGCACGCTGTAT	2 uM

Para la detección específica del alelo se utilizó dos sondas fluorescentes, sondas comerciales conocidas como **TaqMan® MGB** (Figura 8) formadas por un *reporter* fluorescente unido covalentemente al extremo 5' y un *quencher* en el extremo 3'. Éste último inhibe la fluorescencia del *reporter* cuando es excitado por la fuente de luz del termociclador. Mientras el fluorocromo y el *quencher* estén próximos el uno al otro, no habrá señal fluorescente, puesto que el *quencher* está ejerciendo su actividad inhibitora. Entonces, a medida que la *Taq* polimerasa sintetiza la cadena en sentido 3'→5', la actividad exonucleasa 5'→3' de esta misma enzima degrada la sonda TaqMan ya hibridada al ADN. Con la degradación de la sonda, se separa el fluorocromo, rompiendo la proximidad entre éste y el *quencher*, logrando que la fluorescencia emitida por el *reporter* sea liberada y capturada por el equipo. La fluorescencia detectada en el termociclador de la PCR cuantitativa es directamente proporcional a la del fluorocromo liberado y la cantidad de ADN molde presente en la PCR. El fluorocromo VIC® está unido al extremo de 5' de la sonda del alelo A y el fluorocromo FAM™ está unido al extremo de 5' de la sonda del alelo C. Hay que tener en cuenta que la temperatura de *melting* tiene que ser 10°C mayor que la de los cebadores para que la sonda hibride antes que los *primers*. Estos métodos son muy específicos, puesto que mientras no haya unión de la sonda a la secuencia diana, no habrá amplificación ni tampoco señal de fluorescencia.

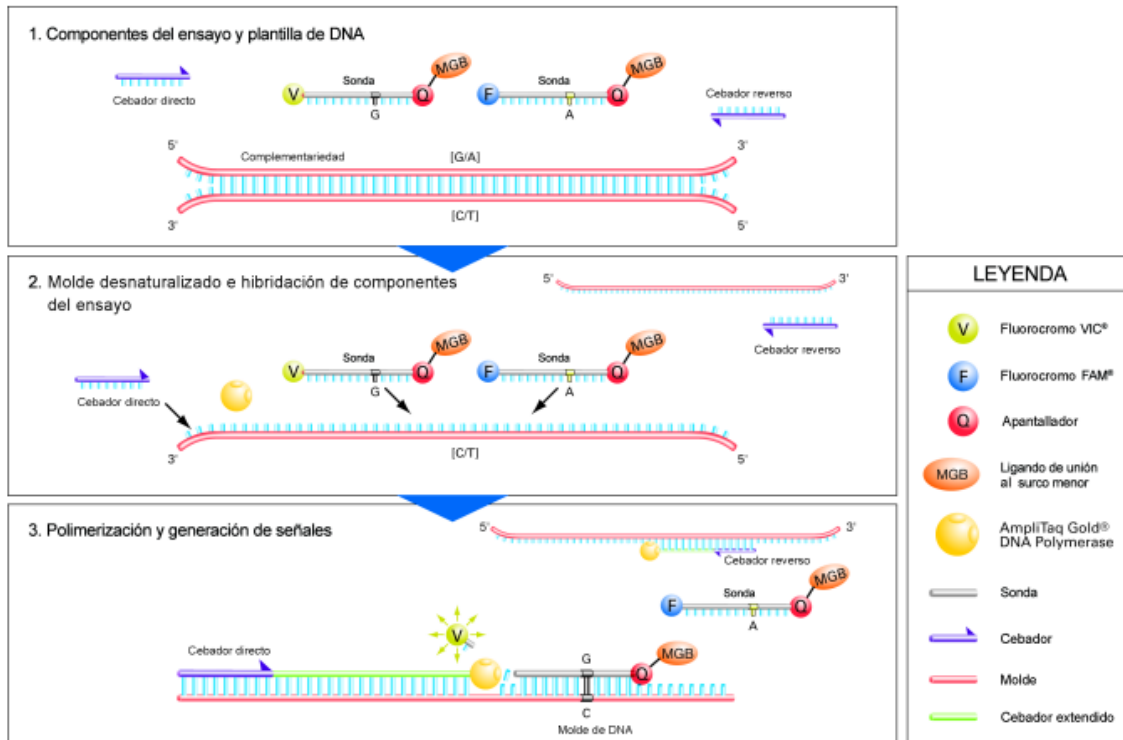


Figura 8. Componentes y funcionamiento de las sondas TaqMan® MGB. (http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_053175.pdf)

4.2.2. Preparación del ADN genómico

Aunque el ADN genómico de los animales estaba disponible al inicio de este TFG, fue necesario cuantificar los ADNs para preparar placas de dilución adecuadas a este procedimiento de genotipado.

La cuantificación se realizó con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000, a partir de 2 µl de muestra. Una vez conocidas las concentraciones del ADN, se prepararon 4 placas de ADN (Tabla 7) de 96 pocillos cada una con diluciones a 30 ng/µl y un volumen final de 50 µl. En función de la concentración medida con el Nanodrop, se añadió un determinado volumen de ADN al pocillo de la placa correspondiente, enrasando a 50 µl con agua (ejemplos en la Tabla 8).

Tabla 7. Número de muestras de ADN de cada placa de dilución.

Total	DUROC			LW x LD
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4
86	96	89	49	
320	271		49	

$$V_{ADN} \cdot C_{ADN \text{ NanoDrop}} = V_{Final} \cdot C_{Final}$$

$$V_{ADN} \cdot C_{ADN \text{ NanoDrop}} = 30 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \cdot 50 \mu\text{l}$$

$$V_{ADN} = \frac{1500 \text{ ng}}{C_{ADN \text{ NanoDrop}}}$$

Tabla 8. Ejemplo de diluciones a 30 ng/μl y un volumen final de 50 μl.

Nº Placa	Muestra ADN	Concentración medida en el NanoDrop (ng/μl)	Volumen de ADN (μl)	Volumen de H ₂ O (μl)
1	6	340,4	1500/340,4=4,41	50-4,41=45,59
2	16	507,3	1500/507,3=2,96	50-2,96=47,04

4.2.3. Preparación de la reacción de PCR cuantitativa

Una vez tenemos el ADN a la concentración deseada, hay que preparar en un tubo eppendorf la mix siguiente (Tabla 9). Es importante mezclar con el vórtex todos los reactivos siempre antes de usar.

Tabla 9. Componentes de la mix que se añadirán en un eppendorf para posteriormente depositar 5 μl en cada pozo de la placa de PCR. Se ha cogido de ejemplo un número de 100 muestras.

Reactivos	Volumen por muestra (Vx1)	Nº muestras**	Volumen final para muestras (Vx100)
H ₂ O (miliQ)	2 μl	100	200 μl
Probe Master Mix x2	2,5 μl		250 μl
Primer mix x10*	0,5 μl		50 μl
Total	5 μl		500 μl

* Descongelar dentro de un cajón con oscuridad porque contiene fluorescencia. Contiene los cebadores Fw y Rv a 9 uM cada uno y la sonda TaqMan a 2 uM.

** Si hay 85 muestras de ADN, se multiplicará el volumen (Vx1) por 100 para tener en cuenta el error de pipeteo y el control negativo.

- Mezclar con el vórtex suavemente el eppendorf que contiene la mix y pipetear 5 μl de mix a cada pocillo de la placa de PCR (MicroAmp FAST 96-well plate) utilizando la pipeta multidispensadora.
- Añadir 0,5 μl del ADN correspondiente a cada pocillo utilizando la pipeta multidispensadora (~ 15 ng).
- Tapar la placa con un film de plástico de calidad óptica (MicroAmp Optical 96-Well Adhesive Film).
- Centrifugar durante unos pocos segundos para eliminar las burbujas de los pocillos de la placa.
- Poner la placa en el Termociclador de tiempo real (7500 Sequence Detection System, Applied Biosystems) y en el programa específico del ordenador marcar lo siguiente:
 1. *Advanced Setup. Experiment Properties.* Tipo de experimento: *Genotyping.*
 2. *Plate Setup.* Seleccionar los pocillos donde se encuentran las muestras y marcar cual es el control negativo.
 3. *Run Method.* Programar los 40 ciclos tal como se indica en la Tabla 10. Aceptar la ventana emergente.
 4. Guardar la reacción en la carpeta deseada.
 5. *Start Run*

Tabla 10. Temperatura y tiempo de cada ciclo de la qPCR

Paso 1	Paso 2 - Amplificación		Paso 3
Fluorescencia pre-PCR	Desnaturalización ADN y activación <i>Hot Start</i>	40 ciclos de	Fluorescencia post-PCR
60°C x 1 min	95°C x 10 min	92°C x 15''	60°C x 1 min
		60°C x 60''	

Tras una hora y media aproximadamente, al acabar el ciclo de PCR el programa compara los niveles de fluorescencia iniciales (pre-PCR) con los finales (post-PCR) en los dos canales de lectura (verde y azul). Con esta información elabora un gráfico donde se representa el genotipo de las muestra (Figura 9 y Tabla 11). Estos resultados se pueden exportar a una hoja de Excel para analizarlos estadísticamente con el JMP Pro 12 junto a los valores de peso, grasa dorsal, contenido de ácidos grasos en diferentes músculos, etc.

Tabla 11. Ejemplo de resultado de genotipado por discriminación alélica. Símbolos que aparecen en la gráfica de análisis del genotipado y su significado.

Símbolo	Significado	Fluorescencia
●	Genotipo CC	Verde
●	Genotipo AA	Azul
●	Genotipo AC	Verde-Azul
■	Control negativo	-
×	Indeterminado	-

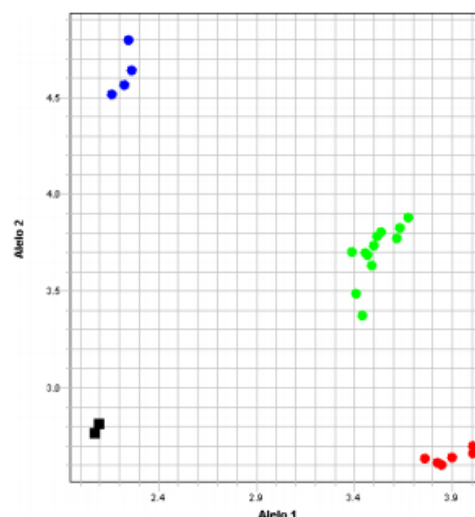


Figura 9. Gráfica en cluster de genotipado obtenida con el programa 7500 Sequence Detection System, Applied Biosystems, como resultado de la PCR cuantitativa en tiempo real.

4.3. Análisis estadístico

Para la comparación de los datos productivos entre las dos poblaciones (Tabla 5) se ha utilizado el modelo de los mínimos cuadrados estándar o LS Means que incluye como efectos fijos RAZA y EDAD*RAZA para las variables de crecimiento (peso y grasa dorsal) en cada punto temporal común para ambas poblaciones (Edad a los 120 días; Edad final, a los 200 días y Edad Sacrificio) y para el contenido en GIM del músculo *gluteus medius*. Para los datos de composición de ácidos grasos en el músculo *gluteus medius*, el modelo incluye la RAZA y el contenido de GIM*RAZA como covariable, mientras que para los datos de composición en grasa subcutánea se ha utilizado como covariable el espesor de la [GD al sacrificio]*RAZA. En este último caso se ha utilizado el espesor de la GD al sacrificio entre la 3ª y 4ª costilla puesto que es una medida realizada con regleta en el matadero, mucho más precisa que las estimaciones realizadas con el Piglog en edades previas al sacrificio.

El estudio de asociación entre el genotipo y las variables productivas se ha llevado a cabo en cada raza por separado. Los modelos utilizados tienen en cuenta el lote de engorde y el genotipo *PCK1* como efectos fijos, y como covariables, la edad (en cada punto temporal, para caracteres de crecimiento, como el peso, el espesor de GD y profundidad del lomo), el peso de la canal (para el espesor de GD entre 3ª y 4ª costilla, la profundidad del lomo entre la 3ª y 4ª costilla, el porcentaje de magro y la GIM de los distintos músculos), el contenido de GIM (en cada músculo, para datos de composición de ácidos grasos; en el caso de la población Duroc, el contenido de GIM en *gluteus medius*, *longissimus dorsi*, semimembranoso. En LWxLD solo en *gluteus medius*), el espesor de la grasa dorsal (para datos de composición de ácidos grasos en grasa subcutánea) y el contenido de grasa en hígado (solo en Duroc, para datos de composición de ácidos grasos en hígado). Para las variables que se han encontrado efectos significativos con el genotipo *PCK1* se han separado las medias por genotipos mediante un test HSD de Tukey (Duroc, 3 niveles de genotipos) o un test de t de Student (LWxLD, 2 niveles de genotipos, puesto que solo hay 2 animales CC y no se ha tenido en cuenta este genotipo para realizar el análisis estadístico).

Todos los análisis se han realizado con el programa JMP Pro 12 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Los efectos y diferencias entre medias se han considerado significativas para $p < 0,05$ y como una tendencia para $p < 0,1$.

