



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE  
SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y  
ZOOTECNIA



DIVISIÓN DE ESTUDIOS  
DE POSGRADO  
DE LA  
FACULTAD DE MEDICINA  
VETERINARIA Y ZOOTECNIA

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Tesis**

**ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO MOLECULAR DE GENES DE  
LA CALPAÍNA DE GUAJOLOTE (*Meleagris gallopavo*)**

Para obtener el grado de Maestro en Ciencias

Presenta:

**BIOL. MARCIAL EYMARD CONTRERAS CAMPOS**

ÁREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA PECUARIA

ASESOR: DR. HORACIO CANO CAMACHO

CO-ASESORA: DRA. MARÍA GUADALUPE ZAVALA PÁRAMO



Agosto 2013

## INDICE

RESUMEN .....	4
INTRODUCCIÓN .....	6
ANTECEDENTES .....	9
Situación del guajolote en Michoacán .....	9
Calpaínas .....	10
Calpaína 1 .....	13
Calpaína 3 .....	14
Calpastatina .....	15
Estructura CAPN – CAST .....	16
Estudios de SNPs en CAPNs de pollo .....	17
Estudios moleculares de guajolote domesticado en Michoacán .....	20
JUSTIFICACIÓN .....	22
HIPÓTESIS .....	23
OBJETIVOS .....	23
MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
Material biológico .....	24
Purificación de ADN .....	24
Amplificación por PCR .....	25
Secuenciación y análisis de datos .....	26
Análisis de estructura tridimensional de las proteínas .....	26
RESULTADOS .....	27
Extracción de ADN .....	27
CAPN1 .....	27
Amplificación de CAPN1F1 (Exón 5) .....	27
Amplificación de CAPN1F3 (Exón 16) .....	30

CAPN3 .....	31
Amplificación de CAPN3F4 (Exón 8) .....	31
Amplificación de CAPN3F6 (Exón 10) .....	32
Distribución de los SNPs en los grupos genéticos y haplotipos de <i>M. gallopavo</i> domesticado de Michoacán .....	33
DISCUSIÓN .....	35
CAPN1 .....	35
CAPN3 .....	36
Distribución de los SNPs en los grupos genéticos y haplotipos de <i>M. gallopavo</i> domesticado de Michoacán .....	36
BIBLIOGRAFÍA .....	38

## RESUMEN

En México, el guajolote doméstico persiste actualmente en pequeñas rancherías, en sistemas de producción de traspatio, como fuente importante de alimentación, como medio de subsistencia económica y como parte valiosa de la cultura de las familias rurales. Su conservación como práctica ganadera requiere del aporte de tecnología que incremente los beneficios económicos de las familias y que garantice la inocuidad, la productividad y otras características que resultan atractivas para el consumidor urbano. Sus cualidades para el consumo son candidatas para mejorar su aceptación. Una característica importante valorada por los consumidores es la suavidad de la carne, la cual depende de múltiples factores como el sexo, edad, alimentación, factores genéticos y procesos industriales. En bovinos, porcinos y ovinos la suavidad de la carne se ha asociado con la descomposición por calpaínas las cuales también están presentes en pollo y guajolote y cumplen un papel similar en los procesos de suavidad de la carne de estas especies.

En este estudio se analizó el polimorfismo de un nucleótido simple (SNP) de fragmentos de los genes de calpaína 1 (*CAPN1*) y calpaína 3 (*CAPN3*) correspondientes a los exones que codifican para el dominio catalítico CysPc de ambas enzimas, a partir de muestras biológicas de una población de 24 individuos de guajolote domesticado mexicano de cuatro regiones fisiográficas del Estado de Michoacán, Bajío, Faja Volcánica Transmexicana, Bajío y Sierra. Adicionalmente, debido a que se cuenta con la caracterización morfométrica y genética de estos individuos a través de siete loci de microsatélites, se revisó la distribución de los SNPs detectados entre los grupos genéticos y sus características morfométricas.

Se detectó un SNP en la secuencia de nucleótidos analizada para el gen *CAPN1* (transición G712A) que ocasiona un polimorfismo en la secuencia de aminoácidos deducidos del dominio catalítico (R225H) en siete individuos de 24 analizados. Por lo anterior se sugiere la presencia de dos alelos para *CAPN1* en la población de Michoacán. Estos dos alelos en la población de Michoacán fueron diferentes al reportado para guajolote en base de datos ya que todas las secuencias mostraron dos SNP (Inserción T605-, Transición G607A). Los individuos con el polimorfismo (R225H) se distribuyeron entre los tres grupos genéticos identificados previamente y se ubicaron en tres regiones fisiográficas de Michoacán: Bajío (n=4), Faja Volcánica Transmexicana (n=2) de Sierra (n=1). La mayoría de los individuos con el polimorfismo se encontraron en la región Bajío

que presenta individuos con morfometría intermedia y la mayor heterocigocidad respecto al resto de las regiones fisiográficas.

Se detectó un SNP en *CAPN3* en ocho de las secuencias de los 24 individuos de Michoacán, sin embargo, este SNP se localizó en un intrón, por lo cual no tiene efecto en la estructura del dominio CysPc del gen, pero si sugiere la presencia de dos alelos dentro de esta población de guajolote. Sin embargo, mostró tres polimorfismos (G445D, E446T, Q447F) en todos los individuos sugiriendo un alelo diferente en la población de Michoacán.

## INTRODUCCIÓN

Los guajolotes fueron domesticados originalmente por diferentes grupos prehispánicos como los Aztecas, Purépechas, Huicholes y otras etnias mexicanas, entre los años 200 y 700 AC, antes de la llegada de los europeos a América (Crawford, 1992). Los guajolotes domésticos llegaron a España a principios del siglo XVI y de ahí pasaron sucesivamente a Inglaterra y a otros países europeos, en los que se realizaron diversos trabajos de selección (Becerril, 2000). Los guajolotes o pavos domésticos existentes en EUA se derivan de ejemplares importados de Europa, donde constituyeron el inicio de la avicultura doméstica (Becerril, 2000). En México, el guajolote doméstico persiste actualmente en pequeñas rancherías, en sistemas de producción de traspatio, como fuente importante de alimentación, como medio de subsistencia económica, y como parte importante de la cultura de las familias rurales (Medrano, 2000; López-Zavala *et al.*, 2008).

El consumo del guajolote en México tiene un arraigo cultural dentro de las festividades ya sea por tradición o algunas incluso con orígenes religiosos una de las principales razones puede ser su bajo costo comparado con la crianza de otras especies como el cerdo y bovinos (López-Zavala *et al.*, 2008). La calidad de la carne constituye un importante factor de interés económico (Chacón, 2004). Entre todos los atributos que contribuyen a la calidad de la carne, la suavidad es el más apreciado por los consumidores. Por lo cual en bovino y cerdo existen algunos estudios para algunas características, como el color, terneza, jugosidad o incluso el sabor no obstante en aves son pocos los estudios realizados y más aun de tipo genético molecular (Chacón, 2004).

Sin embargo, estas poblaciones están pobremente estudiadas, por lo que cualquier información que se obtenga sobre sus características de explotación (productivas, reproductivas, fenotípicas, sanitarias y socioeconómicas) y genético-moleculares (estructura y diversidad genética, razas), es valiosa para dirigir los esfuerzos de conservación, manejo y explotación (López-Zavala *et al.*, 2008).

La suavidad de la carne es un atributo muy importante ya que es muy valorado por los consumidores, la cual hasta ahora no puede cuantificarse antes de la muerte del animal debido a que requiere técnicas destructivas para hacerlo. Además de los múltiples factores ambientales que la afectan (sexo, edad, alimentación y manejo, entre otros), también depende de la magnitud de la proteólisis de las proteínas miofibrilares, proceso que se produce durante los primeros tres o cuatro días postmortem (Motter *et al.*, 2009).

Muchos son los factores asociados a la suavidad de la carne, entre ellos se puede mencionar el tamaño del músculo, existiendo mayor suavidad a menor tamaño, la localización del músculo en el animal vivo, la función fisiológica del músculo, la edad del animal, la especie, el sexo, factores genéticos, procesos industriales posteriores a la matanza, y hasta el temperamento del animal (Chacón, 2004).

En bovinos, porcinos y ovinos la suavidad de la carne se ha asociado con la descomposición por calpaínas (Kemp *et al.*, 2010). También hay pruebas donde el enfriamiento rápido de la carne aumenta del 20 al 40% la fuerza de corte (Obanor *et al.*, 2005) y un pH relativamente alto directamente tiende a endurecer la carne e interferir con el proceso de ablandamiento mediante la alteración de la actividad de la calpaína (Hwang *et al.*, 2003). Las calpaínas están también presentes en pollo (Zhang *et al.*, 2008, 2009) y en guajolote (Northcutt *et al.*, 1998a) y tienen un papel similar en los procesos de suavidad de la carne de estas especies. La pérdida de actividad de la Calpaína 1 (CAPN1) ocurre durante el envejecimiento debido a su inactivación y posterior autólisis (Koohmaraie, 1991). La presencia de calpaína en guajolotes se ha determinado en pechuga de pavos de línea comercial evaluando su actividad proteolítica dentro de las primeras 24 horas postmortem (Northcutt *et al.*, 1998b). La calpaína ha sido implicada como una causa importante de ablandamiento post mortem del músculo esquelético a través de la degradación de las proteínas miofibrilares (Koohmaraie, 1991).

Los cambios *post mortem* en la suavidad de la carne son similares en diferentes especies, pero la escala temporal difiere considerablemente de una especie a otra dependiendo de sus propiedades físico-químicas (Lee *et al.* 2008). Por ejemplo, el pH final se alcanza simultáneamente con el *rigor mortis*, el cual sucede antes en pollo que en los mamíferos. Esto podría ser explicado por el metabolismo muscular más rápido y la utilización de glucógeno en el músculo de pechuga de pollo (Lee *et al.* 2008). El rigor *postmortem* dura más de 24 horas en el ganado vacuno y ovino, pero sólo 6 horas en el músculo de la pechuga de pollo. La suavidad se alcanza después de 8 días en el ganado vacuno, mientras que 8 horas son suficientes en el pollo. Se ha demostrado que el 80% de suavidad máxima se puede alcanzar 7.2 horas después del sacrificio en el pollo, mientras que en cerdo después de 4.2 días, oveja 7.7 días, conejo 9.5 días, y ganado vacuno 10 días. (Lee *et al.* 2008)

Algunos marcadores desarrollados en estudios de especies animales se han correlacionado con características o rasgos fenotípicos, por lo cual se les identifica a cada uno de ellos como *locus para una característica cuantificable* (QTL por sus siglas en

inglés), la identificación de estos marcadores ligados a características de interés productivo en individuos de especies domésticas se ha convertido en una herramienta útil para la *selección asistida por marcadores* (SAM) (López-Zavala *et al.*, 2007). La combinación de esta última con los sistemas de selección animal tradicionales, han permitido que la mejora genética animal logre avances más rápidos, incrementando la confiabilidad de la selección particularmente en algunas características que son difíciles de medir; que se presentan a edades tardías o que se evalúan hasta que los animales son sacrificados (López-Zavala *et al.*, 2007). En la actualidad se han identificado varios marcadores relacionados a características productivas deseables o no deseables en especies productivas tales como bovinos, porcinos y ovinos, cuya utilización en la SAM permite a los productores definir mejor sus metas de producción con calidad (López-Zavala *et al.*, 2007).

