



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
**CENTRO MULTIDISCIPLINARIO DE ESTUDIOS EN BIOTECNOLOGÍA**  
**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**AISLAMIENTO DEL ADN<sub>c</sub> DEL GEN DE LA CALPAÍNA 3 DE  
GUAJOLOTE DOMESTICADO (*Meleagris gallopavo gallopavo*)**

TESIS QUE PRESENTA  
**MVZ. NADEZHDA OLIVERA MORA**

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS

ASESORA:  
DRA. EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA  
MARÍA GUADALUPE ZAVALA PÁRAMO

CO-ASESOR:  
DR. EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA  
HORACIO CANO CAMACHO

Morelia, Michoacán, Febrero de 2014

## **AGRADECIMIENTOS**

**Dra. María Guadalupe Zavala Páramo.** Por confiar en mí al realizar este proyecto, su disposición y su ayuda en mi formación académica.

**A los miembros del Comité Tutorial.** Por sus sugerencias y comentarios, con la finalidad de enriquecer la tesis.

**A mis compañeros y amigos del laboratorio.** Por todas las veces que recurrí a ellos y muy pacientemente me explicaban paso a paso las distintas técnicas y el manejo de programas para la realización de este trabajo.

**A mi familia.** Por su apoyo incondicional, su amor infinito y su alegría de vivir. A todas y cada una de las hermosas mujeres de casa (Reyna, Yamile, Maazel, Daira, Zyanya, Tlalli), que siempre me sacan una sonrisa ante las adversidades, su fortaleza y su amor ante la vida; y no olvidó a los dos caballeros que quiero y amo, Oscar y Alfonso.

A todos aquellos que aunque no estén físicamente, dejaron huella en mi vida y forman parte de mi existir. Muchas gracias por darme la fortaleza para continuar.

## ÍNDICE

Resumen.	6
Abstract.	7
I. Introducción.	8
II. Antecedentes.	9
II.1. <i>Meleagris gallopavo</i>	9
II.2. Caracterización fenotípica, productiva y socioeconómica del guajolote de traspatio en Michoacán	10
II.3. Estructura del músculo esquelético (estriado)	11
II.4. De músculo a carne, suavidad de la carne	16
II.5. Calpaínas típicas o convencionales	17
II.6. Calpastatina	21
II.7. Calpaína 3	23
III. Justificación.	28
IV. Objetivos.	29
V. Materiales y métodos.	30
V.1. Material biológico	30
V.2. Purificación de ARN total	30
V.3. Síntesis de ADNc y amplificación por RT-PCR	31
V.4. Clonación de productos de amplificación	32
V.5. Purificación de plásmidos recombinantes	33
V.6. Limpieza de plásmidos con bromuro de etidio para secuenciación	34
V.7. Secuenciación	35
V.8. Análisis de secuencias	35

VI. Resultados.	38
VI.1. Extracción de ARN total	38
VI.2. Síntesis y clonación del ADNc de <i>CAPN3</i>	38
VI.3. Análisis de la secuencia del ADNc de <i>CAPN3</i>	41
VI.4. Análisis filogenético	46
VI.5. Análisis de la estructura proteica del gen <i>CAPN3</i> de <i>M. g. Gallopavo</i>	49
VII. Discusión.	59
VII.1. Caracterización del gen <i>CAPN3</i> de <i>M. g. gallopavo</i>	59
VII.2. Análisis filogenéticos	60
VII.3. Análisis de la estructura proteica del gen <i>CAPN3</i> de <i>M. g. Gallopavo</i>	61
VIII. Conclusiones.	63
IX. Bibliografía.	64

## ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

Figura/Cuadro	Nombre	Pág.
<b>Figura 1.</b>	Estructura del músculo.	12
<b>Figura 2.</b>	Compartimientos del sarcómero y proteínas asociadas.	13
<b>Figura 3.</b>	Dominios de calpaínas convencionales.	19
<b>Figura 4.</b>	Clasificación estructural de la superfamilia de calpaínas.	20
<b>Figura 5.</b>	Estructura del dominio de calpastatina humana.	22
<b>Figura 6.</b>	Dominios característicos de CAPN3.	24
<b>Figura 7.</b>	Modelo de activación de la CAPN3.	25
<b>Figura 8.</b>	Mapa del vector de clonación TOPO ®	33
<b>Figura 9.</b>	Extracción de ARN total de músculo esquelético de <i>M. gallopavo</i> .	38
<b>Figura 10.</b>	Productos de amplificación obtenidos de músculo esquelético de <i>M. gallopavo</i> .	39
<b>Figura 11.</b>	Productos de digestión enzimática de plásmidos recombinantes de muslo de <i>M. gallopavo</i> .	40
<b>Figura 12.</b>	Productos de digestión enzimática de plásmidos recombinantes de pechuga de <i>M. gallopavo</i> .	40
<b>Figura 13.</b>	Secuencia de aminoácidos deducidos de <i>CAPN3</i> de <i>M. g. gallopavo</i> .	42
<b>Figura 14.</b>	Alineamiento clustal de las secuencias de aminoácidos del gen <i>CAPN3</i> , reportadas en base de datos.	46
<b>Figura 15.</b>	Árbol filogenético consenso de secuencias de nucleótidos del gen <i>CAPN3</i> .	48
<b>Figura 16.</b>	Árbol filogenético consenso de secuencias de aminoácidos del gen <i>CAPN3</i> .	49
<b>Figura 17.</b>	Predicción de estructura secundaria de la secuencia de aminoácidos del gen <i>CAPN3</i> .	51
<b>Figura 18.</b>	Estructura tridimensional de <i>CAPN3</i> de <i>M. g. gallopavo</i> .	52

<b>Figura 19.</b>	Estructura tridimensional del sitio catalítico de CAPN3 de <i>M. g. gallopavo</i> .	53
<b>Figura 20.</b>	Estimación de la calidad del modelo tridimensional para el sitio catalítico de CAPN3.	53
<b>Figura 21.</b>	Estimación de la calidad del modelo tridimensional para CAPN3.	54
<b>Figura 22.</b>	Comparación del modelo tridimensional de CAPN3 con calpaína 3-like de <i>M. gallopavo</i> y CAPN3 de <i>G. gallus</i> .	56
<b>Figura 23.</b>	Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la comparación de los modelos tridimensionales de CAPN3.	57
<b>Figura 24.</b>	Comparación del modelo tridimensional del sitio catalítico de CAPN3 con calpaína 3-like de <i>M. gallopavo</i> y CAPN3 de <i>G. gallus</i> .	58
<b>Cuadro 1.</b>	Oligos utilizados para amplificar ADNc de CAPN3-like	32
<b>Cuadro 2.</b>	Secuencias de genes o proteínas de CAPN3 utilizadas para los análisis filogenéticos	37
<b>Cuadro 3.</b>	Comparación de secuencias de nucleótidos y secuencias de aminoácidos deducidos del gen de <i>CAPN3</i> .	42

## RESUMEN.

Las calpaínas son cisteín-proteasas no lisosomales dependientes de calcio y/o dependientes de sodio (calpaína 3), que pertenecen a la súper familia de la papaína. Se consideran moduladores intracelulares de proteasas y gobiernan varias funciones celulares así como de transducción de señales y morfogénesis celular (por ej. remodelado del tejido muscular), desempeñan un papel crucial en la inducción de la entrada en la célula en una fase de reposo funcional. Se sabe que participan en el debilitamiento de las miofibrillas del sarcómero *post mortem*, dando como resultado la suavidad de la carne. Se ha establecido que las calpaínas están presentes en el pollo y en músculo de guajolote teniendo un papel similar en los procesos antes mencionados. Sin embargo, hasta ahora se carece de estudios genético moleculares de ésta enzima en el guajolote domesticado de traspatio en México. El objetivo de éste estudio fue caracterizar el ADNc del gen de calpaína 3 (*CAPN3*) que se expresa en tejido muscular de guajolote domesticado de traspatio *Meleagris gallopavo gallopavo*, realizar un análisis de comparación del ADNc del gen de *CAPN3* con las secuencias genómicas y del ARNm predicho reportados previamente para *M. g. gallopavo*, y realizar un análisis de comparación del ADNc de *CAPN3* con las secuencias de genes publicadas en bases de datos internacionales.