4.4. Caracterización del promotor del gen *PCK1*:

Para la caracterización del promotor *PCK1* se han diseñado dos cebadores que amplificasen aproximadamente 1 Kb del promotor más proximal de este gen y se extendiera hasta el exón 1. Para esta información se descargó de Ensembl (www.ensembl.org) 2.000 bp de secuencia 5' flanqueante al primer exón (Figura 11) y se utilizó el programa NCBI Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), especificando un fragmento diana de entre 1.000 y 1.300 bp (Figura 10). Los cebadores elegidos se indican en la Tabla 12.

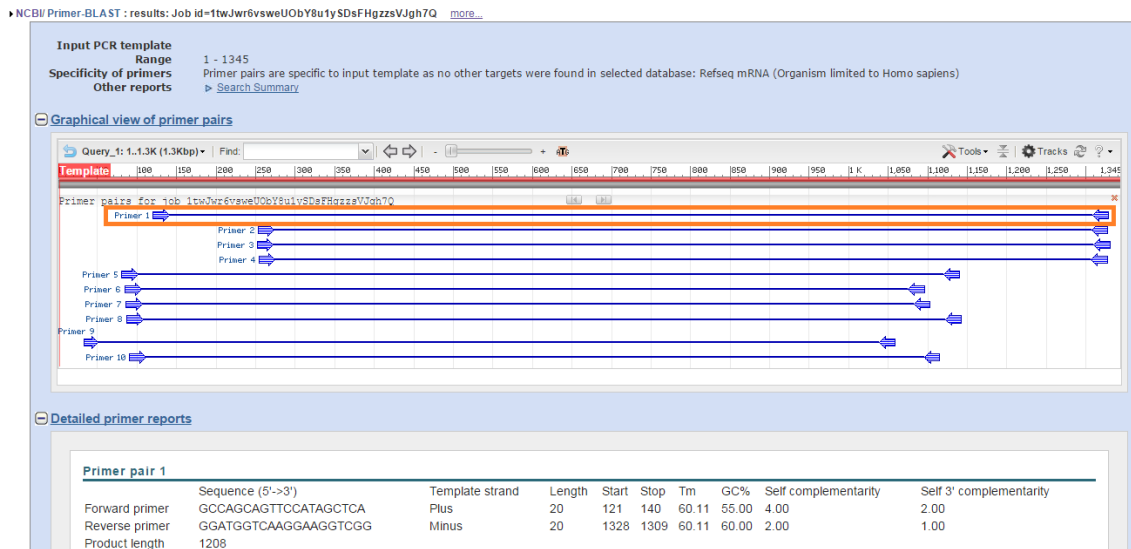


Figura 10. Resultado del programa NCBI Primer-BLAST utilizado para diseñar cebadores del promotor del gen PCK1 con un fragmento de entre 1000 y 1300 bp. Se ha elegido el Primer pair 1 (recuadro en naranja), puesto que es el que mejor abarca los 1200 bp del promotor más proximal.

Tabla 12. Secuencia de los cebadores del promotor proximal al gen PCK1.

Cebador	Secuencia 5' → 3'	Tamaño fragmento amplificado
Promotor Fw	GCCAGCAGTTCATAGCTCA	1.208 bp
Promotor Rv	GGATGGTCAAGGAAGTCCGG	

GCCAGCAGTTCATAGCTCA TTAAATTGGGCTGAAGTTCTGATGCTTTGCAAAGCAAATTCCTTTACTGCTGTTATAA
 AGGTCTCATTGCTCAAGGGTAATCTAGCAAACCAGCCAGCCCCCTCCACTCCCCGCTGCTCAGATTTGCAAGGGCA
 ACAGAAAAGTATAGAGTCAACTTCAGAAAATACTGCACCCAGCCCAGAACTCCTTGGAGAATACATGCAAGTTCCCAG
 AAGGGGCAAAGGTGCCCTCATAAGGCGCAGTCTGCTGCGCTGCTCCAGAGCCCAGTCGCTCGTGTTCACACCCCT
 CTACCACCCACCAGCCTGGGAGCTGGGAGTAGCCACTGGGCCCTCCTGGGCCCTCAGTGTCTTGTCTGTTTCAGGGAGG
 TGGGGGAGTGGGGAGCCATTCGTGGACTCCACTGCAGAGGGCGACAGGAAGTTAGTTGCAAAGCACTCAGAACAATG
 CTCGGCGTTTGTTCATTCCTCTCCACTGTGTGCGGGGAACCATGCACACAGCACGAACAAAAGAGAGAGAAATCCT
 TACCCTCAGGGAGCTGATGTTTGGGGTAGGGGCAGGGGTAGGCAGTGGACACTCAATAAGGTTAATCACCTCTAAT
 TAGGTCAGACCTTTGCCAAGAAGCCACATGCTTTCTTGAATTCAGGGTCTTCTTCCCATGGGCCCTTTGACTGTGGG
 GTGACAGCTCACCATCGTGGTGTGGCCAGCCAGCGGCCATCTGTACACAAGACGTGCTGCCCAAACCGCCAATCTC
 CCCCCCTCCCGCCCCGCTGGGGCGCCATCCTACCTGCTGTCGATGGGAGGGCCGTGAGCTATGCATCAGCAGTG
 GACTGGTTCAAAGTCTAGTCAATCTGAGGTTGCGTAACGGTTGGCTGTGGCCGATCCCAGGGCCGGAGGCCGCCAG
 CACTCATTAACGACCATCAATGATTACCCCCGGGGTATTATGTGGTGTAGCCGGTCCAAGCGTAACGGACCGTGGC
 CATGATCCAAAGACCGGCCCTGACGTCAGAGACGAGCCTCCCGGGGTGGCTGAGGGCCCGGCCCTTCTCCTCCCC
 AGAATTTAAAGCTGGGAGGTTCTGCCCAAACACCCAGCGGGCTCCCACTGGGAACGCGCGCTGACCAGCGGG
 ACGAGCCTGCAAAGCGACCTTGGGTCTCGGATCCGACCTTCCTTGACCATCC

Figura 11. Secuencia del promotor proximal (en negro) y del primer exón (en rojo) del gen PCK1. La posición correspondiente a los dos cebadores utilizados para su amplificación se muestran resaltados en azul.

Los cebadores diseñados llegan liofilizados. Para reconstituirlos, hay que añadir la cantidad de agua que indica la casa comercial y mezclarlo con vórtex. Para el Forward se añaden 574 µl y para el Reverse 667 µl de agua para tener unos cebadores a 100µM.

Con ello, se prepararon cuatro viales con los cebadores juntos a 10 µM cada uno (80 µl H₂O + 10 µl Fw + 10 µl Rv). A partir de unas condiciones estándar de PCR se optimizaron las condiciones, tanto de concentración de los reactivos como del ciclo de la PCR hasta obtener el producto deseado sin ningún

producto inespecífico ni dímeros de *primers*. Las condiciones finales utilizadas se describen en la Tabla 13 y Tabla 14.

Tabla 13. Concentraciones optimizadas para la PCR del promotor PCK1

Reactivos	Volumen por muestra (Vx1)	Nº muestras	Volumen final para muestras (Vx5)
H₂O (miliQ)	18,25 µl	5 (4 muestras + control negativo)	91,25 µl
Buffer x2	2,5 µl		12,5 µl
MgCl₂ 50 µM	0,75 µl		3,75 µl
dNTPs 5 µM	0,75 µl		3,75 µl
cebadores Fw+Rv	0,75 µl		3,75 µl
Taq Polimerasa 10 µM	0,2 µl		1 µl
Total	23 µl + 2 µl ADN		

Tabla 14. Programa "touch down" optimizado para amplificar el promotor PCK1. Al aumentar la temperatura de hibridación los primeros ciclos, forzamos que solo se amplifiquen los fragmentos que estén bien unidos. Posteriormente, al disminuir la temperatura, se acelera la PCR con aquellos fragmentos de ADN bien unidos.

Desnaturalización inicial	10 ciclos	25 ciclos	Elongación final	Conservación
95°C x 5 min	97°C x 10 seg	95°C x 20 seg	72°C x 5 min	4°C x ∞
	62°C x 30 seg	60°C x 30 seg		
	72°C x 1 min	72°C x 1 min		

Los fragmentos amplificados (10 µl producto PCR+ 2 µl de tampón de carga) fueron comprobados en un gel de agarosa al 1%. Para preparar el gel de agarosa se pesan 1 g de agarosa y se añaden a los 100 ml de TAE (Tris+Acético+EDTA, tampón que servirá de medio para correr el gel). Calentar el matraz en el microondas durante 3 minutos aproximadamente hasta que cambie a color transparente. Dejarlo enfriar y añadir 100 µl de bromuro de etidio 1000x, compuesto intercalante para la visualización posterior del gel, de modo que el lector de geles al iluminar el gel con luz ultravioleta, realizará una fotografía de la posición de las moléculas de DNA; todos los fragmentos de un mismo tamaño estarán juntos formando una banda. Homogeneizar. Colocar los peines en el soporte y añadir el gel líquido. Tras unos 20 minutos, cuando el gel cambie de color transparente a opaco, ya habrá gelificado. Retirar los peines y el gel del soporte, y colocar el gel dentro de la cubeta con 1x TAE, el tampón evitará que el gel se seque al pasar la corriente eléctrica. Tras ello, cargar la muestra en el pocillo. Además de las muestras, habrá que cargar 7 µl del marcador de peso molecular (*GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder. Thermo Fisher Scientific*) que nos indique, al visualizar el gel en el transiluminador, los tamaños de los diferentes fragmentos. Aplicar un campo eléctrico que proporcionará la fuente. Como el ADN es una molécula cargada negativamente, tenderá a correr a diferentes velocidades hacia el polo positivo o ánodo; aquellos fragmentos más pequeños correrán más rápido, mientras que los más grandes quedarán más retenidos en el gel. En la Figura 12 se puede observar el resultado de la amplificación con las condiciones descritas anteriormente.

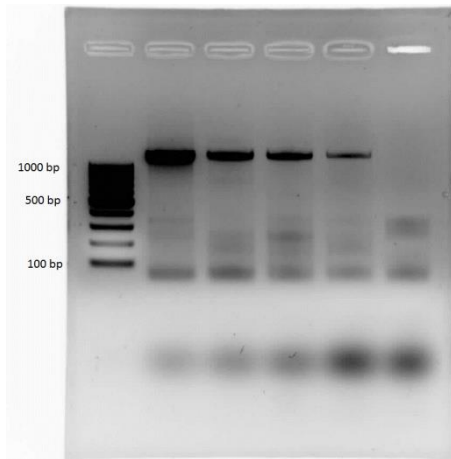


Figura 12. Resultado de la amplificación con las condiciones optimizadas descritas en las Tabla 13 y Tabla 14. Se observa una banda del tamaño esperado (1200 bp) en las 4 muestras y no en el negativo.

Una vez optimizadas las condiciones, se procede a la amplificación del promotor *PCK1* en 5 cerdos Duroc de genotipo AA y 5 de genotipo CC. En la Figura 13 se muestra el resultado de la PCR. Se repitieron aquellas muestras cuya banda resultante era menos intensa (muestras 1, 2, 7, por duplicado, fotografía a la derecha de la Figura 13).

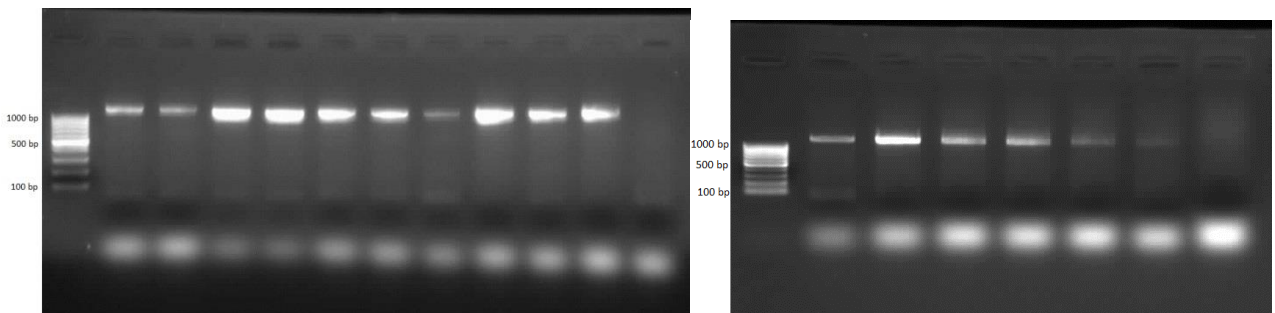


Figura 13. A la izquierda, comprobación del “touch down” con 5 μ l de producto de PCR, el resto se utilizará para realizar una secuenciación. De izquierda a derecha, el primer pocillo del gel de agarosa corresponde al marcador de peso molecular (100 bp), los cinco pocillos siguientes son muestras de ADN de genotipo AA, los cinco que continúan de genotipo CC y el último pocillo corresponde al control negativo. En las muestras 1, 2 y 7 la banda es muy tenue, se repite la PCR de nuevo, por duplicado y se corre un gel (a la derecha).