La nueva información generada con marcadores genético-moleculares, genes candidatos y QTL, cada vez es más numerosa, y ésta puede ser utilizada para diseñar un esquema de SAM o Selección Asistida por Genes (SAG). Los genes principales (*major genes*) son genes individuales que contribuyen con una proporción significativa en la variación de características económicamente importantes, y la biología molecular puede utilizarse para detectar y caracterizar a estos genes (Dekkers, 2004; Van Eenennaam, 2004; López-Zavala *et al.*, 2007).

El objetivo de este estudio fue aislar, identificar y analizar fragmentos de los genes de calpaína 1 (*CAPN1*) y calpaína 3 (*CAPN3*) para la búsqueda de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), en una población de guajolote doméstico mexicano proveniente de cuatro regiones fisiográficas del estado de Michoacán. Los resultados obtenidos pueden ser empleados posteriormente, en otros trabajos, con la finalidad de buscar su asociación con la calidad de carne de guajolote.

## ANTECEDENTES

### *Situación del guajolote en Michoacán*

De manera preliminar, se realizó un análisis de diversidad genética de poblaciones de traspatio de los Estados de Puebla, y Michoacán (Chassin-Noria *et al.*, 2005; López-Zavala *et al.*, 2005), y posteriormente la caracterización productiva fenotípica, socioeconómica, y genético molecular de poblaciones de traspatio en poblaciones de las cinco regiones fisiográficas de Michoacán, Bajío, Faja Volcánica Transmexicana, Sierra y Costa (López-Zavala 2008; López-Zavala *et al.*, 2008a, 2008b). Mediante encuestas se estableció que los motivos para la crianza de guajolote en las diferentes regiones de Michoacán son variados. El 27% lo hace por tradición familiar, 36% lo hace como medio de subsistencia, 32% se realiza para autoconsumo, mientras que el 6% cría los guajolotes por motivos religiosos (sacrificio en fiestas de santo patrón o pago de diezmo a iglesias) (López-Zavala *et al.* 2008 a, b).

El alojamiento de las aves en gallineros o corrales se realiza 13% en cobertizos, con y sin piso de concreto y percheros, que se localizaron básicamente en las regiones Bajío y Faja Volcánica Transmexicana. En el resto de las unidades productivas de traspatio, las aves pernoctan en árboles o “perchas”, encontrándose este esquema en todas las regiones del estado (López-Zavala *et al.* 2008 b). La participación de la mujer en las labores de crianza y atención de los guajolotes es muy superior a la de otros miembros de la familia; las unidades de producción de traspatio son atendidas en 77% por la madre de familia, 13% por el padre de familia, y solo 10% por los hijos. La madre de familia se encarga no solamente de las labores de la crianza y cuidados de las parvadas de guajolotes, se encarga además de otras aves o animales que se encuentran en el traspatio, como cerdos, cabras o bovinos. (López-Zavala *et al.* 2008 a).

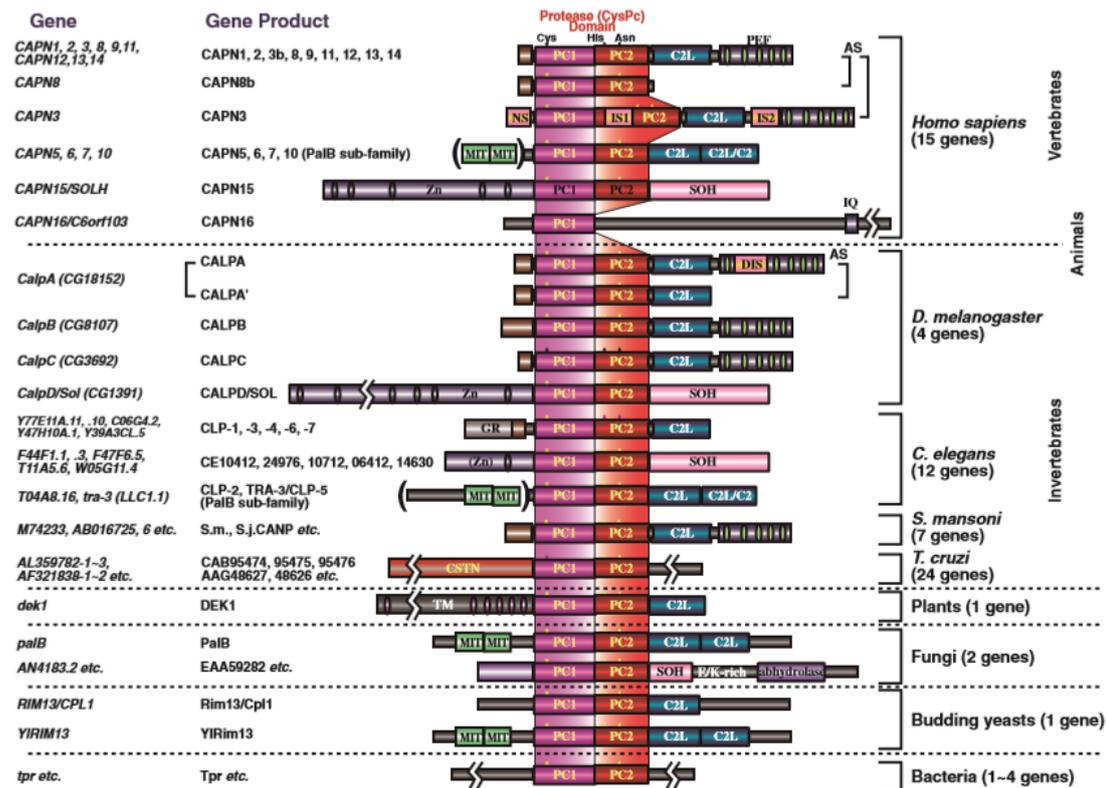
Existen diferencias en los pesos entre las 5 regiones fisiográficas de Michoacán. En el Bajío los machos tienen un peso promedio de 7.86 kg y las hembras de 4.15 kg; en la Faja Volcánica Transmexicana, los machos 9.09 kg y las hembras 4.82 kg; Balsas, machos 7.40 kg y hembras 3.26 kg; Sierra, machos 6.90 kg y hembras 2.97 kg; y en la región Costa, los machos 7.10 kg y las hembras 2.9 kg. (López-Zavala *et al.* 2008 a).

## ***Calpaínas***

Identificadas por primera vez por Guroff en 1964 en el cerebro de ratas, y purificadas finalmente por Ishura *et al.*, en 1978, las calpaínas fueron denominadas inicialmente como CANP por su nombre en inglés Calcium Activated Neutral Protease. (Sorimachi *et al.*, 2010).

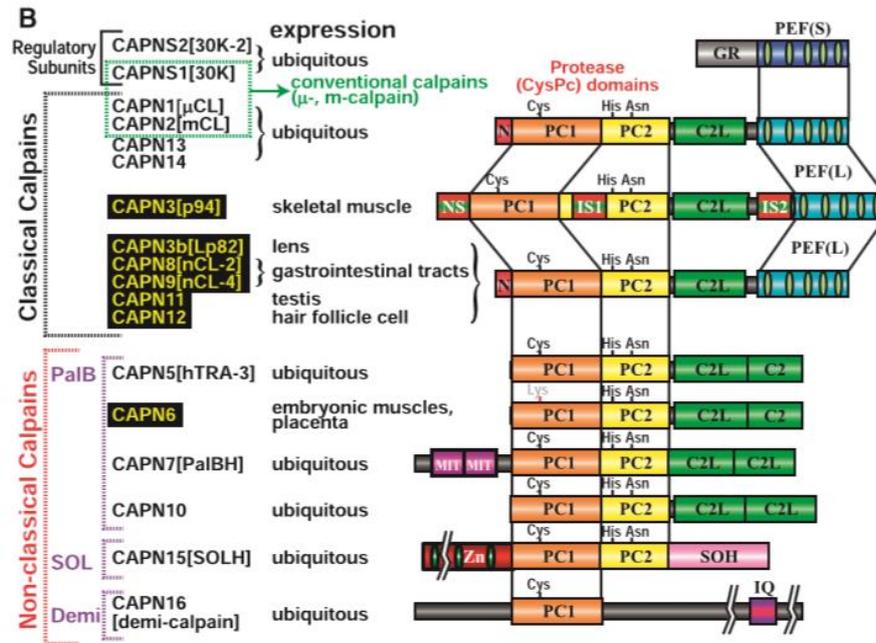
Las calpaínas son una familia de cisteín proteasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares que se encuentran en la mayoría de los eucariotas y algunas bacterias (Figura 1). Las calpaínas convencionales se localizan principalmente en el citosol, muestran la expresión ubicua, y presentan actividad proteolítica dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  a pH neutro. Proteolizan sustratos para transformar y modular sus estructuras y actividades, y por lo tanto son llamadas “proteasas moduladoras” las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en todos los tejidos. El modo de acción es procesar, en lugar de degradar. La calpaína se considera un representante de la proteasa modulador intracelular que regula diversas funciones celulares, tales como la transducción de señales y la morfogénesis celular. La importancia de las funciones fisiológicas de calpaínas puede tener varios efectos en los organismos, incluyendo letalidad, distrofias musculares, lisencefalia, tumorigénesis en los seres humanos, neurogénesis, regulación de los sistemas de transducción de señales, la motilidad celular, reparación de la membrana, y la apoptosis (Sorimachi *et al.*, 2010).

El humano tiene 15 genes de calpaína, y otros mamíferos tienen casi el mismo número (Figura 1). Además de clasificarse por sus características estructurales (clásicas y no clásicas) (Figura 2), las calpaínas de mamíferos se clasifican en dos categorías (ubicuas y específicas) de acuerdo con su tejido u órgano de distribución. La calpaína 1/ $\mu$ CL, calpaína 2/mCL, calpaína 5/hTRA-3, calpaína 7/PalBH, calpaína 10, calpaína 13 y calpaína 15/SOLH son ubicuas (Figura 2), mientras que las expresiones de la calpaína 3/p94, calpaína 8/nCL- 2, calpaína 9/nCL-4, calpaína 6, 11, y 12 están restringidos a los tejidos/órganos específicos (Figura 2). Las calpaínas ubicuas es probable que desempeñen papeles fundamentales para todas las células, mientras que las calpaínas tejido-específicas deben estar involucradas en funciones específicas de los tejidos en los que se expresan. (Sorimachi *et al.*, 2010).