Se aisló el ARN total de muestras de tejido muscular de pechuga y muslo de un individuo adulto de guajolote de traspatio obtenido de una parvada de Huiramba, Michoacán. La amplificación ADNc se realizó mediante RT-PCR, utilizando el ARN total y oligonucleótidos diseñados con base en la secuencia del gen de calpaína 3-like, identificado en un genoma de guajolote reportado en base de datos. Los productos de amplificación se ligaron en el vector pCR4-TOPO y los plásmidos obtenidos se introdujeron en la cepa TOP10 de *Escherichia coli*.

El análisis clustal permitió la identificación de los dominios y la detección del cambio de un aminoácido dentro del dominio catalítico CysPc (Ser/Pro<sup>330</sup>) y otro en el dominio C2L (Ser/Gly<sup>472</sup>). El análisis filogenético de *CAPN3* a nivel de nucleótidos y a nivel de aminoácidos deducidos, utilizando las secuencias de predichos de ARNm o ADNc de genes reportados en bases de datos internacionales, mostró que se trata de un gen ortólogo para las especies analizadas. La topología de los árboles filogenéticos mostró a las *CAPN3* de los teleósteos *Danio rerio* e *Hippoglossus hippoglossus* como monofiléticos basales ancestrales y una separación de mamíferos y aves en dos clados, y se observó a *M. gallopavo* como especie hermana de *G. gallus* dentro de un subclado de Galloanserae. Los árboles mostraron topologías parafiléticas debido a la poca cantidad de genes de *CAPN3* reportados.

El modelo 3D realizado con *CAPN2* humana como templado, mostró una proteína inestable (aunque se minimizó la energía), no así, el modelo del sitio catalítico realizado con el templado de la calpaína 9; respecto a las comparaciones entre modelos de la proteína que abarca tres sitios (dominio CysPC, C2L y EF-hand), encontramos varias estructuras que difieren entre calpaína 3-like de *M. gallopavo* con la *CAPN3* del estudio y con *CAPN3* de *G. gallus*.

**Palabras clave:** proteasas moduladoras, calpaína 3, guajolote domesticado de traspatio, suavidad de la carne.

## ABSTRACT.

Calpains are non-lysosomal, calcium dependent and sodium dependent (calpain 3) cysteine proteases, belonging to the papain superfamily. Calpains are considered intramolecular modulators of proteases and are involved in several cellular functions like signal transduction and cellular morphogenesis (e. g. muscle tissue remodeling), also play a crucial role in the induction of the cell to enter into a functional repose phase. Calpains are known to participate in the weakening of sarcomere myofibrils *post mortem*, giving tenderness to the meat as result. It has been established that calpains are present in chicken and turkey muscle having a similar role in the previously mentioned cellular processes. Nevertheless, there is a lack of genetic-molecular studies for this enzyme in domesticated backyard turkey from México. The objectives of this study was the characterization of calpain 3 (*CAPN3*) cDNA with genomic and mRNA predicted sequences reported for *M. g. gallopavo*, and to realize a comparative analysis of *CAPN3* cDNA with gene sequences published on international database.

RNA was isolated of an adult backyard turkey breast and thigh muscle tissues obtained of a flock from Huiramba, Michoacan. cDNA amplification was realized by RT-PCR, using RNA total and oligonucleotides designed over a calpain 3-like gene which was identified in a turkey genome reported in database. The PCR products were ligated in a pCR4-TOPO vector and the obtained plasmids were introduced into TOP10 *Escherichia coli* strain.

Clustal analysis allowed the identification of domains and detection of one change of an aminoacid inside the catalytic domain CysPc (Ser/Pro<sup>330</sup>) and another one inside the C2L domain (Ser/Gly<sup>472</sup>).

Phylogenetic analysis of *CAPN3* at nucleotide and deduced aminoacid sequence level, using mRNA predicted sequences or cDNA of reported genes on international database, showed that *CAPN3* is an orthologous gene for the analyzed species. The topology of phylogenetic trees showed *CAPN3* of teleostei *Danio rerio* and *Hippoglossus hippoglossus* as monophyletic, basal and ancestral clade and the separation of mammals and birds in another two clades, also *M. gallopavo* was observed beside *G. gallus* inside a subclade of Galloanserae. The trees showed paraphyletic topologies probably because the low quantity of reported *CAPN3* genes.

The 3D model, made with human *CAPN2* as template, showed an unstable protein but the catalytic core, which was modeled over a human calpain 9; with regard to de comparisons between protein model over three sites (CysPC domain, C2L and EF-hand), we found few structure differences between calpain 3-like of *M. gallopavo*, *CAPN3* found in this study and *CAPN3* of *G. gallus*.

**Keywords:** modulating protease, calpain 3, backyard domesticated turkey, meat tenderness.

## I. INTRODUCCIÓN.

Actualmente, el estudio del genoma a través de la biología molecular ha revolucionado la investigación sobre los seres vivos, y gracias a ésta disciplina se han agregado conocimientos nuevos para comprender los procesos químico-biológicos que rigen la vida (Dunner y Cañon, 2004). Aunado a lo anterior, y con la generación de nuevas tecnologías en especies de interés productivo, es inminente la investigación para generar el conocimiento de procesos químicos-biológicos que impactan en características de interés productivo, ejemplo de ello, la transformación de músculo a carne y como fin último, una carne de calidad (características organolépticas). En bovinos, porcinos y ovinos la terneza o suavidad de la carne se ha asociado con la descomposición por una familia cisteín-proteasas intracelulares dependientes de calcio y/o dependientes de sodio (calpaína 3), llamadas Calpaínas, a las cuales también se les conoce como proteasas moduladoras. Las calpaínas gobiernan varias funciones celulares así como de transducción de señales y morfogénesis celular (por ej. remodelado del tejido muscular), desempeñan un papel crucial en la inducción de la entrada en la célula en una fase de reposo funcional, es decir, juegan un papel importante dentro de la homeostasis. Se sabe que participan en el debilitamiento de las miofibrillas del sarcómero *post mortem*, dando como resultado la suavidad de la carne. (Ferguson et al., 2001). También están implicadas en numerosas enfermedades como distrofia muscular y otras enfermedades degenerativas (Sorimachi et al., 2010).

Las calpaínas están también presentes en el pollo y en el músculo de guajolote, teniendo un papel similar en los procesos antes mencionados (Northcutt et al., 1998a; Zhang et al. 2008, 2009). Por ello, actualmente ha cobrado importancia la investigación sobre la correlación entre el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) de las calpaínas *CAPN1* y *CAPN3*, para el sabor, densidad de la fibra y suavidad de la carne en pollo (Zhang et al. 2007, 2008, 2009). Sin embargo, a pesar de que se ha determinado la presencia de calpaínas en pechuga de pavos de línea comercial, no se han realizado estudios genético moleculares para caracterizar a éstas enzimas en guajolotes domesticados de traspatio.