Las reacciones de PCR resultantes del programa “touch down”, se preparon para la reacción de secuenciación. Primero de todo, era necesario limpiarlas con una columna del QIAquick Gel Extraction Kit (Cat N^o/ID: 28704) de la casa comercial QIAGEN para eliminar los restos de cebadores y nucleótidos así como dímeros de *primer* de tamaño pequeño. Se ha seguido el protocolo facilitado por la casa comercial con el siguiente cambio: para eluir el ADN de las columnas, añadir 30 μ l de Buffer EB precalentado a 50°C. Esperar 4 min y centrifugar durante 2 min.

De estos 30 μ l de ADN, 2 μ l se han utilizado para correr un gel de agarosa (50 V, Figura 14) y estimar así la concentración final de los productos de PCR.

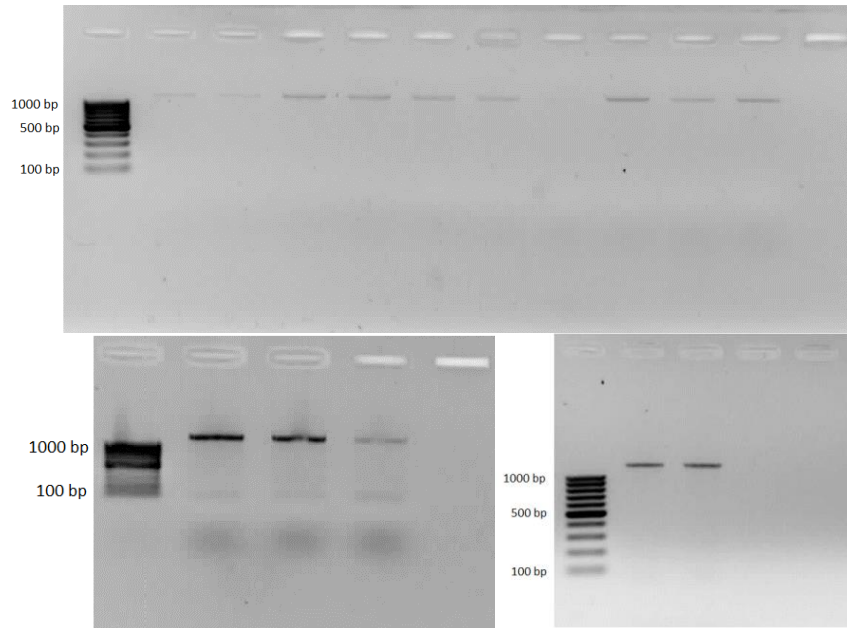


Figura 14. Arriba, gel de agarosa con los productos de PCR limpiados con el QIAquick Gel Extraction Kit. En las muestras 1, 2 y 7 la banda es muy tenue, se repite de nuevo la PCR y la limpieza. En la imagen de abajo a la derecha, no se observa la banda de la muestra 7 (tercer pocillo) porque al cargar el gel, la muestra se salió del pocillo. Aunque se sabe que contiene ADN por el gel anterior (previa purificación) que se corrió (abajo izquierda).

Una vez comprobadas las PCR limpias en un gel de agarosa al 1%, se mandaron a secuenciar. Para ello, se siguieron estos pasos:

- 1- A partir de las concentraciones stock de los cebadores (100 μ M), preparar un tubo de primer Forward a 10 μ M (10 μ l Fw 100 μ M + 90 μ l H₂O) y, a parte, otro tubo de primer Reverse 10 μ M (10 μ l Rv 100 μ M + 90 μ l H₂O)
- 2- Preparar el doble, del número de muestras de ADN, de tubos eppendorf. Unos para secuenciar con el cebador Fw y otros con el Rv. Etiquetarlos según el código de la casa comercial STABvida (<http://stabvida.com>)
- 3- A cada tubo de secuenciación, añadir 10 μ l PCR limpia + 3 μ l de cebador que corresponda, sólo un cebador por reacción
- 4- Cerrar los tubos con parafilm y guardar las muestras en el congelador hasta enviarlas a la casa comercial

Una vez recibidas las secuencias de la empresa STABvida, fueron alineadas mediante el programa MULTALIN (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) para identificar mutaciones entre muestras. Para ver dichas secuencias, se utilizó el programa CHROMAS 2.4.

La secuencia fue también estudiada para posibles regiones de unión a factores de transcripción mediante la comparación con el promotor de otras especies y mediante el análisis *in silico* (a través del ordenador) con el programa PROMO (Messeguer et al., 2012; http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3). Se prestó especial atención a aquellas secuencias de posibles uniones a factores de transcripción que se veían alteradas por la presencia de los polimorfismos.

5. RESULTADOS

5.1. Comparación de los datos productivos de las dos poblaciones seleccionadas

A principios de 2016 se publicaron resultados sobre el primer marcador genético del genoma porcino que aumentaba la grasa intramuscular (GIM) al mismo tiempo que disminuía la grasa de cobertura (grasa subcutánea) y mejoraba los valores de pérdidas por goteo (Latorre et al., 2016). El marcador era una mutación no sinónima en la región codificante del gen *PCK1*, que codifica la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1, un enzima importante en la intersección entre la ruta metabólica de la gluconeogénesis, la gliceroneogénesis y la síntesis de ácidos grasos.

El trabajo de Latorre et al., 2016 se centraba en el efecto de la mutación *PCK1* sobre caracteres de calidad de la carne (pH muscular, pérdidas por goteo, contenido de GIM) y de canal (espesor de la grasa dorsal) pero no incluía datos de crecimiento ni de composición de la grasa, atributo que afecta la calidad sensorial, nutritiva y tecnológica de los productos cárnicos. El estudio de asociación entre este marcador y los valores productivos se realizó en un cruce comercial de Duroc x Large White/Landrace, proveniente de cruzar machos terminales Duroc con hembras cruzadas Large White x Landrace (LWxLD). Este es el cruce utilizado en la producción del Jamón de Teruel, primer jamón que adquirió la Denominación de Origen Protegida (DOP) en España. En nuestro caso, para evaluar la influencia del marcador *PCK1* en el crecimiento y la composición de la grasa utilizamos dos poblaciones que teníamos disponibles en el laboratorio: Una población Duroc y una población LWxLD. Las tres razas implicadas contribuyen, así pues, a las utilizadas para el Jamón de Teruel.

Las dos poblaciones difieren en su capacidad de **crecimiento**. Un seguimiento del peso vivo desde la mitad del engorde (120 días) hasta edad final (208 días de media en Duroc y 200 días para LWxLD) y al sacrificio (Tabla 5, página 17) muestra cómo, inicialmente, los animales de raza Duroc son más pesados y más grasos que los LWxLD, pero a medida que avanzamos en el engorde, son los animales cruzados los más pesados, a pesar de que se sacrificaron seis días antes que los Duroc. Los LWxLD, por tanto, también presentan un mayor peso en la canal, profundidad del lomo y porcentaje de magro, pero menor espesor de grasa dorsal. Es decir, los cerdos LWxLD son más eficientes en depositar músculo que los Duroc. Como vemos, los animales de raza Duroc, para llegar al mismo peso que los LWxLD, necesitan mayor edad.

Los animales Duroc, además de tener un mayor espesor de grasa dorsal durante toda la etapa de crecimiento, también tienen un mayor **contenido de grasa intramuscular** del músculo *gluteus medius*, media significativamente diferente a la del grupo LWxLD. Sin embargo, no existen diferencias significativas en el porcentaje de grasa en el subcutáneo entre las dos razas.

Es bien sabido que la composición de la grasa tanto subcutánea como intramuscular cambia con la edad (Sección 1.4.1, Introducción), favoreciendo el depósito de grasas menos poliinsaturadas a edades tardías. El depósito de grasa intramuscular es un proceso que ocurre al final del crecimiento. Las diferencias entre animales se deben a una mayor acumulación de lípidos neutros, pobres en PUFA. Estas

diferencias relativas a la **composición** de los ácidos grasos pueden observarse en el **músculo *gluteus medius*** (Tabla 5, página 17). Los cerdos Duroc, con mayor contenido en GIM, tienen mayor concentración de ácidos grasos saturados y monoinsaturados, y menor concentración de poliinsaturados que los LWxLD. Existen diferencias en la concentración de todos los ácidos grasos analizados (14:0, 16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3, 20:0, 20:1, 20:2, 20:4, 18:1 n9, 18:1 n7, SFA, MUFA, PUFA) en la dirección indicada, excepto en el ácido palmitoleico (16:1) para el que no hay diferencias entre los dos grupos.

Este mismo efecto se observa en la **composición** de los ácidos grasos en la **grasa subcutánea**, con mayores cantidades en ácidos poliinsaturados (totales e individuales: 18:2, 18:3, 20:2, 20:4) en los cerdos LWxLD que en los Duroc. También en el sentido de lo esperado, el saturado 20:0 y el monoinsaturado 20:1 fueron más abundantes en los cerdos Duroc. En conjunto, el análisis de estos datos valida la selección de la población Duroc como representante de una raza porcina grasa y los animales cruzados LWxLD como representativos de razas más magras y de mayor crecimiento, lo que representará un valor añadido a la discusión de los resultados obtenidos en el estudio de asociación del marcador de *PCK1* de este TFG.

5.2. Resultados del genotipado

Las dos poblaciones de cerdos fueron genotipadas para el marcador *PCK1* c.2456C>A por un protocolo de discriminación alélica mediante PCR a tiempo real. El análisis de la fluorescencia acumulado durante la amplificación permitió detectar tres grupos de señales que correspondían a los animales AA, AC y CC (Figura 15).

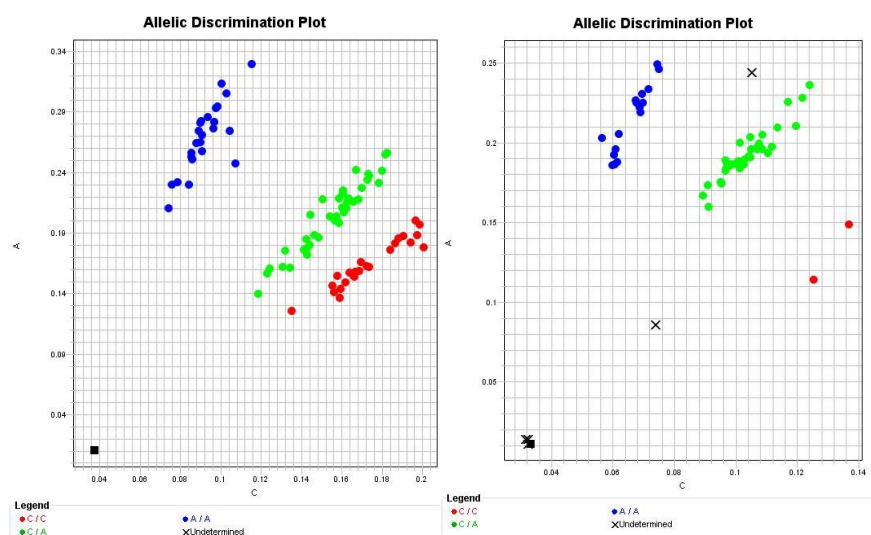


Figura 15. Gráfica que muestra el genotipado del *PCK1* de algunos animales de la población Duroc (izquierda) y LWxLD (izquierda), como resultado de la PCR cuantitativa en tiempo real. En rojo, representa los animales CC, en azul los AA y en verde los heterocigotos.

Una vez conocidos los genotipos de los animales de las dos poblaciones, se han calculado las frecuencias génicas o alélicas a partir de las frecuencias genotípicas (Tabla 15 y Tabla 16). Se ha dividido el número de animales de cada genotipo (n_1, n_2, n_3) entre el número de individuos total (N), dando lugar a las frecuencias genotípicas (D, H y R). Con ello, se aplican las siguientes fórmulas para encontrar las frecuencias alélicas de los alelos A y C.

$$\frac{n_1}{N} = D; \frac{n_2}{N} = H; \frac{n_3}{N} = R$$

$$D + H + R = 1$$

$$\text{Para un alelo: } \frac{2n_1+n_2}{2N} = \frac{2D+H}{2D+2H+2R} = \frac{2D+H}{2(D+H+R)} = D + \frac{1}{2}H = p$$

$$\text{Para el otro alelo: } \frac{2n_3+n_2}{2N} = \frac{2R+H}{2D+2H+2R} = \frac{2R+H}{2(D+H+R)} = R + \frac{1}{2}H = q$$

Tabla 15. Frecuencias genotípicas y génicas de la población Duroc en función del número de individuos que presentan cada genotipo. Número de cerdos esperados en cada categoría en equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W)

POBLACIÓN DUROC				
Genotipos	Número de individuos	Frecuencias genotípicas	Frecuencias génicas o alélicas	Nº esperado H-W
AA	56	D=56/268=0,21	p(A)=D+(1/2)·H= 0,21+(1/2)·0,48=0,45	p²·N=54,27
AC	128	H=128/268=0,48		2·p·q·N=132,66
CC	84	R=84/268=0,31		q(C)=R+(1/2)·H= 0,31 + (1/2)·0,48=0,55
Total (N)	268	1	1	268

Tabla 16. Frecuencias genotípicas y génicas de la población Large White x Landrace en función del número de individuos que presentan cada genotipo. Número de cerdos esperados en cada categoría en equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W)

POBLACIÓN LARGE WHITE x LANDRACE				
Genotipos	Número de individuos	Frecuencias genotípicas	Frecuencias génicas o alélicas	Nº esperado H-W
AA	15	D=15/49=0,31	p(A)=D+(1/2)·H= 0,31+(1/2)·0,65=0,635	p²·N=19,76
AC	32	H=32/49=0,65		2·p·q·N=22,71
CC	2	R=2/49=0,04		q(C)=R+(1/2)·H= 0,04 + (1/2)·0,65=0,365
Total (N)	49	1	1	49

En la población Duroc, las frecuencias alélicas son bastante similares, siendo el alelo C el más frecuente y el menos favorable para GIM y grasa dorsal en el estudio de Latorre et al. 2016. Las frecuencias genotípicas obtenidas no distan de las estimadas asumiendo una distribución en equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla 15). En cambio, en la población LWxLD, la frecuencia del alelo favorable A es más alta que la del alelo C. En este caso, el número esperado de cerdos en cada genotipo es bastante distinto al obtenido en el genotipado (Tabla 16). Esto podría deberse a un sesgo de muestreo ya que solo se analizaron 49 cerdos de esta población.