**Figura 1.** Familia de Calpaínas y dominios conservados.

Históricamente, hay varias nomenclaturas para los dominios de calpaína. Para evitar la confusión, los dominios son llamados por la abreviatura correspondiente a la estructura, es decir, PC1 (proteasa principal del dominio 1), PC2 (proteasa dominio básico 2), C2L (dominio C2-like), PEF (penta-EF hand), los Símbolos: N, región N-terminal; PEF (L) y PEF (S), son los dominios del PEF de la subunidad catalítica grande y la subunidad reguladora pequeña, respectivamente; GR, dominio hidrófobo rico en glicina, como, productos de splicing alternativo; NS/IS1/IS2, secuencias característicos de CAPN3; C2, C2 dominio; MIT, motivo de interacción con microtúbulos y de transporte; Zn, Zn-dedo de dominio que contiene; SOH, SOL-homología de dominio; DIS, secuencia de inserción CALPA-específica, TM, dominio transmembrana; CSTN, calpastatina-como dominio, IQ, un motivo de interacción con calmodulina. (Figura 2) (Sorimachi *et al.*, 2011).



**Figura 2.** Clasificación de acuerdo a la estructura de las calpaínas de la familia en humanos (clásicas y no clásicas) y expresión (ubicuas o de tejido específico).

Las calpaínas tienen un inhibidor proteínico muy específico denominado calpastatina, la cual tiene cuatro repeticiones de una unidad de inhibidor, en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  una molécula de calpastatina puede inhibir hasta cuatro moléculas de calpaína (Figura 4) (a excepción de CAPN3). Cuando el músculo deja de recibir oxígeno a causa de la muerte las reacciones metabólicas se modifican, produciéndose ácido láctico a partir de glucógeno. La acumulación de ácido láctico hace descender el pH de 7 hasta 5.4 en un tiempo que va de 15 a 36 hrs postmortem. Esto junto con la baja temperatura (4 a 5°C) a la cual se almacena la carne, favorece la acción de las calpaínas (Koochmaraie, 1992) Durante las primeras 72 hrs de almacenamiento de la carne se produce hasta el 80% de la suavización por efecto de la proteólisis postmortem del músculo relacionado con alta actividad de la calpaína y baja de la calpastatina (Koochmaraie, 1991).

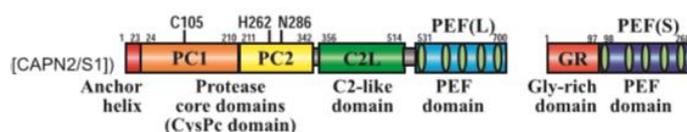
Las calpaínas pueden adquirir diferentes estados de conformación dependiendo de la presencia de bajo o alto  $\text{Ca}^{+2}$ . La unión de  $\text{Ca}^{2+}$  a los sitios de las presentes tanto en las subunidades grandes y pequeñas de calpaína induce cambio conformacional, que finalmente resulta en la reorganización de los dos subdominios catalíticos en un sitio catalítico activo funcionalmente.

Hay tres tipos de calpaínas en el músculo esquelético: una calpaína de tejido específico CAPN3, probablemente involucrada en procesos *postmortem*, y dos calpaínas

ubicuas llamadas calpaínas 1 y 2, o  $\mu$  y  $m$  en referencia a la concentración de calcio necesaria para activarlas. Estas dos enzimas son activadas por autólisis parcial en presencia de calcio. (Lee *et al.* 2008)

### Calpaína 1

Las CAPN1 y CAPN2 contienen cuatro dominios: una hélice de anclaje N-terminal, un dominio de la proteasa CysPc, que se divide en dos dominios proteasa de núcleo (PC1 y PC2), un dominio C2 (C2L), y un dominio penta-EF-hand (PEF (L)). Las CAPN1 y CAPN2 son heterodiméricas con una subunidad grande catalítica (80kD) y una pequeña reguladora. CAPNS1 (30kD) es la subunidad pequeña reguladora que contiene un dominio N-terminal rico en Gly (GR) y un dominio de PEF (S). CAPNS1 (30kD) debe formar un heterodímero con CAPN1 o CAPN2 para regular la actividad de la calpaína (Figura 3), (Sorimachi *et al.*, 2012).



**Figura 3.** Estructuras y dominios de las subunidades catalítica y reguladora de CAPN2.

El gen de la calpaína 1 (*CAPN1*) se localiza en el cromosoma 2 del guajolote entre las regiones 30.729,177 – 30.738,251 pb de la cadena reversa con 21 exones y un tamaño de 2155 pb que codifica para 710 aa (Figura. 4).



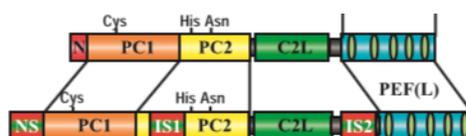
**Figura 4.** Esquema del gen *CAPN1* con 21 exones, localizado en el cromosoma 2 en guajolote.

Algunos análisis realizados en el gen *CAPN1* de pollo han mostrado dos mutaciones C/T en la posición 2546 nt del exón 5 y C/A en la posición 7198 nt del exón 16, y a pesar de que estas variaciones son silenciosas, se propuso que posiblemente se ve afectada la eficacia de transcripción o traducción. Adicionalmente, se detectaron

asociaciones entre los alelos de *CAPN1* con algunas características de las poblaciones de pollo de distintas líneas comerciales (Zhang *et al.*, 2008).

### Calpaína 3

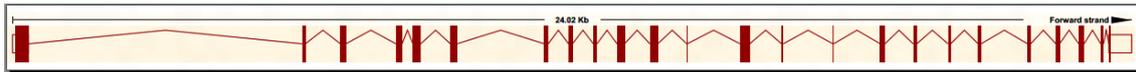
La calpaína 3 fue identificada por Sorimachi *et al.*, (1989) como la primer calpaína de tejido específico predominante del músculo esquelético. La CAPN3 también llamada p94 forma parte de las calpaínas clásicas teniendo una similitud del 50% con CAPN1 y CAPN2. CAPN3 tiene tres regiones adicionales NS (de localización al núcleo), IS1 e IS2 (secuencias de inserción) las cuales se localizan en el N-terminal y el dominio PC2, y entre C2L y el dominio PEF respectivamente proporcionando algunas características únicas a la CAPN3 (Figura 5), (Sorimachi *et al.*, 2011).



**Figura 5.** Comparación entre los dominios de las estructuras de CAPN1/2 y CAPN3 resaltando las tres regiones adicionales NS, IS1 e IS2 en sus dominios correspondientes.

La CAPN3 tiene una modificación única dentro CysPc, por la cual se auto-degrada muy rápidamente en condiciones fisiológicas; este proceso depende de las secuencias específicas IS1 y IS2, situadas una dentro PC2 y otra en la región de engarce entre la C2L y dominios de PEF, respectivamente. Esta actividad autolítica es dependiente de  $\text{Na}^+$  en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , haciendo de este el primer ejemplo de una enzima dependiente de  $\text{Na}^+$  intracelular. Estas propiedades son exclusivas de CAPN3, y la hace diferente a otras calpaínas. Cuando CAPN3 carece de IS1, IS2, o ambos, muestra una disminución de la actividad autolítica y resulta en miopatía cuando se sobre expresa en músculo. En conjunto, estos hallazgos sugieren que los aspectos adicionales de CAPN3/p94 pueden contribuir a la regulación del dominio CysPc y apoyo en las funciones de la enzima en condiciones específicas en el músculo esquelético (Sorimachi, Ono 2012).

El gen *CAPN3* se localiza en el cromosoma 5 del guajolote entre las regiones 26.427,715 – 26.451,736 pb con dos transcritos predichos reportados, uno de 24 exones y otro de 23 exones con un tamaño similar de 2948 pb que codifica para 810 aa (Figura 6).



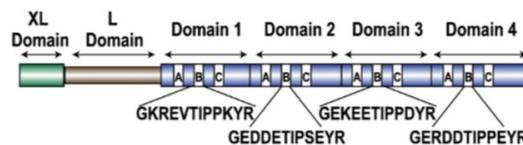
**Figura 6.** Esquema del gen *CAPN3* con dos transcritos predichos de 24 y 23 exones, localizado en el cromosoma 5 en guajolote.

Un análisis realizado en el gen *CAPN3/p94* de pollo, mostró la presencia de dos mutaciones T/G en la posición 11818 nt del intron 8 y T/G en la posición 12814 en el exón 10 (Zhang *et al.*, 2009).

### *Calpastatina*

La calpastatina es una enzima inhibidora de las calpaínas, está codificada por el gen *CAST*, a partir del cual se pueden expresar cuatro isoformas proteicas diferentes debido a la existencia de cuatro promotores distintos. Este gen ha sido estudiado como candidato para explicar diferencias de origen genético en la terneza de la carne. En bovinos se han descrito varios polimorfismos del tipo SNPs en distintas regiones del gen, y algunos de ellos se han incluido en test comerciales por su asociación significativa con la variabilidad en la suavidad. Recientemente, la investigación se ha enfocado en establecer qué promotores están activos en músculo esquelético y si los mismos presentan polimorfismos funcionales que se asocien con la variabilidad en la suavidad (Motter *et al.*, 2009).

Una molécula de calpastatina contiene cuatro unidades de inhibidor (Figura 7), cada molécula de calpastatina inhibe hasta cuatro unidades de calpaína con eficacia. La *CAST* tiene mala conservación de la secuencia primaria entre especies, a pesar de su alta especificidad, incluso las calpaínas convencionales entre diferentes especies son altamente conservadas: *CAPN1* en los seres humanos y ratas es 89% idéntica, mientras que en la calpastatina muestran 66% de identidad (Ono, Sorimachi 2012).



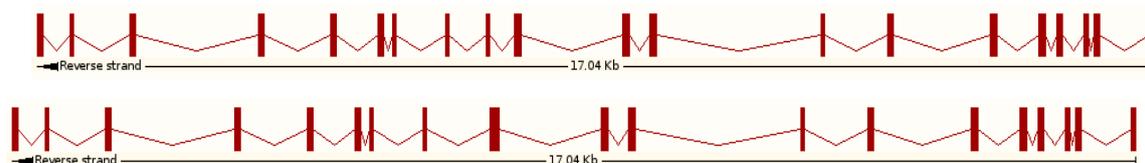
**Figura 7.** Esquema de los dominios de la *CAST*.

La *CAST* además de inhibir a *CAPN1* y *CAPN2* también inhibe *CAPN8* y *CAPN9*, pero no a *CAPN3*, *in vitro*. Se a observado, que *in vitro* *CAST* es proteolisada con eficacia

por CAPN3, lo cual sugiere que esta última ayuda a regular CAPNs convencionales en el músculo esquelético (Sorimachi *et al.*, 2012).