## II. ANTECEDENTES.

### II.1. *Meleagris gallopavo*

En México se encuentran las dos especies conocidas de guajolote, *Meleagris ocellata* (Guajolote del Monte), que se localiza solamente en el sureste de México y en zonas colindantes de Guatemala y Honduras, y *Meleagris gallopavo* (Guajolote Norteño), de la cual procede el guajolote doméstico (Leopold, 1990). El guajolote norteño tiene la siguiente taxonomía asignada, según Linnaeus 1758:

<b>Reino:</b>	Animalia	<b>Orden:</b>	Galliformes
<b>Filo:</b>	Chordata	<b>Familia:</b>	Phasianidae
<b>Subfilo:</b>	Vertebrata	<b>Subfamilia:</b>	Meleagridinae
<b>Clase:</b>	Aves	<b>Género:</b>	<i>Meleagris</i>
<b>Superorden:</b>	Neognathae	<b>Especie:</b>	<i>Meleagris gallopavo</i>

Se considera que de acuerdo con la distribución geográfica, la morfología y algunos estudios con marcadores moleculares, *M. gallopavo* comprende seis subespecies: *M. g. gallopavo* (doméstico), *M. g. intermedia* (Río Grande), *M. g. merriami* (Merriam), *M. g. mexicana* (Gould), *M. g. osceola* (de la Florida) y *M. g. silvestris* (Silvestre) (Stangel et al., 1992; Mock et al., 2002).

Se propone que el proceso de domesticación de *M. g. gallopavo* ocurrió entre los años 200 y 700 AC (Crawford, 1992), por diferentes grupos prehispánicos como los aztecas, purépechas y otras etnias mexicanas, sin embargo, se desconoce si existieron uno o varios centros de domesticación. Los Mayas y Aztecas lo utilizaban como una fuente de carne, sus plumas eran utilizadas como piezas ornamentales y sus huesos como herramientas, pero también tuvo importancia religiosa, aunque en el periodo Clásico la perdió (Valadez et al., 2001). Los guajolotes domésticos llegaron a España a principios del siglo XVI y de ahí pasaron a Inglaterra y a otros países europeos, en los que se realizaron diversos trabajos de selección. Los guajolotes o pavos domésticos (líneas comerciales) actuales en Estados Unidos, con los cuales se estableció el inicio

de la avicultura doméstica, descienden de ejemplares importados de Europa (Becerril, 2000).

En México, *M. g. gallopavo* además de ser un recurso zoogenético es considerado un recurso social, ya que forma parte de la cultura nacional. Persiste actualmente en rancherías o áreas suburbanas, 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); su permanencia parece deberse principalmente a su rusticidad y resistencia, lo cual les ha permitido adaptarse a condiciones de manejo rural, bajo prácticamente todas las condiciones ecológicas, además de que su crianza es una actividad tradicional que se transmite de generación en generación (Mallia, 1998; Losada et al., 2006).

## **II.2. Caracterización fenotípica, productiva y socioeconómica del guajolote doméstico de traspatio en Michoacán**

En varias regiones del estado de Michoacán, *M. g. gallopavo* son criados bajo un sistema de producción no tecnificado (94.3%), es decir, mantienen a las aves en traspatios sin cobertizos o gallinero y durmiendo en árboles secos o vivos (López-Zavala et al., 2008a). Con base en los estudios de poblaciones de *M. g. gallopavo* realizadas en las cinco regiones fisiográficas del estado de Michoacán, se determinó que el rango del tamaño de la parvada es de 2 a 57 individuos, siendo mayor en la región Bajío, intermedio para las regiones Sierra y Costa, y el más bajo para las regiones Faja Volcánica Transmexicana y Balsas, con una unidad productiva (UP) promedio de 7 a 15 aves. Se trata de una especie polígama donde las hembras se cruzan con varios machos y viceversa (Krakauer, 2008), pero de acuerdo a los productores existe un sistema de apareamiento de 4 hembras por 1 macho. El peso en adultos mayores de 12 meses es de 6.70 a 8.90 Kg machos y 2.90 a 4.35 Kg hembras, las aves más pesadas se localizaron en las regiones de clima templado. En las unidades no tecnificadas, el esquema de vacunación es poco o nulo y sin utilización de variedades mejoradas, lo que indica que el tipo genético de guajolote es autóctono, por

lo que es un fondo genético propio. Los adultos alcanzan su madurez sexual al primer año. Los nacimientos ocurren en todas las estaciones del año, preferentemente en primavera-verano, principalmente en las regiones Sierra y Costa. El rango del número de huevos es de 12 a 15 por evento de anidamiento que ocurre hasta tres veces al año (López-Zavala et al., 2008a).

La proporción del color del plumaje es similar en todas las regiones fisiográficas encontrándose el negro (38%), negro con blanco (20%), blanco con negro (20%), café (7%), blanco (5%) y gris (2%). El motivo principal de crianza de los guajolotes de traspatio es por tradición familiar y la mujer es la que lleva a cabo las labores de crianza y atención, proporcionándole una alimentación basada principalmente en maíz (entero, quebrado, nixtamalizado, tortilla), frutos según la región, además de lo que obtienen al pastorear cuando están libres en los pastizales o huertos (López-Zavala et al., 2008b).

La característica morfológica del largo de cuerpo promedio fue similar para cuatro de las regiones, mientras que en la región Costa fue menor tanto en hembras como machos al igual que su peso y envergadura, esto sugirió una estructura ósea más pequeña que marca una diferencia morfométrica de ésta región con respecto a las otras cuatro. Con relación a la región Sierra, se registró una envergadura que no fue proporcional con los pesos registrados y su peso promedio fue bajo y similar al de las aves de la región Costa (López-Zavala et al., 2008b).

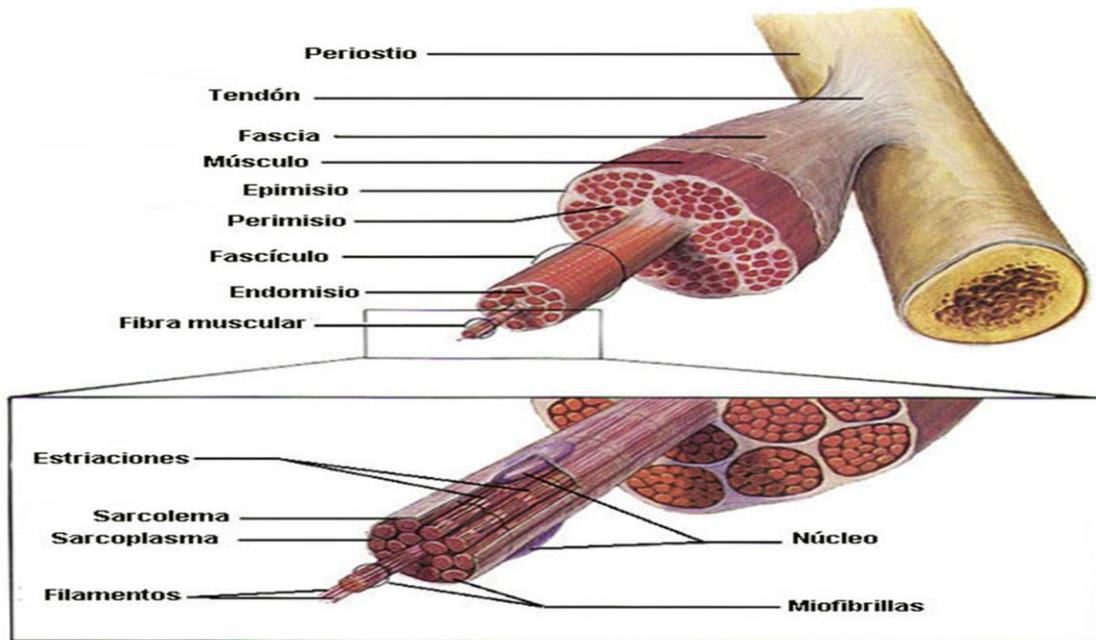
Los individuos de *M. g. gallopavo* pueden vivir 10 a 12 años, pero a los 5 años de edad ya son considerados viejos, la mortalidad anual es del 50% en la población es común (Snyder, 2007).