5.3. Estudio de asociación entre la mutación *c.2456C>A* del gen *PCK1* y caracteres productivos:

Los datos analizados en estas poblaciones (Tabla 5, página 17) se han agrupado en tres subgrupos, como datos referentes al crecimiento del animal (peso y medidas de grosor del lomo y de la grasa subcutánea), datos de engrasamiento en la canal (contenido magro y graso en diferentes puntos anatómicos) y datos de composición de grasa (en músculo, grasa dorsal e hígado). Los resultados para cada subgrupo se muestran en los siguientes apartados.

5.3.1. Datos de crecimiento

El peso de los cerdos Duroc no se vio influido por el genotipo de la mutación *PCK1 c.2456C>A* en ninguno de los puntos temporales estudiados (de 120 a 210 d; Tabla 17). Al inicio del engorde los cerdos Duroc con genotipo AA tenían más grasa dorsal que los CC ($P < 0,1$). Estas diferencias no se mantuvieron en el tiempo. Tampoco hubo diferencias en los cerdos Duroc en la profundidad del lomo ni en el porcentaje de magro.

Sin embargo, en el caso de los cerdos LWxLD los animales de genotipo AA fueron más pesados que los heterocigotos AC en todos los tiempos, aunque estas diferencias solo fueron significativas a 160d ($P < 0,05$; tendencia a 80d, $P < 0,1$). El espesor de la grasa dorsal no fue diferente entre genotipos, pero a 160d la profundidad del lomo, estimada con Piglog, fue superior en los cerdos AA que en los AC. Es decir, la mejora en el peso de los cerdos AA parece que se debe más a un aumento en el depósito de músculo que no de grasa. Sin embargo nuevamente las diferencias no se mantuvieron en el tiempo ni se vieron reflejadas en el porcentaje de magro.

Tabla 17. Medias mínimas cuadráticas \pm desviación estándar (SEM) de caracteres de crecimiento en función del genotipo para el gen *PCK1* en la población Duroc y Large White x Landrace (LWxLD).

GRUPO	CARACTERES	<i>PCK1 c.2456C>A</i>			
		AA	AC	CC	P
		$\bar{X} \pm \text{SEM}$	$\bar{X} \pm \text{SEM}$	$\bar{X} \pm \text{SEM}$	
DUROC	PESO 120d, Kg	64,7 \pm 1,94	64,56 \pm 1,76	63,84 \pm 1,84	n.s.
	PESO 180d, Kg	111,57 \pm 2,48	112,07 \pm 2,25	110,52 \pm 2,38	n.s.
	PESO 200d, kg	125,81 \pm 2,75	125,82 \pm 2,52	123,83 \pm 2,68	n.s.
	PESO canal, kg	95,73 \pm 2,15	96,23 \pm 1,97	94,48 \pm 2,10	n.s.
	GD 120d, mm	11,87 \pm 0,31 ^A	11,54 \pm 0,20 ^{AB}	10,94 \pm 0,25 ^B	0,0482 (*)
	GD 180d, mm	18,79 \pm 1,03	18,42 \pm 0,93	17,97 \pm 0,99	n.s.
	GD 200d, mm	22,37 \pm 1,15	22,55 \pm 1,05	21,95 \pm 1,21	n.s.
	GD sacrificio, mm	21,22 \pm 1,08	21,62 \pm 0,99	21,53 \pm 1,05	n.s.
	PL 120d, mm	39,19 \pm 0,92	39,37 \pm 0,84	39,59 \pm 0,88	n.s.
	PL 180d, mm	44,80 \pm 1,04	44,24 \pm 0,94	43,69 \pm 1,00	n.s.
	PL 200d, mm	48,47 \pm 1,22	48,36 \pm 1,12	47,94 \pm 1,19	n.s.
	PL sacrificio, mm	48,01 \pm 2,00	46,36 \pm 1,84	46,07 \pm 1,96	n.s.
	MAGRO, %	44,98 \pm 1,43	44,78 \pm 1,31	44,58 \pm 1,40	n.s.
	LWxLD	PESO 80d	31,44 \pm 1,04 ^A	29,18 \pm 0,71 ^B	-

PESO 120d	59,73 ± 2,76	55,53 ± 2,29	-	n.s.
PESO 160d	110,04 ± 2,24 ^a	104,34 ± 1,52 ^b	-	0,0400 (*)
PESO 200d	140,25 ± 2,46	135,90 ± 1,72	-	n.s.
PESO canal	107,49 ± 2,07	104,87 ± 1,42	-	n.s.
GD 120d, mm	9,23 ± 0,48	8,25 ± 0,40	-	n.s.
GD 160d, mm	12,73 ± 0,64	12,15 ± 0,43	-	n.s.
GD 200d, mm	17,43 ± 0,87	17,26 ± 0,61	-	n.s.
GD sacrificio, mm	19,26 ± 0,82	18,15 ± 0,56	-	n.s.
PL 160d, mm	53,16 ± 1,03 ^a	50,44 ± 0,70 ^b	-	0,0345 (*)
PL 200d, mm	56,62 ± 0,89	55,63 ± 0,61	-	n.s.
PL sacrificio, mm	55,52 ± 1,57	55,56 ± 1,08	-	n.s.
MAGRO, %	50,17 ± 0,99	51,33 ± 0,68	-	n.s.

(*) $P < 0,05$; (t) $P < 0,1$, expresa una tendencia. n.s. – efecto del genotipo no significativo. Las medias con distintos superíndices denotan diferencias significativas con $P < 0,05$ (minúsculas) o $P < 0,1$ (mayúsculas). GD - Espesor grasa dorsal (mm) y PL - Profundidad de lomo, estimada con Piglog.

5.3.2. Datos de engrasamiento

La tendencia de los cerdos Duroc AA a acumular más grasa dorsal vuelve a observarse cuando la medida se toma con ayuda de una regleta tras el sacrificio (Tabla 18). Nuevamente los cerdos AA son más grasos que los CC mientras que el grupo AC muestra valores intermedios entre los dos homocigotos. No hay diferencias entre grupos para el contenido de GIM en ninguno de los tres músculos estudiados, ni tampoco para materia grasa en hígado.

En el grupo de cerdos cruzados LWxLD solo se observaron diferencias entre la GIM del músculo *gluteus medius* ($P < 0,1$) siendo los cerdos AA los que acumularon más GIM que los heterocigotos AC.

Tabla 18. Medias mínimas cuadráticas ± desviación estándar (SEM) de caracteres relacionados en el depósito de grasa en función del genotipo para el gen *PCK1* en la población Duroc y Large White x Landrace (LWxLD).

GRUPO	CARACTERES	<i>PCK1</i> c.2456C>A			
		AA	AC	CC	P
		$\bar{X} \pm SEM$	$\bar{X} \pm SEM$	$\bar{X} \pm SEM$	
DUROC	GD_34RE, mm	28,31 ± 1,29 ^A	26,93 ± 0,91 ^{AB}	25,3 ± 1,12 ^B	0,071 (t)
	GM GIM, %	14,49 ± 1,44	14,77 ± 1,32	14,42 ± 1,40	n.s.
	LD GIM, %	9,45 ± 0,86	9,58 ± 0,74	9,12 ± 0,83	n.s.
	SM GIM, %	9,08 ± 3,29	8,71 ± 2,62	7,80 ± 2,97	n.s.
	HÍGADO MG, %	15,86 ± 1,31	15,90 ± 1,04	16,30 ± 1,18	n.s.
LWxLD	GM GIM, %	9,57 ± 0,53 ^B	8,43 ± 0,36 ^A	-	0,0782 (t)

(t) $P < 0,1$, expresa una tendencia. n.s. – efecto del genotipo no significativo. Las medias con distintos superíndices denotan diferencias significativas con $P < 0,1$ (mayúsculas). **GD 34RE** - Espesor grasa dorsal entre 3ª y 4ª costilla medido con regleta, sala despiece (mm). **GIM** - Porcentaje de grasa intramuscular del músculo sobre materia seca. **GM** – Ms *gluteus medius*. **LD** – Ms *longissimus dorsi*. **SM** – Ms *semimembranoso*. **HIGADO MG**, porcentaje de materia grasa en el hígado.

5.3.3. Datos de composición de grasa

La composición de la grasa tanto intramuscular como de cobertura mostró pocos cambios debidos al genotipo *PCK1*. Los datos que se muestran en la Tabla 19 han sido corregidos por contenido de GIM (datos de músculo y de hígado) o por grosor de la GD (en grasa subcutánea) por lo que esta tabla muestra variaciones en composición no debidas a cambios en la cantidad de grasa acumulada (ver Sección 1.4.1) sino cambios debidos al genotipo *PCK1*.

En Duroc, los cerdos de genotipo CC muestran una tendencia a acumular menos grasa saturadas, particularmente ácido palmítico ($P < 0,05$) y mirístico ($P < 0,05$) solo en el músculo semimembranoso. No se observó ningún efecto sobre la composición de los músculos *gluteus medius* o *longissimus dorsi*. La GD y el hígado mostraron dos efectos significativos en cerdos heterocigotos sobre el contenido de ácido esteárico (GD) y el ácido linolénico (hígado).

En los cerdos LWxLD los efectos son más consistentes en los dos tejidos analizados. En el caso del músculo, los cerdos AA tienen mayor porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados tanto totales ($P < 0,1$) como ácido oleico ($P < 0,05$, el MUFA mayoritario en cerdo). En este grupo AA se observó una tendencia a los PUFA a disminuir ($P < 0,1$). La GD de los cerdos LWxLD fue la que presentó los efectos más significativos sobre composición. La grasa de los cerdos AA es más rica en SFA ($P < 0,01$), siendo estos valores un 21,5% superiores a los de los cerdos AC. Todos los ácidos grasos saturados analizados (14:0, 16:0, 18:0 y 20:0) eran más abundantes en los cerdos AA que en los CC ($P < 0,05$). En cambio los MUFA presentaron un cambio en dirección contraria, siendo 17,5% inferiores en cerdos AA que en los AC.

Tabla 19. Medias mínimas cuadráticas \pm desviación estándar (SEM) de caracteres de composición de la grasa en varios tejidos en función del genotipo para el gen *PCK1* en la población Duroc y Large White x Landrace (LWxLD).

GRUPO	CARACTERES	<i>PCK1</i> c.2456C>A			
		AA	AC	CC	P
		$\bar{X} \pm \text{SEM}$	$\bar{X} \pm \text{SEM}$	$\bar{X} \pm \text{SEM}$	
DUROC	<i>Ms. Semimembranoso</i>				
	SM 14:0, %	1,45 \pm 0,4 ^A	1,42 \pm 0,02 ^A	1,33 \pm 0,03 ^B	0,0408 (*)
	SM 16:0, %	22,36 \pm 0,29 ^{ab}	22,72 \pm 0,18 ^a	21,86 \pm 0,24 ^b	0,0213 (*)
	SM SFA, %	34,21 \pm 0,53 ^{AB}	35,06 \pm 0,31 ^A	33,92 \pm 0,44 ^B	0,0824 (t)
	<i>Grasa Subcutánea</i>				
	GS 18:0, %	11,13 \pm 0,31 ^{AB}	11,80 \pm 0,20 ^A	11,12 \pm 0,26 ^B	0,0619 (t)
	<i>Hígado</i>				
HIG 18:3, %	0,76 \pm 0,03 ^{ab}	0,71 \pm 0,02 ^b	0,80 \pm 0,03 ^a	0,0102 (*)	
LWxLD	<i>Ms. Gluteus medius</i>				
	GM 18:1, %	40,97 \pm 0,68 ^a	39,34 \pm 0,44 ^b	-	0,0488 (*)
	GM 18:2, %	15,77 \pm 0,53 ^A	16,93 \pm 0,34 ^B	-	0,0745 (t)
	GM 18:1 n9, %	37,44 \pm 0,61 ^{ab}	35,8 \pm 0,40 ^b	-	0,0302 (*)
	GM MUFA, %	45,05 \pm 0,70 ^A	43,52 \pm 0,46 ^B	-	0,0752 (t)
	GM PUFA, %	19,63 \pm 0,66 ^A	21,06 \pm 0,43 ^B	-	0,0764 (t)
	<i>Grasa Subcutánea</i>				
	GS 14:0, %	1,60 \pm 0,08 ^a	1,36 \pm 0,06 ^b	-	0,0393 (*)
	GS 16:0, %	24,72 \pm 1,08 ^a	20,54 \pm 0,76 ^b	-	0,0080 (**)
	GS 18:0, %	13,00 \pm 0,57 ^a	10,47 \pm 0,40 ^b	-	0,0029 (**)
GS 18:1, %	35,78 \pm 2,84 ^a	44,51 \pm 2,01 ^b	-	0,0288 (*)	

	GS 20:0, %	0,23 ± 0,01 ^a	0,18 ± 0,01 ^b	-	0,0007 (**)
	GS SFA, %	39,55 ± 1,68 ^a	32,54 ± 1,19 ^b	-	0,0048 (**)
	GS MUFA, %	39,28 ± 2,68 ^b	47,63 ± 1,89 ^a	-	0,0267 (*)

(**) $P < 0,01$; (*) $P < 0,05$; (t) $P < 0,1$, expresa una tendencia. Las medias con distintos superíndices denotan diferencias significativas con $P < 0,05$ (minúsculas) o $P < 0,1$ (mayúsculas). **SFA** - Concentración de ácidos grasos saturados. **MUFA** - Concentración de ácidos grasos monoinsaturados. **PUFA** - Concentración de ácidos grasos poliinsaturados. **GS** – grasa subcutánea. **GM** – Ms gluteus medius. **SM** – Ms semimembranoso. **HIG** – hígado.