En general se acepta que la interacción  $\text{Ca}^{+2}$ -dependiente de las CAPNs con CAST es el mecanismo más relevante implicado en la regulación de la proteólisis inducida por  $\text{Ca}^{+2}$ . La asociación CAPN-CAST puede ocurrir también en ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  o en muy bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{+2}$ , reflejando las condiciones fisiológicas en las que la CAPN retiene su estado conformacional inactivo. La región de unión de CAST se localiza en el dominio inhibidor-L que contiene las secuencias de aminoácidos codificadas por los exones 4 - 7. Esta región de la CAST reconoce una secuencia de las CAPNs situado cerca del extremo del dominio DII (Melloni *et al.*, 2006).

El gen *CAST* tiene un tamaño de 17040 pb y se localiza en el cromosoma Z del guajolote entre las regiones 60.429,252 – 60.446,292 pb con dos transcritos predichos reportados, uno de 21 exones y otro de 19 exones con un tamaño similar de 1584 pb que codifican para 528 aa (NCBI ENSMGAG00000008039), (Figura 8).



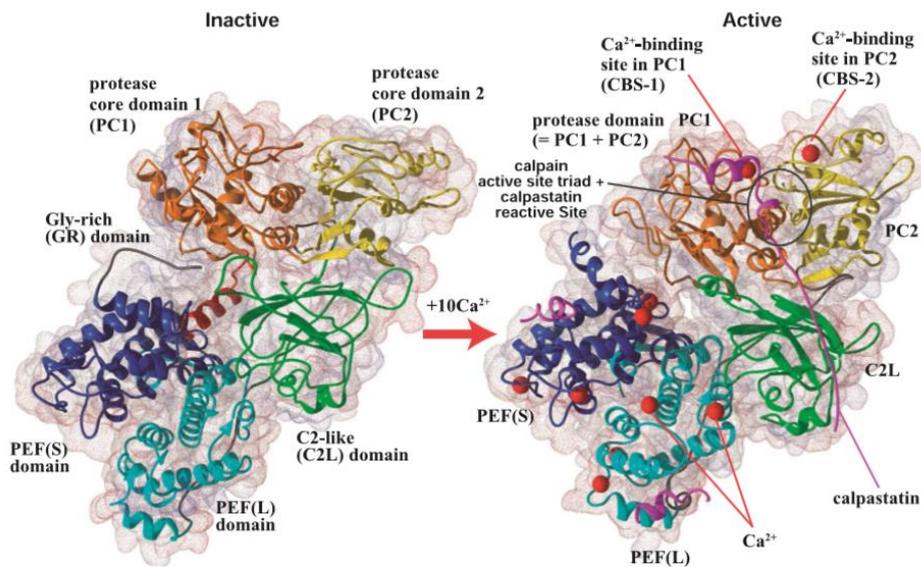
**Figura 8.** Esquema del gen *CAST* con dos transcritos predichos de 21 y 19 exones respectivamente, localizado en el cromosoma Z en guajolote.

Para su actividad, la CAST y las CAPNs se localizan en distintos compartimentos intracelulares. La CAST se acumula cerca del núcleo en estructuras granulares sin membranas. En cambio, las CAPNs se localizan en forma difusa en el citosol. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula modifica la localización intracelular de ambas enzimas. El  $\text{Ca}^{2+}$  se une a las CAPNs, provocando que éstas se asocien a la cara interna de la membrana plasmática para captar más  $\text{Ca}^{+2}$ . En cambio, la CAST se difunde al citosol contrarrestando el efecto proteolítico de las CAPNs (De Tullio *et al.*, 1999).

### ***Estructura CAPN – CAST***

Cuando las CAPNs convencionales son activadas por  $\text{Ca}^{2+}$ , se desplaza el anclaje N-terminal de la-hélice de la subunidad catalítica a través de autólisis, que resulta en

funcionalidad a concentraciones más bajas  $\text{Ca}^{2+}$ , diferente especificidad de sustrato y en algunos casos, la disociación de subunidades. Por lo tanto, la autólisis de esta hélice de anclaje es uno de los mecanismos de regulación intrínsecas críticos para la actividad de la CAPN (Sorimachi *et al.*, 2011).



**Figura 9.** Estructura, función e interacción de las CAPNs convencionales y la CAST.

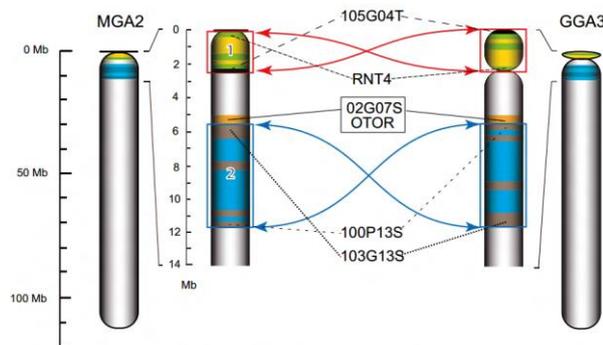
La CAPN permanece estructuralmente inactiva en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , esto es razonable debido que la CAPN reside en el citosol, donde se encuentra en contacto directo con un gran número de proteínas y su actividad debe ser regulada estrictamente. El  $\text{Ca}^{2+}$  también se une a C2L, dominio similar a C2, el penta-EF-hand [PEF (L) y PEF (S)], cada uno de los cuales está compuesto por cinco motivos EF-hand y muestran una alineación  $\beta$ -sándwich similar (Figura 9). La quinta mano EF (EF-5) motivo dentro de cada uno de los dominios PEF contribuye a la formación del heterodímero entre CAPN1 y CAPNS1. El dominio (GR) rico en Gly-de la N-terminal de CAPNS1 [30K] contiene grupos hidrófobos de Gly, la mayoría de los cuales se autolisan durante la activación (Figura 9). En los seres humanos, un gen sin intrónes, CAPNS2, codifica un parólogo de CAPNS1 [30K], del cual se desconoce el papel fisiológico (Sorimachi *et al.*, 2011).

### ***Estudios de SNPs en CAPNs de pollo***

El guajolote *Meleagris gallopavo gallopavo*, es la segunda especie de aves importantes como especies agrícolas de aves en los EEUU y en el mundo, después del

pollo *Gallus gallus*. Los análisis filogenéticos sugieren que el último ancestro común del guajolote y el pollo vivió hace 40 millones de años. El análisis genético y las herramientas necesarias para la cría moderna de guajolote hasta ahora se han centrado en el desarrollo de un mapa de ligamiento genético con la información física limitada. La investigación del genoma se ha quedado atrás y en cierta medida, ha dependido de la comprensión del genoma del pollo. El análisis de cariotipo demostró que los cromosomas del guajolote son sustancialmente similares a los de pollo. La mayoría de los cromosomas de pollo corresponden a los cromosomas de guajolote ortólogos, con excepción del cromosoma GGA2 ortólogo a MGA3, MGA6 ortólogo a GGA4 y MGA4 ortólogo a MGA9 (Zhang *et al.*, 2011).

Previamente, se han observado algunos casos de eventos de desplazamiento posible en los genomas de pollo y guajolote, por lo que en función de su tamaño pueden deberse a la acción de elementos de transposición o a secuencias duplicadas en el genoma (Zhang *et al.*, 2011). El análisis de la reorganización sugiere que ocurrió el duplicado de varias secuencias o dentro, o junto a los elementos de transposición. Esto sería consistente con el movimiento de los segmentos de pequeña secuencia a través de la transposición o la diferencia en herencia de las duplicaciones parálogas que estaban presentes en el último genoma ancestral común (Zhang *et al.*, 2011). En la figura 10 se muestra un esquema de los cromosomas ortólogos de pollo y guajolote donde se localiza el gen de *CAPN1*.



**Figura 10.** Cromosomas ortólogos de guajolote, MGA2 y pollo GGA3, donde se localiza *CAPN1*.

En pollo se ha identificado que cuatro genes de la familia de CAPNs expresan polimorfismos (*CAPN1*, *CAPN2*, *CAPN3* y *CAPN1.5*) (Okumura *et al.*, 2006). Un análisis de *CAPN1* y *CAPN1.5* (específica para las aves) en pechuga de pollo mostró que la

relación de estas CAPNs fue de aproximadamente 1:10 y se mantuvo sin cambios después de 5 min después del sacrificio, y posteriormente disminuyó en gran medida. Debido a que la CAPN1.5 es muy estable disminuyó poco hacia las 24 horas *postmortem*, mientras que CAPN1 disminuyó rápidamente hacia las 6 horas *postmortem* y después de 12 h apenas fue detectable. Esto podría explicar por qué músculo aviar se ablanda rápidamente. Las dos formas de CAPNs en las aves son más sensibles al calcio que sus homólogos de mamífero, y puede ser que CAPN1 se movilice más rápido ya que su requisito de calcio es muy bajo y por debajo de CAPN1 del ganado (Lee *et al.*, 2008).

Se ha investigado la correlación entre el Polimorfismo de un Solo Nucleótido (SNP) de *CAPN1* y *CAPN3*, y el sabor, densidad de la fibra y suavidad de la carne (Zhang *et al.*, 2007, 2008, 2009). Para *CAPN1* mediante el método de polimorfismo de conformación de cadena sencilla (SSCP), se han detectado tres polimorfismos de un sólo nucleótido (SNP; C2546T, G3535A y C7198A) en ocho poblaciones de pollos que incluyeron cinco líneas puras desarrolladas por los criadores locales chinos. Los haplotipos de estos polimorfismos (H1 = CGA, H2 =CGC, H3 = CAA, H4 = CAC, H5 = TGA y H7 = TAA) se relacionaron con los caracteres de la fibra muscular del pecho y la suavidad de la carne. Se observó una asociación con el peso en vivo, (LW), peso en canal (CW), peso de la pechuga (BMW) y músculo de la pierna (LMW) y también se relacionó con el porcentaje eviscerado (%EP) y densidad de la fibra del músculo (BFD). Se encontró que el haplotipo H1H3 fue dominante para LW, CW y BMW; H1H5 fue dominante para EP; H3H4 fue dominante para LMW y H1H1 fue dominante para BFD (Zhang *et al.*, 2009).

En el caso de *CAPN3* su estudio ha llamado la atención debido a su influencia potencial sobre el crecimiento del músculo y su papel en la organización miofibrilar, sin embargo, gran parte de la información disponible acerca de este gen proviene de estudios en humanos, ratones y otras especies de mamíferos, y podría no ser directamente aplicables a las aves de corral (Zhang *et al.*, 2009). En pollo se detectaron dos SNPs (11818T>A y 12814T>G) por SSCP y se verificaron por secuenciación de ADN. Asociado al análisis se encontró que los genotipos 12814T>G se asociaron significativamente con el peso corporal (BW), peso de la canal (CW), el peso del músculo del pecho (BMW) y el peso muscular de la pierna (LMW). Los haplotipos construidos con los dos SNPs (H1, TG; H2, TT; H3, AG; y H4, AT) se asociaron con diferencias en BW, CW (P<0.05), porcentaje de eviscerado (EP), porcentaje de semi-eviscerado (SEP), porcentaje de músculo del pecho (BMP), y el porcentaje de músculo de la pierna (LMP) (P <0,01). El diplotipo H1H2 fue dominante en BW, CW, LMP, y el diplotipo H2H2 fue dominante para EP, SEP, y BMP (Zhang *et al.*,

2009). Sin embargo, a pesar de la aparente asociación de estos SNPs con características de la carne en pollo, no se ha descrito el origen de estas diferencias a nivel de proteína.