### **II.3. Estructura del músculo esquelético (estriado)**

Las fibras musculares se mantienen en su lugar debido al tejido conjuntivo que actúa como envoltura y división. El epimisio es la funda del músculo, mientras que el perimisio, rodea a los grupos de fibras y cada fibra es rodeada por el endomisio; y el sarcolema es la membrana celular del músculo (Fig. 1).

La funcionalidad de los músculos recae en el correcto ensamblaje de miofibrillas, organelos cilíndricos unidos a la parte externa de la membrana celular, las cuales

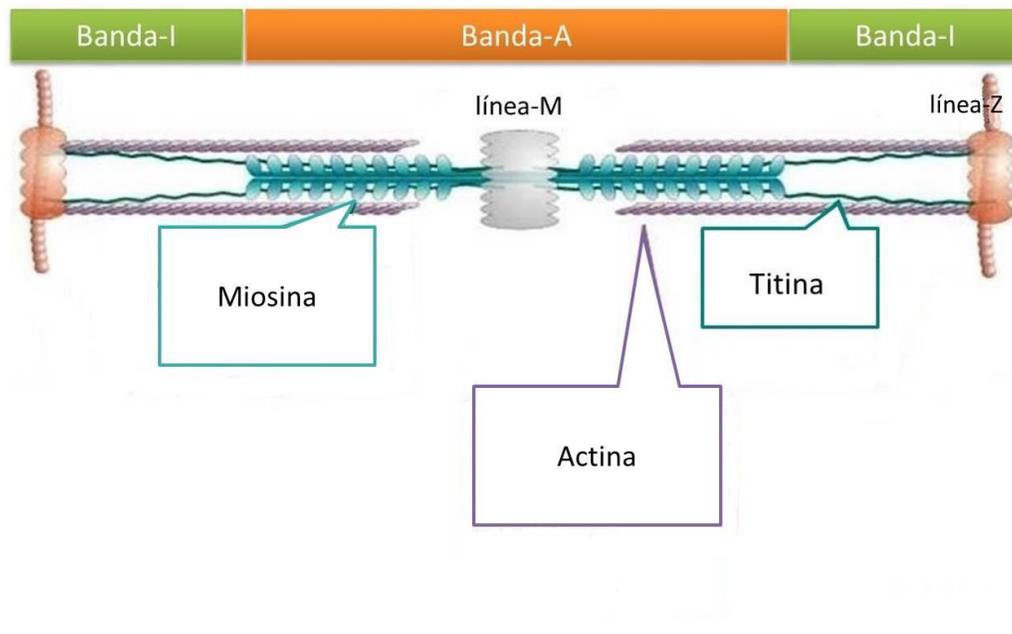
corren de extremo a extremo de la célula. Las miofibrillas están compuestas de series en tándem (estrías que dan su aspecto al músculo estriado) de unidades básicas funcionales llamadas sarcómeros. El sarcómero se divide en cuatro componentes principales: bandas-Z, bandas-I, bandas-A y línea-M. Los sarcómeros se identifican como los segmentos entre dos líneas-Z (Fig. 2).



**Figura 1.** Estructura del músculo.

Las bandas-Z anclan los filamentos delgados (actina) de la banda-I, la línea-M los filamentos gruesos (miosina) de las bandas-A. Los filamentos delgados se componen de filamentos de actina y las proteínas asociadas troponinas (Tns) (TnC, TnI y TnT) y tropomiosinas (Tm), rodean a los filamentos gruesos formando hexágonos (cada filamento grueso está rodeado por 6 filamentos finos), si se hace un corte transversal de la miofibrilla a nivel de la banda I o de la zona de la banda A donde se encuentran. Los filamentos de actina son el principal componente de las bandas-I, y se unen a las líneas-Z mediante  $\alpha$ -actinina, y se les conoce como complejo I-Z-I. Los filamentos finos se organizan durante el desarrollo en su posición gracias a la nebulina, una proteína inextensible paralela a ellos y que se ancla en el disco Z. En la cara

interna de la membrana celular se encuentra la distrofina, que une a los filamentos de actina de las miofibrillas periféricas de la célula muscular con proteínas de la membrana celular como el distroglicano que se une, a su vez, a las proteínas de la matriz extracelular (laminina). La tropomodulina termina y estabiliza al filamento fino en el centro del sarcómero (Clark et al., 2002).



**Figura 2.** Principales compartimientos del sarcómero y las proteínas asociadas a éste, modificado de Laing y Nowak (2005).

Los filamentos gruesos están compuestos por miosina, y se encuentran conectados desde la línea-M hasta la línea-Z por titina; la miosina está compuesta por dos cadenas pesadas de miosina (MHCs) y cuatro cadenas ligeras (MLCs). La zona central del filamento grueso es más gruesa y está unida con las de los filamentos gruesos vecinos por medio de una proteína denominada miomesina y otra denominada proteína C, éstas zonas centrales gruesas unidas entre sí forman la línea M. Los filamentos de desmina y vimentina, forman una red alrededor de la miofibrilla a nivel del disco Z y enlazan miofibrillas vecinas de la misma fibra muscular. Los discos Z de las miofibrillas periféricas se unen, por medio de proteínas como la vinculina y la talina, a la

matriz extracelular a través de proteínas de membrana, conocidas como integrinas (Laing y Nowak, 2005).