5.4. Caracterización del promotor

Se ha amplificado el promotor proximal del gen *PCK1* en diez cerdos de raza Duroc, seleccionados según su genotipo para la mutación *c.2456C>A*. Así, cinco de los animales eran de genotipo CC y cinco de genotipo AA. En la Figura 13 (página 27) se muestra una electroforesis de los productos amplificados donde se observa que el tamaño observado es el esperado (1.200 bp) y que la amplificación es específica para todas las muestras.

Las secuencias de la empresa STABvida, se han visualizado con el software CHROMAS 2.4 (Figura 16) para identificar visualmente las mutaciones. El programa coloca un nucleótido por defecto, sin tener en cuenta la mutación, por lo que hay que ir cambiándolas (Figura 17) siguiendo el código oficial para ambigüedades de dos nucleótidos de la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada; *International Union of Pure and Applied Chemistry*), tal como muestra la Tabla 20.

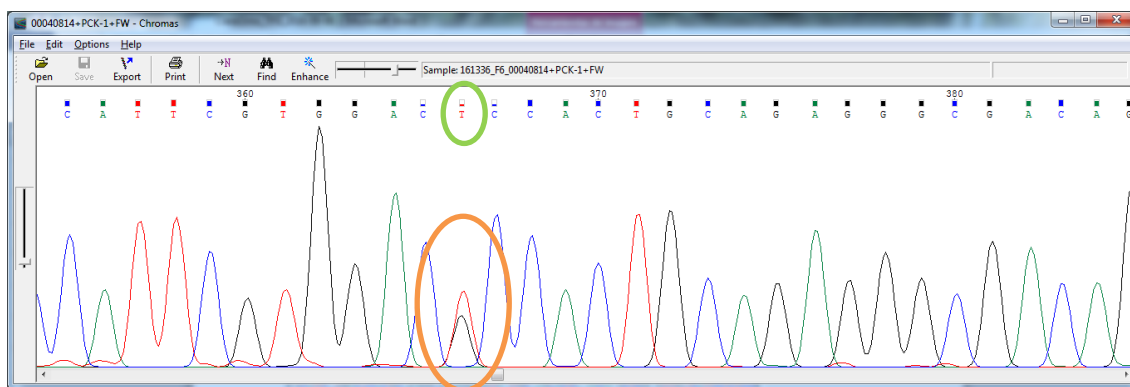


Figura 16. Electroferograma de un animal de raza Duroc y genotipo AA para el gen *PCK1*, con el primer Forward. En naranja se redondea una mutación tipo SNP entre una timina (T, curva roja) y una guanina (G, curva negra). Por defecto, el programa coloca una T (rodeado en verde), por lo que habrá que sustituirla por el código oficial para ambigüedades de dos nucleótidos de la IUPAC (Tabla 20).

Tabla 20. Lista de códigos oficiales para ambigüedades de dos nucleótidos de la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada; *International Union of Pure and Applied Chemistry*).

IUPAC nucleotide code	Base
R	A o G
Y	C o T
S	G o C

W	A o T
K	G o T
M	A o C

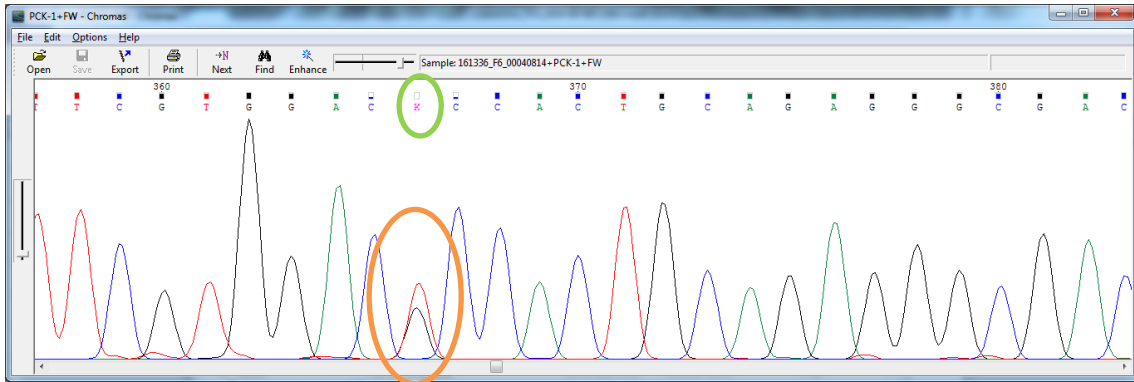


Figura 17. Con el apoyo de la lista de códigos oficiales para ambigüedades de dos nucleótidos de la IUPAC, se ha cambiado la T inicial por una K. Una K significa que puede ser una timina o una guanina.

Posteriormente, las secuencias rectificadas han sido alineadas mediante el programa MULTALIN para identificar mutaciones entre muestras (Figura 18). El análisis de las secuencias ha permitido la identificación de nueve mutaciones, todas de tipo SNP que se muestran en la Figura 19. Siete de estas mutaciones segregan tanto en cerdos de genotipo CC como AA para el marcador *c.2456C>A*. Sin embargo, las dos más próximas al inicio de transcripción, primer nucleótido del exón 1 (posición -383 y -305, ver Tabla 21) estaban fijadas de manera alternativa en los dos genotipos.

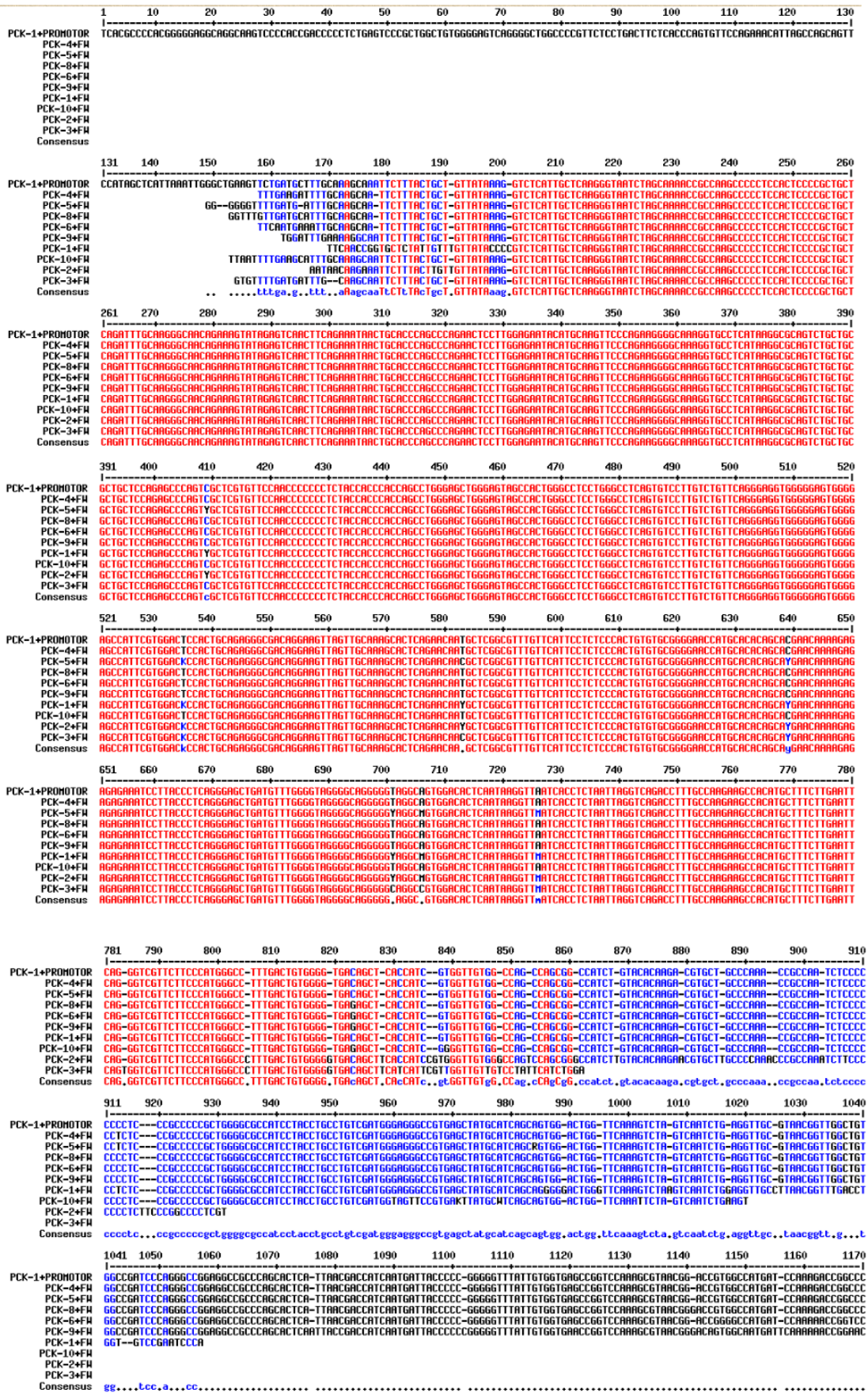


Figura 18. Resultado que muestra el programa MULTALIN al introducir todas las secuencias Forward, excepto la secuencia 7 puesto que no ha amplificado bien y provoca una peor visualización. En rojo se muestra la secuencia

del promotor del gen *PCK1* común para todas las secuencias, y en azul y negro las mutaciones. En la posición 409, desde el primer nucleótido del promotor, se encuentra la mutación del electroferograma de la Figura 16 y Figura 17.

GCCAGCAGTTCATAGCTCAATTAAATTGGGCTGAAGTTCTGATGCTTTGCAAAGCAAATTCTTTACTGCT
 GTTATAAAGGTCTCATTGCTCAAGGGTAATCTAGCAAAACCGCCAAGCCCCCTCCACTCCCCGCTGCTCA
 GATTTGCAAGGGCAACAGAAAGTATAGAGTCAACTTCAGAAATAACTGCACCCAGCCCAGAACTCCTTGG
 AGAATACATGCAAGTTCAGAAAGGGGCAAAGGTGCCTCATAAGGCGCAGTCTGCTGCGCTGCTCCAGAG
 CCCAGTGCTCGTGTTCCAACCCCCCTCTACCACCCACCAGCCTGGGAGCTGGGAGTAGCCACTGGGCC
 TCCTGGGCCTCAGTGTCTTGTCTGTTTCAAGGAGGTGGGGGAGTGGGGAGCCATTCGTGGACKCACTGC
 AGAGGGCGACAGGAAGTTAGTTGCAAAGCACTCAGAACAAGCTCGGCGTTTGTTCATTCTCTCCACT
 GTGTGCGGGGAACCATGCACACAGCAYGAACAAAAGAGAGAGAAATCCTTACCCTCAGGGAGCTGATGTT
 TGGGGTAGGGGCGAGGGGYAGGCYGTGGACACTCAATAAGGTTYATCACCTCTAATTAGGTGAGACCTTT
 GCCAAGAAGCCACATGCTTTCTTGAATTCAAGGGTCGTTCTTCCCATGGGCCCTTGACTGTGGGGTGASAG
 CTCACCATCGTGGTTGTGGCCAGCCAGCGGCCATCTGTACACAAGACGTGCTGCCCAAACCGCCAATCTC
 CCCCCYCTCCCGCCCCGCTGGGGCGCCATCCTACCTGCCTGTCGATGGGAGGGCCGTGAGCTATGCATC
 AGCAGTGGACTGGTTCAAAGTCTAGTCAATCTGAGGTTGCGTAAACGGTTGGCTGTGGCCGATCCCAGGGC
 CGGAGGCCCGCCAGCACTCATTAAACGACCATCAATGATTACCCCCGGGGGTTTATTGTGGTGAGCCGGTC
 CAAAGCGTAAACGGACCGTGGCCATGATCCAAAAGACCGGCCCTGACGTCAGAGACGAGCCTCCCGGGGGTG
 GCTGAGGGCCCGGGCCTTTCTCCTCCCCAGAAATTTAAAGCTGGGAGGTTCTGCCCCAAACACCCAGCAG
GGCCTCCCCACTGGGAACGCGCGCTGACCAGCGGGACGAGCCTGCAAAGCGACCCTTGGGTCTCGGATCC
GACCTTCCTTGACCATCC

Figura 19. Secuencia del promotor proximal (en negro) y del primer exón (en rojo) del gen *PCK1*. En ella, se muestran las nueve mutaciones de tipo SNP (en rosa) y los dos cebadores utilizados (resaltados en azul). Las secuencias potenciales de unión de factores de transcripción afectados por los SNPs se señalan con un recuadro o con doble subrayado (ver Tabla 21).