### ***Estudios moleculares de guajolote domesticado en Michoacán***

El estado de Michoacán tiene un amplio espectro de clima y topografía, en el que se proponen cinco regiones fisiográficas en base a su clima y vegetación específica: Bajío, Faja Volcánica Transmexicana, Balsas, Sierra y Costa, y cada una de estas regiones tiene vegetación característica (Madrigal, 1997). Esta diversidad regional parece haber afectado las características morfométricas de las poblaciones de guajolotes domesticados (López-Zavala *et al.*, 2008), (Figura 11).



**Figura 11.** Mapa de las regiones fisiográficas del estado de Michoacán en base a su clima y vegetación específica: Bajío (1), Faja Volcánica Transmexicana (2), Balsas (3), Sierra (4) y Costa (5) (Madrigal, 1997).

Se cuenta con información sobre la diversidad genética de guajolote en el estado de Michoacán con base en un estudio donde se evaluó una población de guajolote domesticado de traspatio (144 individuos) de las cinco regiones fisiográficas del estado de Michoacán; Bajío (n=31), Faja Volcánica Transmexicana (n=32), Balsas (n=29), Sierra (n=31) y Costa de (n=22). El análisis realizado con siete loci de microsatelites (SSR) mostró tres grupos genéticos con bajos niveles de solapamiento entre ellos agrupando las poblaciones de Bajío y Balsas, la Faja Volcánica Transmexicana forma un segundo grupo,

y el tercer grupo las regiones Costa y Sierra. Una prueba de Mantel mostró aislamiento por patrón de distancia ( $r=0.84$ ,  $P<0.05$ ) entre las poblaciones. Los grupos genéticos fueron congruentes con los datos morfométricos previamente obtenidos de la misma población; un grupo correspondió a poblaciones de Bajío y Balsas (morfometría intermedia), el segundo grupo incluyó a la población de Faja Volcánica Transmexicana (grandes y pesados), y el tercer grupo correspondió a poblaciones de Sierra y Costa (ligeros y pequeños). Las regiones fisiográficas con individuos de mayor nivel promedio de heterocigocidad fueron Balsas (0.668), Bajío (0.581), Faja Volcánica Transmexicana (0.558) y las más bajas fueron Sierra (0.488) y Costa (0.383) (López-Zavala *et al.* 2013).

Un análisis realizado con el marcador de ADN mitocondrial Región Control, permitió la identificación de 16 haplotipos en la misma población de guajolotes domesticados de las cinco regiones fisiográficas de Michoacán. Entre los 16 haplotipos, se detectaron dos haplotipos dominantes; el haplotipo MICH1 con 89 individuos Bajío (n=18), Faja Volcánica Transmexicana (n=21), Balsas (n=17), Sierra (n=22) y Costa (n=11) y el haplotipo MICH2 con 36 individuos Bajío (n=5), Faja Volcánica Transmexicana (n=9), Balsas (n=5), Sierra (n=5), Costa (n=12). El resto de los haplotipos son producto de la expansión de los haplotipos dominantes MICH1 y MICH2 (Cornejo-Pérez, 2011).

## **JUSTIFICACIÓN**

En el ganado, las calpaínas tienen importancia por su relación con la suavidad y características organolépticas de la carne. Particularmente, para aves de corral, actualmente solo existen estudios genético moleculares para algunas calpaínas de pollo. Dada la importancia económica del guajolote domesticado mexicano, y considerando que no existen estudios genético moleculares sobre calpaínas y su relación con las características de la carne, se considera relevante el inicio de estudios que conduzcan a la detección de polimorfismos tipo SNP en calpaínas que pueden ser similares a los detectados hasta ahora en pollo. Adicionalmente, el análisis para la detección de SNPs de calpaínas en poblaciones de guajolote domesticado de las regiones fisiográficas de Michoacán, permitirá aportar mayor información sobre sus características genéticas.

## HIPÓTESIS

- Las calpaínas de guajolote domesticado mexicano *Meleagris g. gallopavo* presentan polimorfismos tipo SNP similares a los encontrados en los genes homólogos de pollo, que pueden ser variables entre las poblaciones de las regiones fisiográficas de Michoacán.

## OBJETIVOS

- **General**
  - Estudiar la variación en la secuencia de algunos fragmentos de los genes de *CAPN1* y *CAPN3* de *Meleagris g. gallopavo*.
  -
- **Particulares**
  - Identificar y aislar fragmentos de los genes *CAPN1* y *CAPN3* de guajolote de cuatro regiones fisiográficas del Estado de Michoacán.
  - Realizar un análisis de secuencia para la búsqueda e identificación de polimorfismos tipo SNP en *CAPN1* y *CAPN3*.
  - Analizar la variación de SNPs de *CAPN1* y *CAPN3* en poblaciones de guajolote domesticado de las cinco regiones fisiográficas del Estado de Michoacán.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Material biológico*

Se utilizaron 24 muestras de sangre de individuos adultos de localidades de cuatro regiones fisiográficas del estado de Michoacán, México (Madrigal, 1997); Bajío, Faja Volcánica Transmexicana, Balsas y Sierra, pertenecientes a la Colección de muestras biológicas de guajolote mexicano del laboratorio de Estudios de Recursos Genéticos del CMEB, UMSNH. Adicionalmente se utilizaron tres muestras de guajolote de la línea comercial Bronze (C14, C18, C22) y tres de guajolotes de traspatio de una parvada crecida en confinamiento (P427, P461, P464), pertenecientes también a la Colección de muestras biológicas de guajolote mexicano.

**Cuadro 1.** Nombre, identificación y región fisiográfica de donde provienen las muestras para el estudio

Rf	Id	Nombre	Rf	Id	Nombre	Rf	Id	Nombre
Bajío	1-CAPN	F1I	FVT	11-CAPN	A3II	Sierra	21-CAPN	F2IV
Bajío	2-CAPN	C4I	FVT	12-CAPN	A7II	Sierra	22-CAPN	E7IV
Bajío	3-CAPN	C7I	FVT	13-CAPN	A4II	Sierra	23-CAPN	E5IV
Bajío	4-CAPN	A5I	FVT	14-CAPN	C3II	Sierra	24-CAPN	E4IV
Bajío	5-CAPN	D9I	FVT	15-CAPN	E5II	C. Bronze	25-CAPN	C14
Bajío	6-CAPN	B9I	Balsas	16-CAPN	A2III	C. Bronze	26-CAPN	C18
Bajío	7-CAPN	E7I	Balsas	17-CAPN	B4III	C. Bronze	27-CAPN	C22
Bajío	8-CAPN	B4I	Balsas	18-CAPN	B6III	P. Posta	28-CAPN	P427
Bajío	9-CAPN	E5I	Balsas	19-CAPN	B8III	P. Posta	29-CAPN	P461
Bajío	10-CAPN	D1I	Balsas	20-CAPN	C5III	P. Posta	30-CAPN	P464

RF: Región Fisiográfica, Id: identificación, FVT: Faja Volcánica Transmexicana,  
C: Guajolote línea comercial, P: Parvada posta

### *Purificación de ADN*

Se utilizó el método libre de fenol de FitzSimmons (1997). La muestra (5 µl) se mezcló con 300 µl de solución de extracción (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 10 mM y SDS 0.1%), 25 µl de Proteinasa K (15 mg/ml.), para obtener una concentración final de 1 mg/ml en un vial de 1.5 ml. Se incubó de 1 a 3 h a 60°C con inversión ocasional, se agregó

150 µl de acetato de amonio 7.5 M, se mezcló por inversión y refrigeró a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 20 min. Se centrifugó a 13000 rpm por 20 min., a  $4^{\circ}\text{C}$  y se transfirió el sobrenadante a un vial limpio. Posteriormente se precipitó el ADN con 1 ml de etanol al 95% frío y se refrigeró a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 20 min. (O toda la noche). Se centrifugó a 13000 rpm por 20 min. a  $4^{\circ}\text{C}$ , se eliminó el etanol por inversión evitando perder la pastilla de ADN. Se lavó la pastilla de ADN con 600 µl de etanol frío al 70%, se centrifugó a 13000 rpm por 20 min. a  $4^{\circ}\text{C}$ , se eliminó el etanol por inversión y se dejó secar a temperatura ambiente por 24h. Finalmente se resuspendió la pastilla de ADN en 50 µl de agua destilada, desionizada, estéril ( $\text{H}_2\text{O}_{\text{dde}}$ ).

### ***Amplificación por PCR***

Para la amplificación de los exones 5 (contenido en el fragmento *CAPN1F1* 217 pb) y 16 (contenido en el fragmento *CAPN1F3* 191 pb) de *CAPN1* y la amplificación de los exones 8 (contenido en el fragmento *CAPN3F4*, 222 pb) y 15 (contenido en el fragmento *CAPN3F6* 202 pb) de *CAPN3* se usaron juegos de oligonucleótidos diseñados y reportados previamente para pollo (Cuadro 1) (Zhang *et al.*, 2008, 2009), que fueron comparados con la predicción de las secuencias del ARNm (Acceso: XM\_003203927 y GI: 100549763 LOC100549763) obtenida por análisis bioinformático de los genes de guajolote. Para la amplificación por PCR se preparó una mezcla de reacción como sigue: en un microtubo de 0.2 ml se colocó el juego de oligonucleótidos 10 pmol c/u (directo / reverso), Buffer 10X para PCR 2.5 µl, dNTPs 2.5 mM (200 µM), MgCl 1.5 mM, *Taq* Platinum 1.5 U, y 20 a 30 ng de ADN en un volumen total de 25 µl. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador (2700 Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización  $95^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos, seguido por 35 ciclos;  $95^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto,  $55\text{-}58^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto y  $72^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos, con una extensión final a  $72^{\circ}\text{C}$  por 10 min. Para confirmar la presencia de los fragmentos de ADN esperados, los productos de amplificación se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2%, en TAE 1X (Tris-base 45 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2.5 mM [pH 8.3]), con el marcador de tamaño molecular 1 kb DNA Plus Ladder (Invitrogene), y teñido con Syber Safe 1X (Invitrogene) a 80 voltios y se visualizaron en un transluminador de UV a 320 nm.