El tercer sistema de filamentos de músculo estriado consiste en la gran proteína modular, titina. Después de la actina y miosina, la titina (también conocida como conectina) es la tercera proteína muscular más abundante y la más grande proteína identificada hasta ahora, con 34,350 aminoácidos. La titina es la responsable de la resistencia al estiramiento que presentan las miofibrillas y del mantenimiento de los filamentos gruesos en la posición central del sarcómero (Maruyama et al., 1977). El extremo N-terminal de la titina, de sarcómeros adyacentes, se sobrelapa en la línea-Z. Las moléculas hacen puente en bandas-I y bandas-A, y su extremo C-terminal termina sobrelapado en la línea-M, formando así un sistema continuo de filamentos en miofibrillas. Muchas propiedades estructurales únicas establecen a la titina como un componente sarcomérico multifuncional crucial. Primero, diferentes componentes estructurales de la titina en la región de la banda-I tienen propiedades elásticas; así la titina parece ser una molécula que gobierna algunos aspectos de la rigidez miofibrilar. Segundo, la estructura de motivos repetidos de la estructura de la titina, son ensamblados en los estadios tempranos de la miofibrillogénesis, y su interacción con varios componentes sarcoméricos y regulatorios, la hacen un candidato primario para actuar como templado sarcomérico y estabilizador. Tercero, el extremo C-terminal contiene un dominio Ser/Thr cinasa cuya función continua sin conocerse, pero cuya presencia sugiere que titina está también involucrada en rutas de señalización (Clark et al., 2002). La titina tiene un papel principal en el proceso de ensamble del sarcómero, es una proteína multifuncional que contiene múltiples sitios de unión para las proteínas estructurales y de señalización, así como un dominio cinasa inherente. La N-terminal de la titina se extiende por el disco Z y contiene varios pequeños motivos, repeticiones de 45 aminoácidos cada una, llamados Z, intercalada entre regiones flanqueantes que contienen dominios Ig. Para la vinculación de ésta región se demostró que GFP y el Z, juegan el papel más importante en la selección de fragmentos de la titina para el disco Z mientras que la sobre-expresión de éstas repeticiones, produce un efecto negativo dominante asociado al desensamble miofibrilar; existe la propuesta que el dominio

cinasa en el extremo C-terminal de titina fosforilada teletonina/T-cap, que es parte del complejo N-terminal, y puede estar implicado en el control de miofibrinogénesis (Boateng y Goldspink, 2007). Por otra parte, cabe señalar que la titina contiene, en las cercanías del dominio N2A, regiones homólogas a calpastatina, que se han propuesto para ser inhibidores potenciales de calpaína 3 (Taveau et al., 2003).

La línea-M y banda-I para titina, contienen un sitio de unión para la calpaína 3/p94 específica de músculo esquelético. El sitio de unión a titina en p94 ha sido mapeado hasta su dominio IS2, una secuencia única que también alberga una señal de localización nuclear, sugiriendo que p94 puede unir funciones nucleares con componentes sarcoméricos. Así, la actividad proteolítica de p94 es crítica para la función normal de músculo esquelético (Sorimachi et al., 1995).

La fibra muscular esquelética contiene varios núcleos alargados situados en la zona periférica de la célula, esto se debe a la fusión durante el desarrollo embrionario de multitud de células (mioblastos). Además, las cisternas del retículo sarcoplásmico rodean a cada miofibrilla, hay cisternas que rodean a la banda A de la miofibrilla y otras que rodean a la banda I de la miofibrilla. Cada cisterna está formada por una red de canalículos, y esta red está formada por tubos longitudinales, anastomosis transversales y anastomosis terminales. El retículo sarcoplásmico se encarga de almacenar  $\text{Ca}^{2+}$  por un mecanismo de transporte activo (bomba de calcio,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa).

Entre dos cisternas del retículo endoplásmico liso (REL) adyacentes de retículo sarcoplásmico se sitúa una invaginación de la membrana celular que produce expansiones transversales al eje celular llamadas túbulos transversos o tubos T, a este grupo de dos porciones de anastomosis terminales de REL y un tubo T se le denomina tríada (Clark et al., 2002). Además, las chaperonas están involucradas en el proceso de ensamble del sarcómero y aparato contráctil del músculo esquelético en vertebrados, falta por dilucidar la forma de acción en éstas funciones (Boateng y Goldspink, 2007).

#### II.4. De músculo a carne, suavidad de la carne

La calidad de la carne es el término genérico utilizado para describir las propiedades organolépticas de la carne como el color, sabor, textura, suavidad y jugosidad. La suavidad ha sido considerada por los consumidores como el atributo organoléptico más importante de la carne fresca, afectada por varios factores como sexo, edad, variedad, manejo antes y después del sacrificio, entre otros, sin olvidar el grado de proteólisis de las proteínas miofibrilares del músculo (Uzcátegui-Bracho y Jerez-Timaure, 2008; Motter et al., 2009). Los músculos que son flexibles y extensibles a la muerte del animal, pronto se vuelven rígidos (*rigor mortis*), como resultado de un acortamiento de las miofibrillas y en algunos casos contracción lateral; además, el pH disminuye sustancialmente.

En la siguiente fase *post rigor*, la suavidad de la carne es progresiva, los cambios *post mortem* son similares en diferentes especies, pero la escala de tiempo difiere considerablemente. Por ejemplo, el *rigor mortis* dura más de 24 horas en el ganado vacuno y ovino, pero sólo 6 horas en pechuga de pollo (Lee et al., 2008). En cerdos, durante las primeras 72 horas de maduración de la carne se produce hasta el 80% de la suavidad máxima posible, por efecto de una alta actividad de la calpaína 1 y baja actividad de la calpastatina (inhibidor de las calpaínas típicas), y en pollo esto ocurre durante las primeras 8 horas (Koohmaraie et al., 1991; Geesink et al., 2006).

Después de la muerte, el músculo deja de recibir oxígeno, produciéndose ácido láctico a partir de glucógeno, la acumulación de ácido láctico hace descender el pH de 7 hasta 5.4 o 5.8 en un tiempo de 15 a 36 horas *post mortem* (en bovinos, corderos y cerdos). Este descenso de pH junto con la baja temperatura a la cual se almacena la carne (4 a 5°C), favorece la acción de las calpaínas, proceso anterior conocido como maduración de la carne (Motter et al., 2009). En conjunto, las calpaínas típicas y la calpastatina, regulan el grado de proteólisis según sus concentraciones. Algunos estudios realizados en ganado bovino muestran que a altas concentraciones de calpastatina, hay un menor grado de suavidad de la carne; en este punto entraría en acción la calpaína 3 por ser tejido específica de músculo y estar anclada a titina.

Debido a su influencia potencial sobre el crecimiento del músculo y su papel en la organización miofibrilar el gen de la calpaína 3 ha cobrado importancia como gen candidato para el diseño de esquemas 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). 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).

Por lo anterior, 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 en pollo (Zhang et al., 2007, 2008, 2009). Pero 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 porque se carece de estudios genético moleculares de los genes.

## **II.5. Calpaínas típicas o convencionales**

Las calpaínas fueron descritas por primera vez en 1964 por Guroff en el cerebro de ratas, y purificadas finalmente por Ishura en 1978. El nombre de calpaína se escogió por contracción de los vocablos calcio y papaína. Las calpaínas fueron denominadas inicialmente como CANP por su nombre en inglés Calcium Activated Neutral Protease. La primera en purificarse fue la calpaína 2 (m-calpaína) en 1976, posteriormente, Murachi y colaboradores purificaron la calpastatina. En 1984, Ono clonó ADNc de calpaína en conejo. La primera vez que se usó el término  $\mu$  y m-calpaína fue en 1989, haciendo referencia a la concentración de calcio que requieren para su activación por autólisis parcial en la presencia de calcio; una autólisis prolongada puede inactivarlas (Guroff, 1964; Sorimachi et al. 2010, 2011).