Se ha utilizado el programa PROMO (Messeguer *et al.*, 2012) para predecir si alguna de estas mutaciones podría cambiar un lugar de reconocimiento a un factor de transcripción (Tabla 21). Todos los SNPs (excepto el cambio C>A de la posición -497) se encuentran en lugares de unión putativos para factores de transcripción. De entre ellos cabe destacar: **Myf-3/MyoD**, dos factores de diferenciación muscular; **C/EBP α y β** , conocidos activadores de la acción de genes relacionados con la síntesis de lípidos; el factor **SXR:RXR** (*steroid and xenobioticsensing nuclear receptor : Retinoic acid X Receptor*) es un activador/inactivador de los genes que codifican para enzimas metabolizantes de xenobióticos; **NFE2L1 y L2** (también conocidos como Nfr1 y Nfr2) se relacionan con los genes de respuesta al estrés oxidativo y la inflamación; **HNF-1** es un factor de transcripción muy activo en el hígado pero que también se encuentra en otros tejidos, que interviene en la activación de genes del metabolismo como *PCK1*. La importancia de estos factores en relación a la actividad *PCK1* se menciona brevemente en la DISCUSIÓN.

Tabla 21. Polimorfismos, según el código de IUPAC, la posición en la que se localizan respecto a primer nucleótido del exón 1 y el factor de transcripción que podría reconocer.

SNP	Posición*	Alelo - Factor de Transcripción (secuencia de reconocimiento)
Y	-794	T – Myf-3/MyoD (CAGT <u>T</u> CG) T – C/EBP α , C/EBP β (GT <u>T</u> GCTCG)
K	-668	T – SXR:RXR-alpha (CGTGGACT <u>C</u>)
Y	-620	T – NFE2L2 (CAAT <u>G</u> GCTCGGC)
Y	-564	T – NFE2L2 (ACACAGCA <u>T</u> GA)

		T – NFE2L1 (ATGAAC)
Y	-502	C – SP3 (GGGGCAGGC)
M	-497	
M	-477	A – HNF-1A,1B, 1C (GTTAAGCA)
S	-383	C - USF2 (GGGGTGAC) C – PAX2 (GGGTGAC)
Y	-305	
<i>*Posición respecto al inicio de transcripción (Primer nucleótido del exón 1).</i>		

6. DISCUSIÓN

Latorre y colaboradores (2016) presentaron a principio del presente año el primer marcador molecular con un efecto diferencial sobre la grasa dorsal y la grasa intramuscular. El depósito de grasa en estos dos tejidos está altamente correlacionado ($r_g = 0,4-0,6$; según el estudio) por lo que al seleccionar en contra de la grasa dorsal, disminuye también la grasa intramuscular. Sin embargo la correlación no es completa ($r < 1$) por lo que debería ser posible encontrar marcadores genéticos con efectos independientes en ambos tejidos. Hasta la fecha, este es el primer grupo que ha conseguido describir un marcador así.

El marcador descrito en el gen *PCK1* consiste en un cambio de adenina por citosina en el exón 4 del gen que resulta en una substitución de una metionina en vez de una leucina en la posición 139 de la proteína. El alelo *PCK1 c.2456C*, que codifica leucina, se asocia con un menor GD, mientras que el alelo A, que codifica metionina, se asocia a una mayor capacidad de retención de agua, mejor calidad de la carne y distribución de la grasa. Así, el alelo A se considera el alelo favorable.

La *PCK1* (*Cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase*) es una de las principales enzimas que intervienen en la gluconeogénesis (síntesis de glucosa a partir de otros compuestos carbónicos no carbohidratos) y la gliceroneogénesis (una versión abreviada de la gluconeogénesis, basada en la síntesis de glicerol-3-fosfato, necesario para la síntesis de triglicéridos). La enzima PCK es la responsable de la descarboxilación del oxalacetato a fosfoenolpiruvato. Por lo tanto cambios en la funcionalidad de esta proteína o en su cantidad pueden resultar en más o menos síntesis de triglicéridos, el principal componente tanto de la grasa dorsal como de la GIM.

La incorporación de marcadores asociados a caracteres de calidad en esquemas de selección permite mejorar la precisión de los índices de selección. Previamente a la utilización de estos marcadores moleculares es necesario validar los efectos en varias razas y comprobar que no hay efectos no deseados en otros caracteres. Este TFG se ha planteado como un primer paso hacia la validación de un marcador genético descrito recientemente (enero 2016) en porcino.

En este TFG hemos utilizado dos poblaciones porcinas para estudiar si el marcador *PCK1*, además de influir la distribución de la grasa en la canal, también afectaba la composición de ácidos grasos. Las dos poblaciones representan una raza más grasa con mayor grasa dorsal y GIM (Duroc) y razas de mayor crecimiento y más magras (LWxLD). Estas dos poblaciones se cruzan para obtener los cerdos que se utilizan para elaborar el Jamón de Teruel (DOP) y es el cruce utilizado por Latorre y colaboradores en su trabajo. El análisis de los datos de crecimiento, engrasamiento y composición de la grasa confirmó las diferencias descritas por otros autores (Smith et al., 1990; Buchanan y Stadler, 2010).

La mutación *PCK1 c.2456C* segrega en ambas poblaciones a frecuencias intermedias aunque la frecuencia del alelo favorable A era superior en LWxLD (0.635) que en Duroc (0.45). Las frecuencias intermedias permitirían implementar fácilmente una selección a favor del alelo favorable en estas dos poblaciones. Las frecuencias obtenidas difieren de las obtenidas por Latorre y colaboradores, que describieron que el alelo favorable era más frecuente en cerdos grasos como el jabalí, el Ibérico o el Duroc mientras que era mucho más baja en cerdos magros como el Piétrain o Piétrain x Large White (Tabla 22). Sin embargo nuestro trabajo ha encontrado una frecuencia más elevada del alelo A en la población magra LWxLD que en la grasa Duroc.

Tabla 22. Frecuencias alélicas del marcador PCK1 c.A2456C en varias razas y cruces porcinos. Datos de Latorre et al. 2016 y propios de este TFG

	p (alelo A)	Referencia
Jabalí	0,88	Latorre et al 2016
Ibérico	0,85	Latorre et al 2016
Duroc, línea 1	0,81	Latorre et al 2016
Duroc, línea 2	0,59	Latorre et al 2016
Duroc, línea 3	0,45	TFG
Duroc x Landrace-Large White	0,67	Latorre et al 2016
Duroc x Landrace-Large White	0,55	TFG**
Large White x Landrace	0,635	TFG
Piértrain x Large White	0,35	Latorre et al 2016
Piértrain	0,31	Latorre et al 2016

** Estimado a partir de las frecuencias de las dos poblaciones analizadas en este TFG.

Se realizó un estudio de asociación entre el genotipo *PCK1* y los datos productivos de las dos poblaciones. El primer paso fue estudiar caracteres de engrasamiento que incluían medidas del espesor de la GD y el contenido en GIM en varios músculos que ya habían estado analizadas en Latorre et al. 2016. Esto nos permitiría validar los resultados publicados en nuestras poblaciones. Sin embargo no pudimos replicar con nuestros datos los presentados en Latorre et al. 2016. En particular, según Latorre et al., 2016, el contenido de GIM del alelo A supera el del alelo C en dos de los tres músculos analizados (+20,44% en *longissimus dorsi*, +11,07% en *psaos major* y sin cambios en *biceps femoralis*) y promueve una GD 9,9% inferior. En el caso de este TFG, el efecto favorable del alelo A sobre la GIM solo se observó en los cerdos LWxLD (n=48; P < 0.1) y pero no en Duroc (ni en *gluteus medius* (n=268), ni en *longissimus dorsi* (n=130), ni en semimembranoso (n=48)). Sin embargo, y contrariamente a lo descrito por Latorre et al., 2016 y no obstante esperable dada la correlación genética positiva que existe entre GD y GIM, la grasa dorsal de los cerdos AA era mayor que la de los CC aunque solo en Duroc (no había diferencias en LWxLD).

Estos primeros resultados ya nos indican que este marcador funciona de manera distinta en las líneas Duroc y LWxLD que en su cruce [Duroc x (LWxLD)].

El resto de los caracteres estudiados no habían sido analizados en Latorre et al., 2016. Por ejemplo, la evolución del peso vivo a distintas edades (más elevado en los LWxLD de genotipo AA en algunos puntos temporales) y la composición de la grasa en distintos tejidos. Respecto a este último punto, los efectos más consistentes se encontraron en LWxLD en el contenido de MUFA y ácido oleico en cerdos AA (5% superior) en GD y en GIM (20% menor). En músculo, además, este genotipo iba acompañado de un menor contenido en PUFA (-7%) mientras que en GD aumentaban los SFA (+20%). Así los cambios más prominentes se registran a nivel de la GD, con grasa más saturada en cerdos AA. Es de prever que la temperatura de fusión de esta grasa será más elevada lo que puede tener relevancia en

la calidad tecnológica de estas canales, particularmente en los productos procesados como el embutido y los curados.

Hay varias posibles explicaciones a la falta de replicación de los resultados publicados por Latorre et al., 2016. Un primer motivo indicaría que la mutación c.A2456C no es la causal sino que está cercana a otra mutación responsable de los cambios en el contenido de grasa. Las mutaciones causales deberían causar el mismo efecto en todos los cerdos portadores y, sin embargo, éste no es el caso dados nuestros resultados. Además de mutaciones que cambian la secuencia de las proteínas, cambios en los promotores pueden ser importantes para determinar la cantidad de proteína que se produce y, por tanto, la actividad enzimática. En nuestro caso, la secuenciación del promotor mostró varias mutaciones tipo SNP, algunas de las cuales podrían afectar la unión de factores de transcripción relacionados con la maduración del músculo (Myf-3, MyoD) o de adipocitos (C/EBP, RXR α) y también de la activación de rutas lipogénicas (C/EBP, RXR α , HNF1). Aunque no hemos demostrado que estas mutaciones cambien la transcripción del gen, son buenos SNPs alternativos para explicar la causalidad de este gen. Por ejemplo, como se ha comentado en la Sección 2, Antedecentes, en un estudio en ratones transgénicos que sobreexpresaban 100 veces la forma citosólica de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa en músculo esquelético se observó un contenido de triglicéridos en músculo cuatro veces mayor, teniendo por tanto, mayor contenido de GIM (Hakimi et al., 2007). Estos presentaban además cantidades pequeñas de grasa subcutánea y visceral, y otras características (como hiperactividad, longevidad, valores menores de glucemia, triglicemia y ácidos grasos libres en plasma) que no se controlan rutinariamente en cerdos en engorde.

Otra explicación sería que lo observado en Latorre et al. 2016 se debiera a la acción de más de un gen (epistasia). Uno de estos genes sería *PCK1* y el segundo solo se manifestaría en cerdos cruzados ya que no hemos sido capaces de replicar los mismos resultados en las razas/cruces a partir de las que crean los híbridos utilizados en ese estudio. El segundo gen podría ser, por ejemplo, la acetil-coA carboxilasa, que inicia la ruta de síntesis de triglicéridos. Esta es una explicación bastante plausible dada la reacción en cadena de los metabolitos de estas rutas.

Por último, los métodos estadísticos utilizados en ambos trabajos son también distintos ya que Latorre et al., 2016 usaron estadística Bayesiana y nosotros hemos optado por opciones frecuentistas. Sin embargo, aunque el test estadístico puede variar ligeramente los valores de significación (o de relevancia) no puede explicar la falta de concordancia entre los dos trabajos.

6.1. Implicaciones de la investigación sobre el sector porcino

En ganadería, el esquema tradicional de mejora genética involucra la obtención de al menos dos líneas, una materna (normalmente cruzada de dos líneas) y otra paterna, que se cruzan posteriormente para producir los animales destinados a la producción comercial (cruce de tres vías). Este esquema básico ha proporcionado una sustancial mejora en la eficacia y la rentabilidad del sector porcino. En caracteres de crecimiento se están obteniendo incrementos del orden del 1% anual, y en caracteres reproductivos, el tamaño medio de camada (nacidos vivos) ha pasado de 9,76 a 11,39. Como

consecuencia, es previsible que estos caracteres tengan menos peso en la selección en un futuro próximo, y hace previsible que se consideren nuevos grupos de caracteres. Entre estos nuevos grupos de caracteres, destacan por su importancia los relacionados con la **calidad de la carne**, tanto en el aspecto sensorial de la misma, como en su relación con la salud humana.