## Secuenciación y análisis de datos

La secuenciación del ADN en ambas cadenas se realizó por el método de dideoxy de Sanger *et al.* (1977), por la empresa comercial MacroGen USA. En el análisis y la edición de secuencias se utilizó el software Chromas Lite 2.0 y BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.5.3, para el alineamiento en el sistema Clustal W. Para los análisis de comparación en BLAST y BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.5.3 se utilizaron la secuencias de los ARNm de *CAPN1* y *CAPN3* predichas para *Meleagris gallopavo* (No. de acceso XM\_003203927.1 y GI: 100549763 LOC100549763) y las de los genes de *Gallus gallus* (No. de acceso NM\_205303.1 y GI 396240) del banco de datos NCBI.

**Cuadro 2.** Juegos de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de fragmentos de CAPN1 y CAPN3 de guajolote

Loci	Secuencia (5' a 3')	T <sub>m</sub>	Tamaño del fragmento (pb)
CAPN1F1*	<b>D</b> TCACCTCACGTGCCTCTCTCA <b>R</b> CGGAACACTTACGTCGAT	58°C	217
CAPN1F3*	<b>D</b> CCTCCTTCCTCCTCAGACAAA <b>R</b> CAG CCT TGG CAC AAC TAGAGA	55°C	191
CAPN3F4**	<b>D</b> TGCCTTCTCTTTCAATTAGAC <b>R</b> AAACCTGATACCTCGTTGT	52°C	222
CAPN3F6**	<b>D</b> TTCAATTCTTCCAGGATATCA <b>R</b> TGGTATCTCTTAAGACCCATT	52°C	202
Zhang <i>et al.</i> , 2008*, 2009**			

## Análisis de estructura tridimensional de las proteínas

La estructura tridimensional de CAPN1 se generó en el software de workspace de Swiss-model (Arnold *et al.*, 2006) utilizando como templado la proteína cristalizada CAPN1 de humano 2ARY cadena A (RCSB-PDB). Para el análisis de datos y modelaje de la proteína 3D se utilizó el software Swiss-PdbViewer 4.1.0 (Guex *et al.*, 1997)

## RESULTADOS

### *Extracción de ADN*

Se obtuvo el ADN de buena calidad de 24 individuos adultos de localidades de cuatro regiones fisiográficas del estado de Michoacán (Cuadro 1). Adicionalmente se obtuvo el ADN de muestras de guajolote de la línea comercial Bronze y de guajolotes de traspatio de una parvada crecida en confinamiento, pertenecientes también a la Colección de muestras biológicas de guajolote mexicano (Cuadro 1).

### *CAPNI*

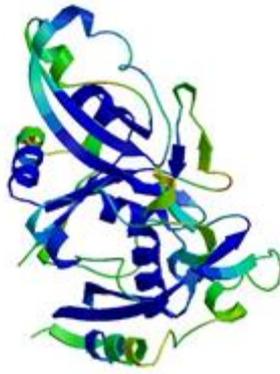
#### *Amplificación de CAPNIF1 (Exón 5)*

Se amplificó el fragmento *CAPNIF1* (220 pb) que contiene al exón 5 (169 pb) de *CAPNI* en el cromosoma 2 de guajolote. Este exón es parte del dominio catalítico CysPc de la enzima. El producto de amplificación mostró un tamaño aproximado de 220 pb de acuerdo con lo esperado (Zhang *et al.*, 2008) (Cuadro 2). Los productos de amplificación de las 30 muestras de ADN se secuenciaron y las secuencias se editaron para su análisis.

Como resultado del alineamiento de las secuencias se identificó un SNP en siete de las 24 muestras analizadas para guajolotes de Michoacán, correspondiente a una transición G/A (Figura 12). La comparación de las secuencias con la base de datos de NCBI mostró 98% de identidad con la secuencia correspondiente de *CAPNI* para *M. gallopavo* a nivel de nucleótidos. Con base en esta comparación, se identificaron dos SNP (Inserción T605-, Transición G607A) en todas las muestras de las cuatro regiones fisiográficas de Michoacán, adicionales a los encontrados en las siete muestras (Transición G712A) mencionadas anteriormente.

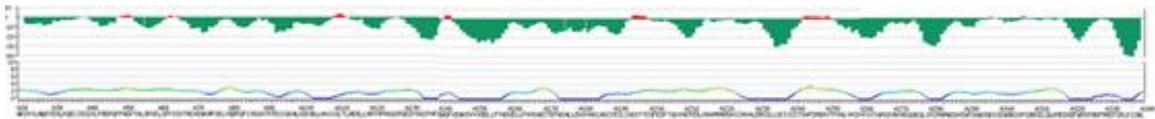
El alineamiento de las secuencias de nucleótidos con el fragmento correspondiente de *CAPNI* del cromosoma 3 de *G. gallus* mostró 97% de identidad y se detectaron cinco polimorfismos (T670C, G634A, A682G, A711G, A736G). La comparación de las secuencias de aminoácidos deducidos, mostró una similitud del 95% con la secuencia correspondiente del ARNm *G. gallus* y 93% con la secuencia del predicho de *M. gallopavo*. Se detectaron cuatro polimorfismos R225H solo en siete muestras de guajolote domesticado de Michoacán y R190K, V247I, S248T en las 30 muestras analizadas del estado (Figura 13).





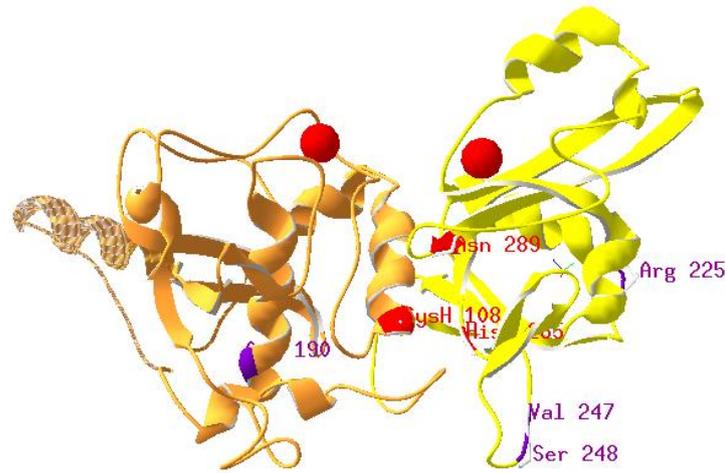
**Figura 14.** Modelo tridimensional de CAPN1F1 de guajolote domesticado de traspatio de Michoacán. En azul las regiones más confiables y en rojo las regiones potencialmente poco fiables por la inexactitud de residuos.

En la figura 15 se representa la energía para cada aminoácido de la cadena de proteína, esta figura complementa la figura 14 y representa la estabilidad de la proteína.



**Figura 15.** Los valores de energía negativa (en verde) representan el entorno energético favorable mientras que los valores positivos (en rojo) representando la energía desfavorable para un determinado aminoácido.

El análisis de comparación de la secuencia deducida de amino ácidos de *CAPN1F1* correspondiente al dominio CysPc del sitio catalítico de CAPN1 de humano mostró 77% de similitud. En la figura 16 se presenta el modelo tridimensional del dominio CysPc de CAPN1 de humano donde se indican las posiciones de los SNPs detectados para CAPN1 de guajolote.



**Figura 16.** Modelo tridimensional del dominio CysPc de CAPN1. El dominio de proteasa activa (CysPc) se forma por fusión de los subdominios PC1 (Naranja) y PC2 (Amarillo) tras la unión de un  $\text{Ca}^{2+}$  (bola roja) para cada uno de los subdominios. Residuos del sitio activo (en rojo), Cys108 (PC1), His265 y Asn289 (PC2) (Sorimachi *et al.*, 2010). En color morado se indican los polimorfismos encontrados en PC1 (Arg190) y en PC2 (Arg225, Val 247 y Ser248).

#### ***Amplificación de CAPNIF3 (Exón 16)***

Se amplificó el fragmento *CAPNIF3* (152 pb) que contiene al exón 16 (65 pb) del gen *CAPN1* (parte del dominio catalítico CysPc) en el cromosoma 2 de guajolote. El alineamiento de las secuencias de nucleótidos mostró 100% de identidad entre ellas (Figura 17). El análisis de comparación de secuencia deducida de amino ácidos de *CAPNIF3* mostró 100% de identidad con la secuencia correspondiente del ARNm predicho para *M. gallopavo* y 98% de identidad con la secuencia correspondiente a *G. gallus* debido a un polimorfismo A1761G.

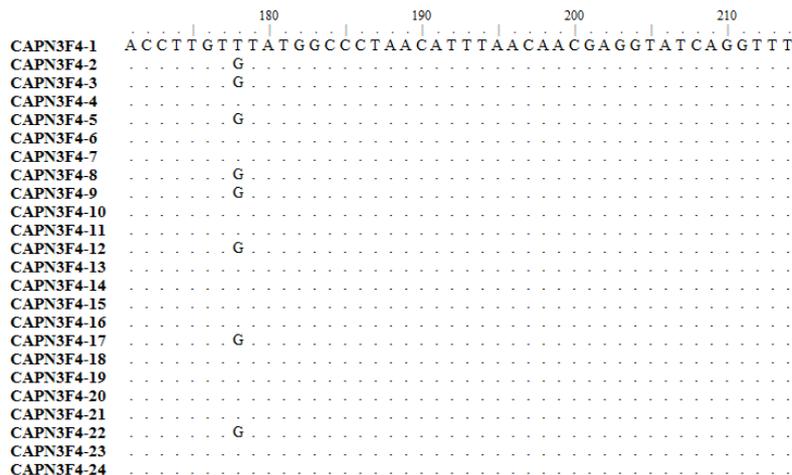


**Figura 17.** Alineamiento de secuencias de nucleótidos del fragmento *CAPNIF3* de guajolote domesticado de traspatio de Michoacán mediante Clustal W.

### *CAPN3*

#### *Amplificación de CAPN3F4 (Exón 8)*

Se amplificó el fragmento *CAPN3F4* (214 pb) que contiene al exón 8 (88 pb) del gen *CAPN3* (parte del dominio catalítico CysPc) en el cromosoma 5 de guajolote. El alineamiento entre las secuencias mostró un SNP en ocho de ellas (transversion T/G) representando el 33% del total de las muestras en estudio (Figura 18). Sin embargo, este SNP se encontró en el intrón del extremo 5' del fragmento *CAPN3F4*.



**Figura 18.** Alineamiento de secuencias de nucleótidos del fragmento *CAPN3F4* de guajolote domesticado de traspatio de Michoacán mediante Clustal W

La comparación de las secuencias del fragmento *CAPN3F4* con la secuencia correspondiente al ARNm del predicho de *CAPN3* de *M. gallopavo* mostró 100% de identidad, con la secuencia correspondiente al gen de *G. gallus* mostró 94% de identidad y se detectaron cinco SNPs (T1196A, C1212G, A1219G, G1251A, C1269T). La comparación de la secuencia deducida de amino ácidos de las secuencias de *CAPN3F4* con la correspondiente para el gene de *G. gallus* mostró 90% de identidad con tres cambios (F339Y, I344M, I347V), (Ono, Sorimachi 2012).