Las calpaínas (CAPNs) pertenecen a la superfamilia de la papaína (dominio conservado cd00044 papain-like), la cual está compuesta de tres familias distintas: la

familia de las CAPNs, la de papaínas y la de bleomicín hidrolasas (Berti y Storer, 1995). Las CAPNs son cistein-proteasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares (Clan CA, familia CO2, EC 3.4.22.17) que se encuentran en la mayoría de los eucariotes y algunas bacterias. Las calpaínas  $\mu$  y  $m$ , son proteínas heterodiméricas de aproximadamente 80 kDa (subunidad catalítica) y un monómero de 30 kDa, una subunidad reguladora conservada en las calpaínas convencionales. Las secuencias de aminoácidos de las calpaínas en mamíferos son altamente conservadas con más del 90% de homología (Goll et al., 2003; Sorimachi et al., 2010). Estas proteínas, poseen secuencias de aminoácidos similares a los dominios de proteasa de la  $\mu$ -calpaína humana (llamada actualmente calpaína 1), la principal proteasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Además de los dominios de proteasa, las CAPNs poseen una amplia variedad de dominios entre los cuales se incluyen dominios C2 y C2-like, Zn finger y PEF-hand. Entre las CAPNs mejor estudiadas en mamíferos están la calpaína 1 y  $m$ -calpaína (llamada actualmente calpaína 2). La estructura cristalográfica de las calpaínas convencionales o típicas revela 4 dominios en la subunidad de 80 kDa:

- 1) Secuencia NH2 terminal de 19 aminoácidos (donde ocurre una autólisis parcial para la activación).
- 2) Dominio CysPc (cd00044), que constituye el sitio activo (PC1 y PC2).
- 3) Dominio tipo C2 (C2L), de unión a calcio.
- 4) Dominio PEF (penta EF-hand).

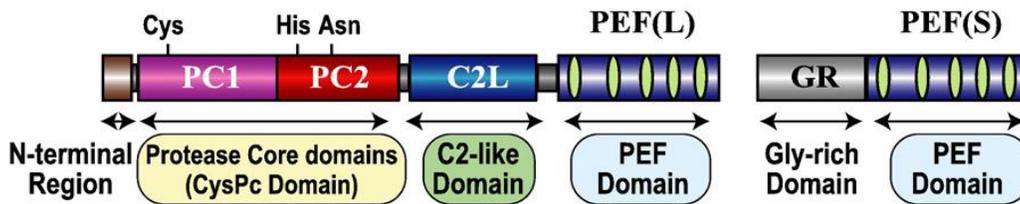
El dominio II o CysPc, se caracteriza por un residuo de cisteína (Cys) en la posición 115 (CAPN1) o 105 (CAPN2), que es el sitio activo, en conjunto con un residuo de histidina (His) en la posición 272 (CAPN1) o 262 (CAPN2), y un residuo de asparagina (Asn) en la posición 296 (CAPN1) o 286 (CAPN2); estos residuos forman una tríada catalítica, característica de las cistein-proteasas (tales como papaína o catepsinas). El aminoácido Cys se encuentra en PC1, mientras que His y Asn que constituyen el resto de la tríada catalítica, se encuentran en PC2. Ésta distribución da como resultado la formación de un bucle al momento de la unión del calcio, activando

así a la calpaína. La homología de secuencia entre las especies varía de 85 a 93% para este dominio.

El dominio C2L, tiene 8 cadenas antiparalelas  $\beta$ , es de unión a calcio y puede estar involucrado en la unión a fosfolípidos y en la regulación de la actividad de la calpaína, por su participación en interacciones electrostáticas.

El dominio PEF(L), al igual que el dominio VI o PEF(S), la secuencia es homóloga a calmodulina (24 a 44% de identidad y 51 a 54% de similitud para CAPN1 y CAPN2), involucrados en la dimerización de la subunidad catalítica y regulatoria. La homología de secuencia entre las especies varía de 65 a 93% para este dominio (Goll et al., 2003; Ono y Sorimachi, 2011).

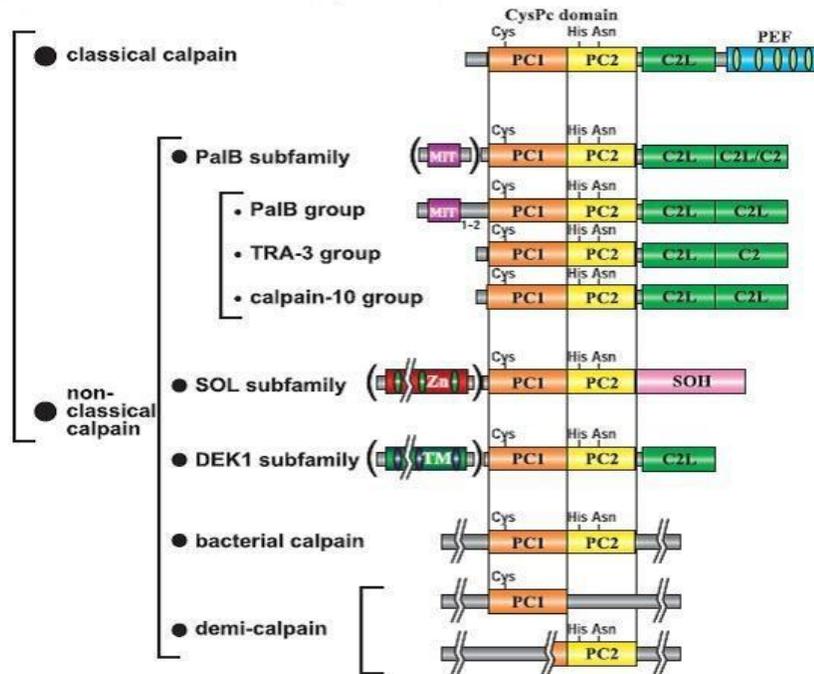
En la subunidad regulatoria de 30 kDa, en la región del NH2 terminal se encuentra el dominio GR (dominio hidrófobo), rico en aminoácidos de glicina, sugiriendo que tiene un papel de interacción con las membranas celulares y/o a otras moléculas. La mayor parte de éste dominio se encuentra autolisado durante la activación (Suzuki et al., 2004; Pal et al., 2001). En el COOH terminal de ésta subunidad, se ubica el dominio VI o PEF(S), de unión a calcio (Fig. 3).



**Figura 3.** Dominios de calpaínas convencionales, tomado de Ono y Sorimachi (2011).

Desde el punto de vista estructural, las CAPNs homólogas en vertebrados se pueden dividir en dos clases. El primer grupo consiste en las típicas o clásicas, altamente similar en las subunidades catalíticas de las CAPNs convencionales. El segundo grupo (calpaínas atípicas) contiene varias proteínas que tienen un dominio de proteasa con dominios extra que no muestran similitud con los dominios C2L y PEF (subfamilias PalB, SOL y DEK1). Se considera que éstas CAPNs atípicas tienen modos

de acción diferentes a los de las CAPNs típicas (Sorimachi et al., 2010; Ono y Sorimachi, 2011). Además, también se pueden clasificar según su tejido/órgano de distribución en ubicuas o tejido específicas (Fig. 4).



**Figura 4.** Clasificación estructural de la superfamilia de calpainas. Símbolos: PC1 y PC2, dominios proteasa básicos 1 y 2 del dominio CysPc; C2L, dominio tipo C2; PEF, dominios penta-EF-hand; GR, dominio hidrófobo rico en glicina; MIT, interacción de microtúbulos y motivo de transporte; C2, dominio C2; Zn, dedos de Zn; SOH, dominio homólogo de SOL; TM, dominio transmembrana (Sorimachi et al., 2011).