El desarrollo de **marcadores moleculares** ha revolucionado los planteamientos de la mejora genética puesto que proporcionan información directa acerca del patrimonio genético de los animales desde su nacimiento, acortando así los intervalos generacionales y mejorando los índices de respuesta a la selección. A través de los marcadores moleculares, pueden llevarse a cabo estrategias de selección asistida por marcadores, complementando la información fenotípica con la molecular.

Debido a su reciente identificación (Enero de 2016), la mutación causal *PCK1* aquí estudiada no ha sido todavía testada en condiciones de selección de líneas comerciales, por lo que se desconoce su **impacto a nivel económico** sobre este sector. Sin embargo, los resultados publicados en líneas comerciales de producción (Latorre et al., 2016) indican que podría tener un impacto muy relevante en los esquemas de mejora dado que la variante *c.A2456C* se asocia a un menor espesor de grasa dorsal y, al mismo tiempo, mayor contenido en grasa intramuscular en los cerdos cruzados comerciales. Éste es un efecto muy deseado por el sector porcino ya que la grasa subcutánea no se paga mientras que la grasa intramuscular, en una cantidad óptima, es muy deseable para la producción de carne fresca (2-3%) como para productos curados (4-6%).

Actualmente, el precio de las canales varía en función del porcentaje de magro. En España, el contenido de carne magra de la canal se calcula utilizando una ecuación homologada en función de variables medidas por ultrasonido (BOE, 2011). Las canales se clasifican en las categorías indicadas en la Tabla 23.

Tabla 23. Criterio de clasificación de las canales porcinas según RD 1028/2011. (BOE, 2011).

Clase	Nombre de la clase	Contenido de carne magra expresada en porcentaje del peso en canal
S	Superior	60 o más
E	Excelente	55 hasta menos de 60
U	Muy buena-Estándar	50 hasta menos de 55
R	Buena	45 hasta menos de 50
O	Menos buena	40 hasta menos de 45
P	Mediocre	Menos de 40

Así, las medidas de espesor de la grasa dorsal y porcentaje de magro están correlacionadas negativamente, es decir, a menor espesor de GD, mayor porcentaje de magro. Estos dos parámetros se pueden relacionar a partir de la siguiente ecuación, estimada a partir de todos los datos de la población Duroc (n=1362) de la que se tomó el subgrupo para este TFG. Se ha realizado solo para los animales Duroc puesto que se trata de una raza pura en la cual se puede hacer selección, y no en el cruce LWxLD donde habría que conocer la frecuencia de cada línea pura del núcleo de selección por separado.

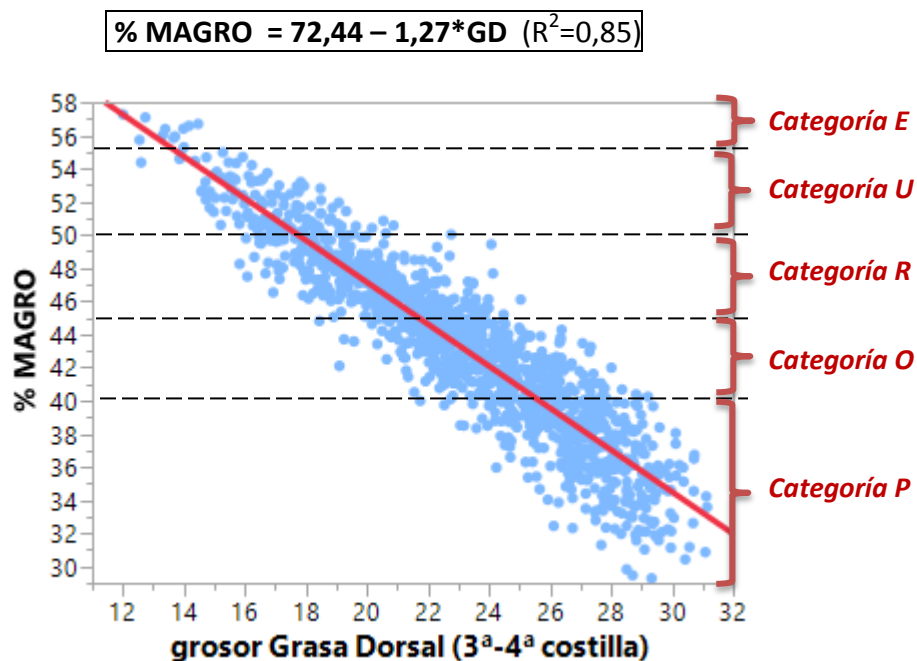


Figura 20. Correlación entre el grosor de la grasa dorsal y el porcentaje de magro en la población Duroc (n=1362) de la que proviene el grupo de cerdos Duroc utilizados en este TFG.

Si aplicamos la clasificación según categorías (BOE, 2011), los 1362 animales de raza Duroc de esta base de datos quedarían distribuidos de la siguiente manera (Tabla 24).

Tabla 24. Clasificación de las canales de la población Duroc según su porcentaje de magro.

Categoría	n	%
S	0	0
E	11	1%
U	123	9%
R	367	27%
O	463	34%
P	398	29%
Total	1362	100%

Según Latorre et al., 2016, el efecto de sustitución del alelo C por el A (alelo favorable) es de -0,9796 mm de GD. ¿Qué **implicaciones económicas** tendría la selección a favor de este marcador?

Escenario 1 (ficticio y extremo): Supongamos que tenemos una población de cerdos todos con genotipo CC y que la sustituimos por cerdos AA. El efecto medio que observaríamos por substituir cerdos CC por cerdos AA sería de $2*(-0,9796) = 1,9592$ mm. Esto se traduciría (de la ecuación anterior) en 2,5% más de magro.

Dado que las categorías de las canales distan un 5% de magro entre sí, esto significa que, aproximadamente, dentro de cada categoría, las canales situadas en la mitad inferior, el 2,5% adicional de magro no comportaría cambio de precio, pero para el resto (50% de las canales) sí (asumiendo distribución uniforme dentro de cada franja, y sin tener en cuenta que la categoría P es más amplia, por

lo que solo beneficiaría a los cerdos de porcentaje de magro cercano a “O”). Es decir, habría una **mejora** en la franja de **precio** para cerca mitad de las canales lo cual mejoraría los ingresos de la empresa.

Escenario 2 (más cercano a un caso real): Tomemos el caso de los 271 cerdos Duroc genotipados en este TFG, para los que se tienen datos de GD y %magro de 251 de ellos. Si repetimos la regresión de GD sobre %magro (Figura 21) obtenemos una ecuación de regresión para estos datos bastante parecida a la anterior:

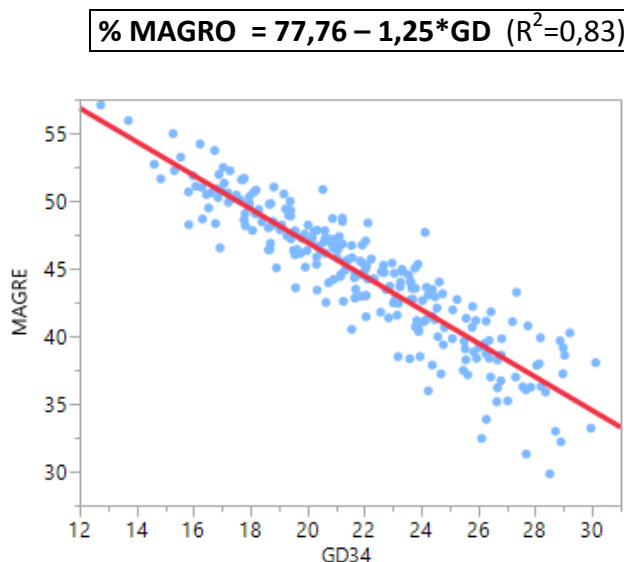


Figura 21. Correlación entre el grosor de la grasa dorsal y el porcentaje de magro en la población Duroc (n=251) utilizados en este TFG

Con la nueva ecuación, el efecto de sustitución de un alelo C por un A (favorable) incrementaría el magro de los cerdos en +1,23%; resultado de multiplicar 0,9796mm de GD (Latorre et al., 2016) por 1,25 (ecuación para n=251).

En la población Duroc de este TFG hay cerdos de genotipo AA, AC y CC (Tabla 25; población inicial). Y según el porcentaje de magro de su canal, estos cerdos se distribuirían en las categorías SEUROP según se muestra en la Figura 22 (izquierda) y la Tabla 26 (población inicial).

Supongamos ahora la situación en que seleccionamos los machos para la siguiente generación según su genotipo *PCK1 c.A2456C* de manera que solo utilizamos machos de genotipo AA. En la siguiente generación todos los cerdos tendrían por lo menos un alelo A proveniente del padre y un alelo A o C según la madre. Aunque de las madres no se dispone de ningún dato, pero para simplificar, se supone que la estructura genética (frecuencias genotípicas y alélicas) de las madres es similar a la de los 251 machos Duroc, al tratarse de una raza pura. La distribución de genotipos en la siguiente generación sería la indicada en la Tabla 25, donde los animales de genotipo CC pasarían a AC y los AC de la población inicial se unirían con los AA. El incremento de magro de los CC y AC sería de +1,23%, tal como se ha comentado en el párrafo anterior, mientras que los cerdos que ya tenían genotipo AA no mejorarían en este escenario. Esta mejora en el porcentaje de magro resultaría en cambios de categoría, particularmente P y O (en negativo) y de E y U (en positivo) (Figura 22 y Tabla 25). En conjunto habría un 11% de cambios de categoría distribuidos en un 5,6% menos en categorías de menor magro y un 5,6% más de cerdos en categorías de cerdos más magros.

En este segundo escenario, en el que solo se valora el cambio en un alelo en la parte de la población que puede beneficiarse del nuevo alelo (no en los cerdos AA), no hay una mejora tan espectacular de los ingresos de la empresa, y probablemente sea una situación más cercana a la realidad.

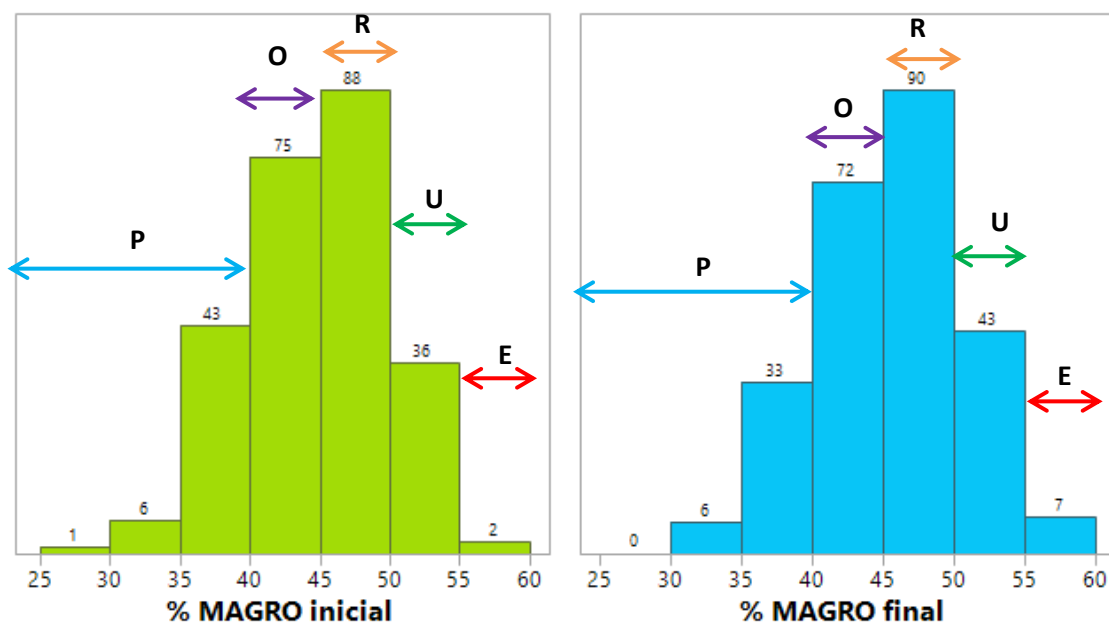


Figura 22. A la izquierda, distribución del % magro inicial en las canales de la población Duroc (n=251), dado el escenario hipotético 2. A la derecha, porcentaje de magro final, en el cual, se ha añadido un 1,23% más de magro en los genotipos CC y AC. En la parte superior de cada intervalo se indica el número de animales que pertenecen a éste. Con flechas se indican las categorías de clasificación de las canales según el BOE, 2011.

Tabla 25. Número de animales pertenecientes a cada genotipo en el momento inicial y tras el cruzamiento de un alelo A (padre) con uno A o C (madre).

Genotipos	Población inicial	Tras cruzar con machos AA
AA	53	53 + 60= 113
AC	120	78 + 60= 138
CC	78	-
Total	251	251

Tabla 26. Número de animales según la categoría de clasificación de las canales en la población inicial y tras cruzar con machos AA (aumento 1,23% magro de los genotipos CC y AC). Entre paréntesis se indica el porcentaje que representa cada categoría en función del total. La columna central señala el porcentaje del cambio de una categoría a otra. También se indican dos semanas de precios de mercado muy diferente; en negrita lo valores más altos.