### ***Amplificación de CAPN3F6 (Exón 10)***

Se amplificó el fragmento *CAPN3F6* (203 pb) que contiene el exón 10 (78 pb) del gen *CAPN3* (parte del dominio C2like) en el cromosoma 5 de guajolote. Este fragmento se amplificó para 16 de las muestras de las cuatro regiones fisiográficas de Michoacán y se obtuvo un tamaño de 205 pb (Cuadro 2). El alineamiento de las secuencias de nucleótidos del fragmento *CAPN3F6* de nucleótidos mostró 100% de identidad entre ellas. El análisis de comparación de las secuencias de nucleótidos del fragmento *CAPN3F6* con la secuencia correspondiente en el ARNm del predicho para *M. gallopavo* mostró 99% de identidad con una inserción C1500- (Figura 19). El análisis de comparación de las secuencias del fragmento *CAPN3F6* con la secuencia correspondiente al gen de *G. gallus* mostró 94% de identidad, presentando tres SNPs (C1388-, A1422G, T1461C).

La comparación de las secuencias de amino ácidos deducidos del exón de *CAPN3F6* con la secuencia correspondiente en el RNAm predicho de *M. gallopavo* mostró 93% de identidad al igual que con *G. gallus* y se detectaron los mismos tres polimorfismos (G445D, E446T, Q447F).

Debido a que estos polimorfismos se encuentran en el dominio C2like y la falta de una proteína cristalizada de *CAPN3* reportada en base de datos, no fue posible realizar análisis del modelo tridimensional.

	410	420	430	440																																									
CAPN3 MGG	L	E	I	C	N	L	T	P	D	T	L	E	A	D	K	L	Q	T	W	T	V	S	V	N	E	G	R	W	V	R	G	C	S	A	G	G	C	R	N	Y	P	D	T	F	W
CAPN3F6-7	.....																														G	E	Q	.											
CAPN3F6-8	.....																														G	E	Q	.											
CAPN3F6-9	.....																														G	E	Q	.											
CAPN3F6-11	.....																														G	E	Q	.											
CAPN3F6-12	.....																														G	E	Q	.											
CAPN3F6-13	.....																														G	E	Q	.											
CAPN3F6-14	.....																														G	E	Q	.											
CAPN3F6-15	.....																														G	E	Q	.											
CAPN3F6-16	.....																														G	E	Q	.											
CAPN3F6-17	.....																														G	E	Q	.											
CAPN3F6-18	.....																														G	E	Q	.											
CAPN3F6-19	.....																														G	E	Q	.											
CAPN3F6-20	.....																														G	E	Q	.											
CAPN3F6-21	.....																														G	E	Q	.											
CAPN3F6-23	.....																														G	E	Q	.											
CAPN3F6-24	.....																														G	E	Q	.											

**Figura 19.** Alineamiento de secuencias de nucleótidos del fragmento *CAPN3F6* de guajolote domesticado de traspatio de Michoacán mediante Clustal W.

***Distribución de los SNPs en los grupos genéticos y haplotipos de M. gallopavo domesticado de Michoacán***

Las 30 muestras utilizadas en el presente estudio corresponden al haplotipo dominante MICH1 (Cornejo-Pérez, 2011) y se encuentran distribuidas dentro de los tres grupos genéticos establecidos previamente (López-Zavala et al 2013); (15 individuos del Grupo Balsas/Bajío (GBB), 5 del Grupo Faja Volcánica Transmexicana (GFVT) y 4 del Grupo Costa/Sierra (GCS) (Cuadro 3).

La distribución de los SNPs de *CAPN1* entre los grupos genéticos fue de 4 en GBB, 2 en GFVT y 1 en GCS, a nivel aminoácidos fue la misma distribución (Cuadro 3). La distribución de los SNPs de *CAPN3* entre los grupos genéticos fue de 14 en GBB, 6 en GFVT y 4 en GCS, a nivel aminoácidos fue de 24 en GBB, 15 en GFVT y 9 en GCS (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Distribución de los polimorfismos en los individuos de las cuatro regiones fisiográficas de Michoacán

MUESTRAS		CALPAINA 1								CALPAINA 3							
		CAPN1F1						CAPN1F3		CAPN3F4		CAPN3F6					
Región Fisiográfica	Nombre Id	N T605-	N G607A	N G712A	A R190K	A R225H	A V247I	A S248T	N S	A S	N S	A S	N C1500-	A G445D	A E446T	A Q447F	
Bajío	1-CAPN	.	.	A	.	H	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	
Bajío	2-CAPN	.	.	A	.	H	.	.	.	.	.	G/T	.	.	.	.	
Bajío	3-CAPN	.	.	A	.	H	.	.	.	.	.	G/T	.	.	.	.	
Bajío	4-CAPN	.	.	A	.	H	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	
Bajío	5-CAPN	.	.	G/A	.	R/H	.	.	.	.	.	G/T	.	.	.	.	
Bajío	6-CAPN	.	.	G/A	.	R/H	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	
Bajío	7-CAPN	.	.	G/A	.	R/H	.	.	.	.	.	T	.	C/-	.	.	
Bajío	8-CAPN	.	.	G/A	.	R/H	.	.	.	.	.	G/T	.	C/-	.	.	
Bajío	9-CAPN	.	.	A	.	H	.	.	.	.	.	G/T	.	C/-	.	.	
Bajío	10-CAPN	.	.	A	.	H	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	
FVT	11-CAPN	.	.	G/A	.	R/H	.	.	.	.	.	T	.	C/-	.	.	
FVT	12-CAPN	.	.	G/A	.	R/H	.	.	.	.	.	G/T	.	C/-	.	.	
FVT	13-CAPN	.	.	A	.	H	.	.	.	.	.	T	.	C/-	.	.	
FVT	14-CAPN	.	.	A	.	H	.	.	.	.	.	T	.	C/-	.	.	
FVT	15-CAPN	.	.	A	.	H	.	.	.	.	.	T	.	C/-	.	.	
Balsas	16-CAPN	.	.	A	.	H	.	.	.	.	.	T	.	C/-	.	.	
Balsas	17-CAPN	.	.	A	.	H	.	.	.	.	.	G/T	.	C/-	.	.	
Balsas	18-CAPN	.	.	A	.	H	.	.	.	.	.	T	.	C/-	.	.	
Balsas	19-CAPN	.	.	A	.	H	.	.	.	.	.	T	.	C/-	.	.	
Balsas	20-CAPN	.	.	A	.	H	.	.	.	.	.	T	.	C/-	.	.	
Sierra	21-CAPN	.	.	A	.	H	.	.	.	.	.	T	.	C/-	.	.	
Sierra	22-CAPN	.	.	G/A	.	R/H	.	.	.	.	.	G/T	.	.	.	.	
Sierra	23-CAPN	.	.	A	.	H	.	.	.	.	.	T	.	C/-	.	.	
Sierra	24-CAPN	.	.	A	.	H	.	.	.	.	.	T	.	C/-	.	.	
C. Bronze	25-CAPN	.	.	A	.	H	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
C. Bronze	26-CAPN	.	.	A	.	H	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
C. Bronze	27-CAPN	.	.	A	.	H	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
P. Posta	28-CAPN	.	.	A	.	H	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
P. Posta	29-CAPN	.	.	A	.	H	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
P. Posta	30-CAPN	.	.	A	.	H	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	

S: Secuencia N: Nucleotidos A: Aminoacidos

## DISCUSIÓN

En este estudio se presenta el primer reporte de SNPs detectados en el dominio catalítico de los genes *CAPN1* y *CAPN3* de una población de guajolote domesticado de traspatio de cuatro regiones fisiográficas de Michoacán. Fue posible identificar alelos de ambos genes diferentes a los reportados en base de datos internacional y se estableció la asociación de estos alelos con los grupos genéticos identificados previamente para esta población.

### *CAPN1*

La detección de un SNP en la secuencia de *CAPN1* en siete individuos de los 24 analizados sugiere la presencia de dos alelos del gen para esta población de guajolote domesticado de Michoacán. Adicionalmente, la detección de dos SNPs en la población de Michoacán respecto a ARNm predicho reportado en banco de datos, sugiere que el gen de *CAPN1* reportado corresponde a otro alelo diferente.

El SNP detectado genera un polimorfismo en el dominio catalítico CysPc de *CAPN1* (R225H) que mostró un cambio de aminoácidos del mismo grupo R con carga positiva, con lo cual se observa una mutación que no afecta a la estructura de la proteína en esta posición. El análisis por modelación tridimensional del dominio corroboró que el cambio de un aminoácido en los dos alelos de la población de guajolote domesticado de Michoacán no genera modificaciones estructurales en el dominio catalítico. Por otro lado, los dos SNPs detectados por comparación con el ARNm predicho de guajolote, tampoco parecen afectar la estructura de la proteína, como se puede observar en el modelo tridimensional (Figura 15). Los tres polimorfismos encontrados en el subdominio PC2 (R225H carga positiva, V247I apolar alifático, S248T polar sin carga) se encuentran en la periferia de la proteína en sitios de vuelta proteica si alterar la estructura terciaria.

La estructura tridimensional del dominio CysPc de *CAPN1* de guajolote no presenta cambios aparentes en el sitio catalítico. Como era de esperarse, el dominio catalítico de la *CAPN1* es muy conservado debido a la importancia de la función de la enzima que se expresa en forma ubicua en todos los tejidos del organismo, Por lo que se puede observar diversidad en la evolución del gen a presentar varios alelos entre especies y dentro de una misma especie.

### **CAPN3**

Se detectó un SNP en ocho de las secuencias de CAPN3 de los 24 individuos de Michoacán, sin embargo, este SNP se localizó en un intrón, por lo cual no tiene efecto en la estructura del dominio CysPc del gen, pero si sugiere la presencia de dos alelos dentro de esta población de guajolote. Por otro lado, la comparación de las secuencias de amino ácidos deducidos con la del ARNm predicho de guajolote mostró tres polimorfismos (G445D, E446T, Q447F) sugiriendo un alelo diferente de CAPN3 en la población de Michoacán. Sin embargo, como se mencionó anteriormente no se pudo realizar un modelo tridimensional de la proteína.

Similar a CAPN1, se esperaba que el sitio catalítico de la enzima fuera muy conservado y debido a su expresión y función tejido específico, sin embargo, CAPN3 fue menos diverso que CAPN1, ya que presentó un solo alelo para guajolote de Michoacán aunque este alelo fue diferente (con tres polimorfismos) a las secuencias de los ARNm predichos de guajolote (para dos alelos diferentes en un exón), reportadas en base de datos internacional. Por lo anterior, y de acuerdo a nuestros resultados el gen CAPN1 parece soportar más mutaciones en si dominio catalítico que el de CAPN3.