Las CAPNs convencionales o típicas están localizadas principalmente en el citosol, muestran expresión ubicua y exhiben actividad proteolítica dependiente de calcio a pH neutro. Su modo de acción es procesando o degradando los sustratos por uno o un limitado número de sitios que modulan sus estructuras y sus actividades (DuVerle et al., 2010). Por ello, las CAPNs son consideradas como moduladores intracelulares de proteasas y gobiernan varias funciones celulares, así como de transducción de señales y morfogénesis celular (desempeñan un papel crucial en la inducción de la entrada en la célula en una fase de reposo funcional) (Sorimachi et al., 2011).

Se ha sugerido que la base estructural de reconocimiento de sustratos por las calpaínas, son las denominadas secuencias PEST, secuencias ricas en residuos de prolina (P), ácido glutámico/ácido aspártico (E), serina (S) y treonina (T) (Łopatniuk y Witkowski, 2011).

Las fitocalpaínas dentro de la subfamilia DEK 1, están involucradas en el direccionamiento de las partes de la planta, es decir, en la correcta formación de las partes de la planta, su falla o sobreexpresión resulta en deformación o malformación de la misma (Lid et al., 2002; Liang et al., 2013).

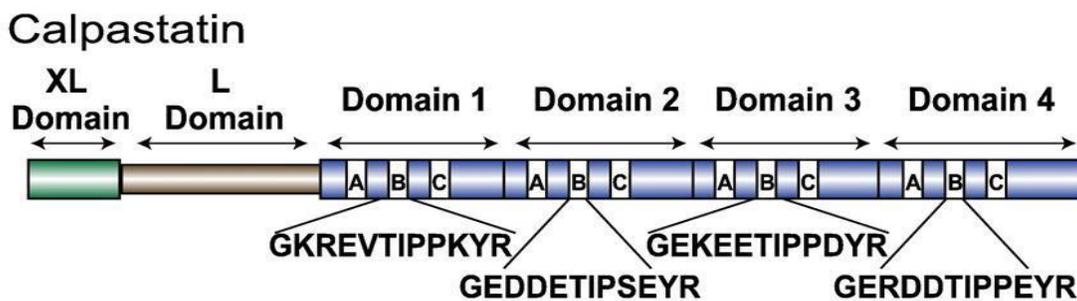
## **II.6. Calpastatina**

El control de la actividad de las CAPNs convencionales está determinado por las concentraciones de calcio y por la presencia de calpastatina, hasta el momento el único inhibidor endógeno conocido. Ambas proteínas actúan como un sistema calpaína/calpastatina en el músculo estriado, después de la muerte este sistema es el principal responsable de la suavidad de la carne (Koohmaraie et al., 1991). La calpastatina 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 en bovinos. La calpastatina se acumula cerca del núcleo en estructuras granulares sin membranas. En cambio, las calpaínas se localizan en forma difusa en el citosol (Motter et al., 2009).

La interacción calpaína/calpastatina es regulada por calcio (Goll et al., 2003; Melloni et al., 2006), pero puede ocurrir también en la ausencia de calcio o en bajas concentraciones, lo que indica las condiciones fisiológicas en las que la calpaína conserva su estado conformacional inactivo libre de calcio. La región de unión no inhibitoria de la calpastatina, está localizada en el dominio L (secuencias de aminoácidos codificadas por los exones 4-7); ésta región reconoce una secuencia de la calpaína situada cerca del extremo del dominio CysPc. A nivel funcional, la interacción calpaína/calpastatina a una concentración fisiológica de calcio (micro y mili molar), representa un mecanismo para el control de la cantidad de la forma activa de las proteasas, generadas en respuesta a la afluencia intracelular de calcio. Aunado a lo

anterior, la fosforilación por la proteína cinasa C (PKC) en dos sitios incluidos en éstas secuencias de calpastatina, reducen ésta asociación; siendo un mecanismo adicional para la regulación de la calpaína mediante el control de la velocidad y el grado de activación de enzima (Melloni et al., 2006).

Las modificaciones conformacionales en el proceso de activación de las calpaínas, son seguidas por una degradación autoproteolítica que elimina la región N-terminal de los dominios I y GR. Regulada por la calpastatina, la cual tiene una estructura molecular que consiste en una región N-terminal (L-dominio) y cuatro unidades repetitivas inhibitoras, cada uno con tres regiones altamente conservadas llamado A, B, y C (Fig. 5). La región B contiene la secuencia consenso de calpaína, las secuencias A y C no parecen ser necesarias para la expresión de la actividad inhibitora, pero pueden ejercer otras funciones tales como la interacción con los dominios PEF (L/S) en la presencia de calcio o la reducción de éste (Melloni et al., 2006; Motter et al., 2009).



**Figura 5.** Estructura del dominio de la isoforma más larga de calpastatina humana. Se muestran cuatro unidades inhibitoras repetitivas (dominios de 1 a 4). Exones que codifican dominios XL y L son sometidos a splicing alternativo (Ono y Sorimachi, 2011).

En presencia de calcio, una molécula de calpastatina puede inhibir hasta cuatro moléculas de calpaína, ya que se forman  $\alpha$ -hélices en los subdominios A y C de la calpastatina y se evidencian estructuras abiertas en la superficie de los dominios PEF (L/S) de las calpaínas, promoviendo la interacción entre ambas proteínas, quedando el subdominio B próximo al sitio activo de las calpaínas, bloqueando el acceso de los sustratos al mismo. Cabe destacar, que la calpastatina no inhibe a CAPN3, más bien,

es un sustrato de ésta. Debido a lo anterior, se sugiere que CAPN3 es un posible regulador de las calpaínas convencionales (Ono et al., 2004).

Los tratamientos con  $\beta$ -agonistas adrenérgicos, incrementan la actividad de la calpastatina, es decir, hay aumento en masa muscular pero no va ser suave (Geesink et al., 2006).

El gen *CAST* tiene un tamaño de 17040 pb y se localiza en el cromosoma Z de *M. gallopavo*, para el que hasta ahora se han reportado dos transcritos predichos de 21 exones y otro de 19 exones con un tamaño similar de 1584 pb que codifica para 528 aa (NCBI ENSMGAG00000008039).

## II.7. Calpaína 3

La primera calpaína tejido específica descrita en 1989 por Sorimachi y colaboradores, fue la calpaína 3 (conocida como CAPN3 o CAPN3/p94), misma que presenta el 60% de identidad a CAPN1 y CAPN2 (Sorimachi et al., 1989). Actualmente, la CAPN3/p94 es la más estudiada en mamíferos ya que está involucrada en calpainopatías, siendo un regulador del tejido músculo esquelético (procesos como la generación de fuerza, adaptación a la respuesta al ejercicio, estiramiento o la protección durante la contracción). En 1995, las mutaciones en *CAPN3* demostraron ser responsables de la distrofia muscular de cintura tipo 2 (LGMD2A), la cual parece ser causada principalmente porque la actividad de la proteasa se ve comprometida, en lugar de daños en propiedades estructurales (Richard et al., 1995). Asociado a lo anterior, se puntualizó la importancia que tienen las secuencias de inserción características de la *CAPN3*, con respecto a la distrofia LGMD2A, ubicadas en el exón 6 (IS1) y en los exones 15 y 16 (IS2), afectan la actividad autolítica de la calpaína para su activación (Stockholm et al., 2001). Además, la isoforma que carece del exón 6 predomina durante el proceso de regeneración temprana. Por lo tanto, la calpaína 3 completa desempeña un papel en el servicio de limpieza de fibras inervadas intactas o un papel regulador, mientras que la isoforma sin exón 6 podría desempeñar un papel durante la multiplicación y la diferenciación de células precursoras del músculo (Stockholm et al., 2001).