Categoría	Población inicial	Población tras cruzar con machos AA	Incremento (en %)	Semana ejemplo de precios bajos (€/100 kg canal)	Semana ejemplo de precios altos (€/100 kg canal)
S	0 (0%)	0 (0%)	-	120,26	168,27
E	2 (0,8%)	7 (2,8%)	+2.0%	117,01	163,03
U	36 (14,3%)	43 (17,1%)	+2.8%	120,36	170,86
R	88 (35,1%)	90 (35,9%)	+0.8%	119,57	172,95
O	75 (29,9%)	72 (28,7%)	-1.2%	112,06	167,15
P	50 (19,9%)	39 (15,5%)	-4.4%	107,06	153,41
<i>Total</i>	251	251			
29/02/2016-06/03/2016 Semana ejemplo de precios bajos					
22/08/2016-28/08/2016 Semana ejemplo de precios altos					
http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/informe-semanal-coyuntura/2016.aspx					

De confirmarse, con otros trabajos, el efecto dual de esta mutación sobre el depósito de grasa dorsal/intramuscular, la información de este marcador sería de gran ayuda en los esquemas de selección porcina de nuestro país e internacionalmente. Sin embargo los resultados presentados en este TFG no permiten validar esta mutación como causal ni aconsejan su utilización, por lo menos en Duroc.

7. CONCLUSIONES

1. La mutación *PCK1 c.A2456C* **segrega** en la raza Duroc, y en los cerdos cruzados Large White x Landrace a frecuencias intermedias, lo cual es muy favorable para integrar este marcador en un esquema de mejora.

2. En estas dos poblaciones, **no** se han podido **replicar** los resultados publicados por Latorre et al., 2016 en cuanto a un **efecto favorable** del alelo A aumentando la cantidad de grasa intramuscular y disminuyendo la dorsal.

3. En su conjunto, el marcador *PCK1 c.A2456C* tiene muy **poca influencia** sobre la **composición de la grasa** excepto en los cerdos LWxLD, donde varió el porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados en la grasa intramuscular, los saturados en la grasa dorsal y los monoinsaturados en ambos tejidos.

4. Los resultados obtenidos en este TFG **no validan la causalidad** de la mutación *PCK1 c.A2456C*. Esto podría ser debido a la interacción de otros genes; o a la existencia de otra mutación causal en este gen, como las que hemos descrito en el promotor; o por la interacción (epítasis) entre este y otro marcador en los cerdos cruzados Duroc x (Large White x Landrace) pero no en los grupos parentales.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Barb, C. R., Hausman, G. J., & Houseknecht, K. (2001). Biology of leptin in the pig. *Domestic Animal Endocrinology*, 32 (6): 375-379.
- BOE. (2011). Real Decreto 1028/2011, de 15 de julio, por el que se establecen disposiciones de aplicación relativas a la clasificación de las canales de porcino. Madrid, España: 185 (pp. 87921-87930).
- Buchanan, D., & Stalder, K. (2010). Breeds of Pigs. In *The Genetics of the Pig. 3rd Edition. Edited by M. F. Rothschild and A. Ruvinsky*.
- Cameron, N.D.; Enser, M.; Nute, G.R.; Whittington, F.M.; Penman, J.C.; Fiskén, A.C.; Perry, A.M.; Wood, J.D. (2000). Genotype with nutrition interaction on fatty acid composition of intramuscular fat and the relationship with flavour in pig meat. *Meat Science*, 55:157-195.
- Cánovas, A. (2011). *Genes asociados con la deposición y composición de grasas en porcino: estudios de expresión génica, proteínas y genética funcional y estructural*. Tesis doctoral. Universitat de Lleida.
- Coma, J., & Piquer, J. (1999). Calidad de carne en porcino: efecto de la nutrición. *FEDNA*.
- Davoli, R., & Braglia, S. (2008). Molecular approaches in pig breeding to improve meat quality. *Briefings in functional genomics and proteomics*, Vol. 6, No. 4, 313-321.
- Eikelenboom, G., & Minkema, Y. D. (1974). Prediction of pale, soft, exudative muscle with a non-lethal test for halothane induced porcine malignant hyperthermia syndrome. *Neth. J. Vet. Sci.*, 99: 421-426.
- Ernst, C. W., & Steibel, J. P. (2013). Molecular advances in QTL discovery and application in pig breeding. *Trends in Genetics*, Vol. 29, No. 4.
- Estany, J., Ros-Freixedes, R., Tor, M., Pena, R. (2014). A functional variant in the stearoyl-CoA desaturase gene promoter enhances fatty acid desaturation in pork. *PLoS One*, 9(1).
- FAO. (2010). Fats and fatty acids in human nutrition: Report of an expert consultation. *FAO Food and Nutrition*, 91.
http://www.who.int/nutrition/publications/nutrientrequirements/fatsandfattyacids_humannutrition/en/.
- Fortin, A., Robertson, W., & Tong, A. (2005). The eating quality of Canadian pork and its relationship with intramuscular fat. *Meat Science*, 69:297-305.
- Fraga, A. L.; Thomaz, M. C.; Kronka, R. N.; Budiño, F.; Huaynate, R. A. R.; Scandolera, A. J.; Ruiz U. S.; D, U. S.; Angelis, F. H. F. (2009). Qualitative-feed-restricted heavy swine: meat quality and morpho-histochemical characteristics of muscle fibers. *Brazilian Archives Biology and Technology*, 52 (5): 1145-1156.

- Frayn, K. N. (1998). *Regulación del metabolismo: una perspectiva humana*. Ed. Omega.
- Fujii, J.; Otsu, K.; Zorzato, F.; De Leon, S.; Khanna, V. K.; Weiler, J. E.; O'Brien, P. J.; MacLennan, D. H. (1991). Identification of mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*, 253: 448-451.
- Gandemer, G. (2002). Lipids in muscles and adipose tissues, changes during processing and sensory properties of meat products. *Meat Sci.*, 62, 309-321.
- Guillou, H., Zdravec, D., Martin, P.G., Jacobsson, A. (2010). The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Progress in Lipid Research*, 49, 186-199.
- Hakimi, P.; Yang, J.; Casadesus, G.; Massillon, D.; Tolentino-Silva, F.; Nye, C. K.; Cabrera, M. E.; Hagen, D. R.; Utter, C. B.; Baghdy, Y.; Johnson, D. H.; Wilson, D. L.; Kirwan, J. P.; Kalhan, S. C.; Hanson, R. W.; (2007). Overexpression of the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in skeletal muscle repatterns energy metabolism in the mouse. *Journal of Biological Chemistry*, 282 (45): 32844-32855.
- Hooper, L., Summerbell, C., Thompson, R., Sills, D., Roberts, F., Moore, H., & Davey Smith, G. (2012). Reduced or modified dietary fat for preventing cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev*.
- Jiménez-Colmenero, F., Carballo, J., & Cofrades, S. (2001). Healthier meat and meat products: their role as functional foods. *Meat Science*, 59: 5-13.
- Kloareg, M., Noblet, J., & van Milgen, J. (2007). Deposition of dietary fatty acids, de novo synthesis and anatomical partitioning of fatty acids in finishing pigs. *British Journal of Nutrition*, 97: 35-44.
- Klont, R.E., Lambooy, E., Van Logtestijn, J.G. (1994). Effect of dantrolene treatment on muscle metabolism and meat quality of anesthetized pigs of different halothane genotypes. *J Animal Sci*, 72: 2008-16.
- Latorre, P., Burgos, C., Hidalgo, J., Varona, L., Carrodeguas, J., & López-Buesa, P. (2016). c.A2456C-substitution in Pck1 changes the enzyme kinetic and functional properties modifying fat distribution in pigs. *Scientific Reports*, 21: 6.
- López-Bote, C., Isabel, B., & Rey, A. (1998). Sistemas de producción porcina y calidad de la carne. El cerdo ibérico. *Anaporc*, 177: 50-73.
- Martínez, S., Campos, C., Madrid, J., Cerón, J., Orengo, J., Tvarijonaviciute, A., & Valera, L. H. (2013). Conocimiento actual de las hormonas reguladoras de la ingestión de alimentos en la especie porcina. *An. Vet.*, 29: 7-22.
- Milan, D.; Hawken, R.; Cabau, C.; Leroux, S.; Genet, C.; Lahbib, Y.; Tosser, G.; Robic, A.; Hatey, F.; Alexander, L.; Beattie, C.; Schook, L.; Yerle, M.; Gellin, J. (2000). IMPRH server: an RH mapping server available on the web. *Bioinformatics*, 16: 558-559.
- Monin, G., & Sellier, P. (1985). Pork of low technological quality with a normal rate of muscle pH fall in the immediate post-mortem period: The case of the Hampshire breed. *Meat Sci.*, Vol. 13, 49-63.

- Murray, A. (1995). The evaluation of muscle quality. In *Quality and grading of carcasses of meat animals*. S.D. Morgan Jones, Ed., CRC Press, New York, 234 pp.
- Olsson, V., & Pickova, J. (2005). The influence of production systems on meat quality, with emphasis on pork. *Ambio*, 34 (4-5):338-43.
- Ovilo, C.; Fernández, A.; Fernández, A. I. ; Folch, J. M.; Varona, L.; Benítez, R.; Nuñez, Y.; Rodríguez, M. C.; Silió, L. (2010). Hypothalamic expression of porcine leptin receptor (LEPR), neuropeptide Y (NPY), and cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) genes is influenced by LEPR genotype. *Mamm Genome*, 21: 583-591.
- Pérez-Montarelo, D.; Fernández, A.; Folch, J.M.; Pena, R.N.; Óvilo, C.; Rodríguez, C.; Silió, L.; Fernández, A.I. (2012). Joint effects of porcine leptin and leptin receptor polymorphisms on productivity and quality traits. *Animal Genetics*, 43, 805-809.
- Ramsay, T. Y. (1998). The Obesity Gene in Swine: Sequence and Expression of Porcine Leptin. *J. Anim. Sci.*, vol. 76, p. 484-90.
- Ruiz-Carrascal, J., Ventanas, J., Cava, R., Andrés, A., García, C. (2000). Texture and appearance of dry cured ham as affected by fat content and fatty acid composition. *Food Res Int*, 33(2): 91-95.
- Smith, W., Pearson, G., & Purchas, R. (1990). A comparison of the Duroc, Hampshire, Landrace, and Large White as terminal sire breeds of crossbred pigs slaughtered at 85 kg liveweight. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 33:1, 89-96.
- Stewart, J., Kaplan, M., & Beitz, D. (2001). Pork with a high content of polyunsaturated fatty acids lowers LDL cholesterol in women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74: 179-187.
- Storruelløkken, L., Ekeberg, D., Egeland, B., Haseth, T., & Alvseike, O. (2014). Effect of Intramuscular Fat, Breed, and Age at Slaughter on Fatty Acid Composition in Green Hams. *Journal of Food Science*, 79 (10): C1916-C1925.
- Switonski, M., Stachowiak, M., Cieslak, J., Bartz, M., & Grzes, M. (2010). Genetics of fat tissue accumulation in pigs: a comparative approach. *Genetics of pig fatness*, Vol. 51, No.2, p. 153-168.
- Tamay de Dios, L. I. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*, Vol. 2, Núm. 2, pp 70-78.
- Tejeda, J., Gandemer, G., Antequera, T., Viau, M., & García, C. (2002). Lipid traits of muscles as related to genotype and fattening diet in Iberian pigs: total intramuscular lipids and triacylglycerols. *Meat Science*, 60: 357-363.
- Ventanas, S., Ventanas, J., & Ruíz, J. (2007). Sensory characteristics of Iberian dry-cured loin: influence of crossbreeding and rearing system. *Meat Science*, 75: 211-219.
- Webb, E., & O'Neil, H. (2008). The animal fat paradox and meat quality. *Meat Science*, 80: 28-36.
- Wood, J., Enser, M., Fisher, V., Nute, G., Sheard, P., Richardson, R., Hughes, S., Whittington, F. (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Sci*, 78(4): 343-358.

- Wood, J., Nute, G., Richardson, R., Whittington, F., Southwood, O., Plastow, G., Mansbridge, R., da Costa, N., Chang, K. (2004). Effects of breed, diet and muscle on fat deposition and eating quality in pigs. *Meat Sci* , 67(4): 651-667.
- Wood, J.D.; Richardson, R.I.; Nute, G.R.; Fisher, A.V.; Campo, M.M.; Kasapidou, E.; Sheard, P.R.; Enser, M. (2003). Effects of fatty acids on meat quality: A review. *Meat Science*, 66, 21-32.
- Yang, J., Kalhan, S., & Hanson, R. (2009). What is the metabolic role of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase? *The Journal of Biological Chemistry*, Vol.289, Nº40, pp. 27025-27029, <http://www.jbc.org/content/284/40/27025.full.pdf>.

Páginas web consultadas

http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3

www.ensembl.org

<http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/informe-semanal-coyuntura/2016.aspx>

<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

<http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/bioquimica-estructural-y-metabolica/materiales-de-clase/Tema%2015.%20Biosintesis%20de%20acidos%20grasos.pdf>

<http://www.recipesforlinux.com/2013/12/26/cerdo-despiece-cortes-partes/>.

<http://stabvida.com>

http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_053175.pdf.