#### ***Distribución de los SNPs en los grupos genéticos y haplotipos de M. gallopavo domesticado de Michoacán***

Los polimorfismos encontrados en el sitio catalítico de CAPN1 y CAPN3 indican que entre los grupos genéticos de guajolotes de Michoacán, el más polimórfico para estos genes es el grupo genético Bajío/Balsas que incluye individuos hembras y machos con morfometría intermedia y la heterocigocidad más alta detectada entre las cinco regiones fisiográficas de Michoacán (Balsas 0.668, Bajío 0.581) (López-Zavala *et al.*, 2008, 2013). Sin embargo, debe considerarse que se hicieron análisis en un grupo mayor de individuos para este grupo que para los otros dos. A continuación, los individuos del grupo genético de la Faja Volcánica Transmexicana presentó polimorfismo intermedio en individuos hembras y machos que son grandes y pesados con una heterocigocidad intermedia (0.558) respecto al resto de las regiones fisiográficas (López-Zavala *et al.*, 2008, 2013). Finalmente, los individuos del grupo genético Sierra/Costa mostraron el polimorfismo más bajo en individuos machos y hembras que son ligeros y pequeños con una heterocigocidad baja (Sierra 0.488, Costa 0.383) respecto a las otras regiones fisiográficas.

Lo anterior es congruente con la idea de que las poblaciones de guajolote domesticado de las cinco regiones fisiográficas de Michoacán pertenecieron a una población históricamente grande. La caracterización genética realizada previamente a este estudio y los resultados obtenidos aquí, sugieren que las poblaciones de las regiones del Bajío, Faja Volcánica Transmexicana y Sierra pudieron haber sido las primeras en separarse de otras poblaciones, y la población de la región de la Costa pudo haber provenido de una separación reciente.

Se requieren estudios en poblaciones con mayor número de individuos para corroborar la información obtenida en este estudio.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arnold K, Bordoli L, Kopp J, and Schwede T, 2006. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22,195-201.
- Becerril CA, 2000. Los animales en la cultura prehispánica. En: UNAM editor. Primera Jornada de la Historia de la Medicina Veterinaria y Zootecnia. México, 25-30.
- Chacón A, 2004. La suavidad de la carne: Implicaciones físicas y bioquímicas asociadas al manejo y proceso agroindustrial. *Agronomía Mesoamericana* 15(2) 225-243.
- Chassin-Noria, O., López-Zavala, R., Cano-Camacho, H., Suárez-Corona, E., Juárez-Caratachea, A. y Zavala-Páramo, M. G. 2005. Diversidad genética entre poblaciones de guajolotes mexicanos utilizando un método de amplificación aleatorio de ADN polimórfico (RAPD). *Técnica Pecuaria en México* 43 (3): 415-424.
- Conejo-Pérez ME, Zavala-Páramo MG y Cano-Camacho H (2011). Análisis Genético De Poblaciones De Guajolote Doméstico De Traspatio A Través De Marcadores Moleculares De ADN Mitocondrial. Universidad Michoacana De San Nicolás De Hidalgo, Facultad De Medicina Veterinaria Y Zootecnia. Tesis.
- Crawford RD, 1992. Introduction to Europe and diffusion of domesticated turkey from America. *Arch. Zoot.* 41:307-314.
- De Tullio R, Passalacqua M, Averna M, Salamino F, Melloni E and Pontremoli S, 1999. Changes in intracellular localization of calpastatin during calpain activation. *Biochem. J.* 343, 467-472
- Dekkers JCM, 2004. Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock; strategies and lessons. *J. Anim. Sci.* 82 (E. Suppl.): E313-E328.
- Ferragut FC, Calbet JAL, 2003. La miostatina y el crecimiento muscular. *Archivos de medicina del deporte* Vol. XX 95:237-242
- FitzSimmons N, 1997. Male marine turtles: gene flow, philopatry and matting systems of green turtles *Chelonia mydas*. Doctoral Thesis. University of Queensland, Australia. Pp 241.
- Guroff G, 1964. A Neutral, Calcium-activated Proteinase from the Soluble Fraction of Rat Brain. *J Biological Chemistry* Vol. 239, No. 1
- Guex N. and Peitsch MC 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* 18: 2714-2723.

- Hwanga IH, Devineb CE, Hopkins DL, 2003. The biochemical and physical effects of electrical stimulation on beef and sheep meat tenderness. *Meat Sci.* 65:677-69.
- Ishiura, S., Murofushi, H., Suzuki, K., and Imahori, K. 1978. Studies of a calcium-activated neutral protease from chicken skeletal muscle. I. Purification and characterization. *J. Biochem.* 84: 225–230.
- Kemp CM, Sensky PL, Bardsley RG, Buttery PJ, Parr T, 2010. Tenderness – An enzymatic view *Meat Science* 84 (2010) 248–256
- Koohmaraie M , 1992. Effect of pH, temperature, and inhibitors on autolysis and catalytic activity of bovine skeletal muscle mu-calpain. *J Anim Sci*, 70:3071-3080.
- Koohmaraie M, Whipple G, Kretchmar DH, Crouse JD, Mersmann HJ. 1991. Postmortem proteolysis in longissimus muscle from beef, lamb and pork carcasses. *Anim. Sci.* 69:617-624.
- Lee HL, Santé-Lhoutellier V, Vigouroux S, Briand Y and Briand M, 2008. Role of Calpains in Postmortem Proteolysis in Chicken Muscle. *Poultry Science* 87:2126-2132
- López-Zavala R, Cano-Camacho H, Chassin-Noria O, Zavala-Páramo M G. 2007. Selección asistida por marcadores genéticos moleculares en especies animales de interés pecuario. *Ciencia Nicolaita UMSNH* 46:43-56.
- López-Zavala, R., Monterrubio-Rico, C. T., Cano-Camacho, H., Chassin-Noria, O., Aguilera-Reyes, U. y Zavala-Páramo, M. G. 2008a. Caracterización de sistemas de producción (*Meleagris gallopavo gallopavo*) de traspatio en las regiones fisiográficas del estado de Michoacán, México. *Técnica Pecuaria en México* 46 (3): 303-316.
- López-Zavala, R., Cano-Camacho, H., Monterrubio-Rico, C. T., Chassin-Noria, O., Aguilera-Reyes, U. y Zavala-Páramo, M. G. 2008b. Características morfológicas y de producción de guajolotes (*Meleagris gallopavo*) criados en sistema de traspatio en el Estado de Michoacán, México. *Livestock Research for Rural Development* 20 (4)
- López-Zavala R., Cano-Camacho H, Chassin-Noria O, Oyama K, Vázquez-Marrufo G y Zavala-Páramo MG (2013). Genetic Diversity And Population Structure Of Mexican Domesticated Turkeys. En Prensa
- Madrigal SX, 1997. Ubicación fisiográfica de la vegetación en Michoacán, México. *C. Nic. UMSNH*, 15:65-75.
- Medrano JA 2000. Recursos Animales locales del centro de México. *Arch. Zootec.* 49: 385-390.
- Melloni E, Averna M, Stifanese R, De Tullio R, Defranchi E, Salamino F and Pontremoli S, 2006. Association of Calpastatin with Inactive Calpain A Novel Mechanism To

- Control The Activation Of The Protease?. *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 281, 34:24945–24954.
- Motter MM, Corva P., Krause M, Perez CM, Soria L, 2009. Rol de la Calpastatina en la variabilidad de la Terneza de la Carne Bovina. *Journal f Basic & Applied Genetics*, 20 (1): 15-24
- Northcutt JK, Pringle TD, Dickens JA, Buhr RJ, Young LL, 1998a. Effects of age and tissue type on the calpain proteolytic system in turkey skeletal muscle. *Poultry Science* 77:367-372.
- Northcutt JK, Pringle TD, Dickens JA, Buhr RJ, Young LL, 1998b.. Influence of Preslaughter Stunning on Turkey Breast Muscle Quality. *Poultry Science* 77:487–492
- Obanor F, Morton JD, Geesink GH, Bickerstaffe R, 2005. Effect of processing on turkey meat quality and proteolysis. *Poult. Sci.* 84:1123-1128.
- Okumura F, Shimogiri T, Shinbo Y, Yoshizawa K, Kawabe K, Mannen H, Okamoto S, Cheng HH, Maeda Y. (2006) Linkage mapping of four chicken calpain genes. *J. Anim. Sci.* 76, 121–127.
- Ono Y and Sorimachi H, 2011. Calpains — An elaborate proteolytic system. *Biochimica et Biophysica Acta* 1824 (2012) 224–236.
- Sanger F, Coulson AR, 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 94:441-448.
- Schwede T, Kopp J, Guex N, and Peitsch MC 2003. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research* 31: 3381-3385.
- Sorimachi, H., Imajoh-Ohmi, S., Emori, y., Kawasaki, H., Ohno, S., Minami, Y., and Suzuki, K. 1989. Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and mu-types. Specific expression of the mRNA in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 264: 20106–20111.
- Sorimachi H, Hata S, Ono Y, 2010. Expanding members and roles of the calpain superfamily and their genetically modified animals. *Exp. Anim.*, 59(5):549-566.
- Sorimachi H, Hata S, Ono Y, 2011. Calpain chronicle—an enzyme family under multidisciplinary characterization. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* 87 No.6
- Sorimachi H, Hata S, Ono Y, 2011. Impact of genetic insights into calpain biology. *J. Biochem.* 150(1):23–37
- Sorimachi H and Ono Y, 2012.Regulation and physiological roles of the calpain system in muscular disorders. *Cardiovascular Research* (2012) 96, 11–22
- Van Eenennaam A, 2004. "Marker-Assisted selection in beef cattle" April 15, 2004. *Sierra*

*Foothill Research & Extension Center. Paper 2004\_marker-assisted\_selection\_in\_beef\_cattle.*

[http://repositories.cdlib.org/anrrec/sfrec/2004\\_marker-assisted\\_selection\\_in\\_beef\\_cattle](http://repositories.cdlib.org/anrrec/sfrec/2004_marker-assisted_selection_in_beef_cattle)

Zhang ZR, Zhu Q, Jiang XS, Du HR, 2007. Study on correlation between single polymorphism of CAPN1 gene and muscle tenderness and carcass traits in chicken. *Yi Chuan*, 29(8):982-8.

Zhang ZR, Liu YP, Jiang XS, Du HR, Zhu Q, 2008. Study on association of single nucleotide polymorphism of CAPN1 gene with muscle fibre and carcass traits in chicken. *J Anim. Breed Genet*, 125(4):258-64.

Zhang ZR, Liu YP, Yao YG, Jiang XS, Du HR, Zhu Q, 2009. Identification and association of the single nucleotide polymorphisms in calpain3 (CAPN3) gene with carcass traits in chickens. *BMC Genetics* 10:10.

Zhang Y, Zhang XO, O' Hare TH, Payne WS, Dong JJ, Scheuring CF, Zhang M, Huang JJ, Lee MK, Delany ME, Zhang HB, Dodgson JB, 2011. A comparative physical map reveals the pattern of chromosomal evolution between the turkey (*Meleagris gallopavo*) and chicken (*Gallus gallus*) genomes. *BMC Genomics* 2011, 12:447.