La CAPN3 no es dimérica, contiene tres regiones características, NS, IS1 e IS2. En el extremo N-terminal se encuentra la región NS, entre PC1 y el dominio PC2 está la secuencia de inserción 1 (IS1) y entre los dominios C2L y PEF(L) se ubica la secuencia de inserción 2 (IS2) (Fig. 6). CAPN3/p94 se expresa de manera predominante en músculo esquelético (interviene en la homeostasis) y se expresa diez veces más que las CAPNs convencionales. También se caracteriza principalmente por su rápida autólisis (posee vida media menor a 10 minutos *in vitro*), comenzando con su autoproteólisis en las regiones NS y IS1. La autólisis en IS1 genera una transición estructural del sitio activo, liberando las restricciones dentro de la molécula e impedimentos estéricos, liberando la hendidura proteolítica. Ésta autólisis es dependiente de la presencia de las regiones IS1 e IS2 y de inhibidores como la leupeptina. Ésta autólisis parece ser dependiente de Na<sup>+</sup> en ausencia de Ca<sup>2+</sup>, mostrándose como el primer ejemplo de una enzima intracelular dependiente de Na<sup>+</sup> (Ono et al., 2010).

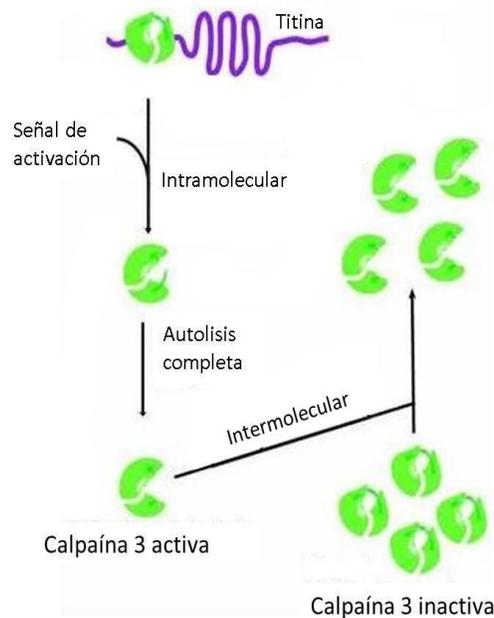
Además, la CAPN3/p94 posee una señal de localización nuclear en la región IS2 y se localiza en el núcleo o en el citosol. Ésta CAPN se une específicamente a la proteína gigante del músculo, la titina, a través de la región cercana de IS2. La actividad de proteasa de CAPN3/p94 está suprimida *in vivo* por la unión de la titina en la región N2A (también se une a la línea M del sarcómero, tiene dos sitios de unión a titina), (Ono et al., 2006; Ono et al., 2004).



**Figura 6.** Dominios característicos de CAPN3, modificado de Ono (2011).

El mecanismo de activación CAPN3 es similar a la activación de CAPN1 y CAPN2, y corresponde a una autólisis en el sitio activo de la proteasa, iniciando por una autólisis intramolecular seguida por una intermolecular, que amplifica la señal para activar a otras moléculas de CAPN3 (Taveau et al., 2003). La CAPN3 permanece en un estado inactivo en el músculo esquelético a través de la unión a titina. Tras la recepción

de una señal de activación, un subconjunto de moléculas de CAPN3 se somete a autólisis intramolecular en NS e IS1, seguido de una autólisis intermolecular de otras moléculas CAPN3 que no han recibido la señal de activación. Éste último paso genera una cascada de amplificación que conduce a la activación global de CAPN3 (Fig. 7).



**Figura 7.** Modelo de activación de la CAPN3, modificado de Taveau (2003).

Se sabe que el gen *CAPN3/p94* en humano, ratón y rata, presenta un promotor alternativo y algunos de sus productos se expresan en otros tejidos, por ejemplo Lp82 (cristalino) y Up86 (células de cerebro). Para la transcripción de *CAPN3/Lp82* y *CAPN3/Up86*, *CAPN3/94* tiene un promotor alternativo entre los exones 1 y 2 (Kawabata et al. 2003 y Sorimachi et al., 2011). Aunado a lo anterior, existen eventos transcripcionales y postranscripcionales, que conducen a modificaciones en las regiones NS, IS1 e IS2, o C2L en ratón. Éstos eventos pueden dividirse en tres: a) empalme de los exones que conservan el marco de traducción; b) la inserción de dos secuencias intrónicas distintas entre los exones 16 y 17 que alteran la estructura y traducen a una proteína incompleta, carente de dominio IV; y c) el uso de un primer exón alternativo específico para cristalino (Herasse et al., 1999). Además, se sabe que

las células musculares se utilizan como un medio para generar múltiples isoformas de un gen determinado, por su utilización de splicing alternativo, ejemplo de ello, la titina. En particular, los dos sitios de unión de titina reconocidos por CAPN3 son afectados por splicing alternativo. Éstos eventos generan en la línea N2A isoformas específicas y en la línea M una mezcla de isoformas, cuyas proporciones varían de músculo a músculo. La generación de éstas isoformas sugiere que CAPN3 interactúa con otras proteínas, por lo menos una proteína que también esté sujeta a splicing alternativo (titina), dando como resultado un espectro de posibles combinaciones de tejidos específicos (Herasse et al., 1999).

La disferlina, actúa en conjunto con CAPN3 (asociada a membrana, específicamente a la tríada que se forma con los túbulos T, en sarcómero), M-caderina y la B-catenina para la miogénesis del músculo estriado.

Se sabe que la unión a titina, mantiene en una forma estable y previene a calpaína 3 de degradarse autolíticamente a sí misma. Se cree que CAPN3 (dentro de sarcómero) se mantiene inactiva la mayor parte del tiempo, activándose y redistribuyéndose cuando los sarcómeros son ejercitados por encima del umbral, para interactuar con diferentes proteínas como la cadena ligera de miosina (además de otras proteínas de soporte), sugiriendo un rol de la proteasa en el remodelaje de los sarcómeros. Existe una relación entre CAPN3 y la capacidad de regenerar fibras de músculo. Se ha asociado la actividad proteolítica de CAPN3 sobre la proteína reguladora transcripcional MARP2 de respuesta a estrés, concluyendo que la pérdida de actividad proteolítica afecta al mecanismo de reparación en membrana muscular, incluso si la actividad de células satélite (núcleos del músculo) no se ve afectada (Hauerslev et al., 2012).

En 1995, Sorimachi y colaboradores, encontraron cuatro mRNA que codifican para calpaínas en el músculo de pechuga de pollo: *p94/CAPN3* (tejido específica), *CAPN1* y *CAPN2* (ubicuas), y una cuarta *CAPN* característica de aves, a la cual se le llamó  $\mu/m$ -calpaína (actualmente *CAPN1.5*). Ésta última, es sensible a concentraciones intermedias de calcio entre las calpaínas 1 y 2; desempeña un papel especial en el proceso *post mortem* en el músculo de pollo, que explica su rápida suavidad, en

comparación con otras especies (Lee et al., 2008). Posteriormente, en el pollo se identificaron estos mismos cuatro genes de la familia de las CAPNs que presentaron polimorfismos (*CAPN1*, *CAPN2*, *CAPN3* y *CAPN1.5*) (Okumura et al., 2005). Además, se han realizado algunos estudios para establecer la correlación entre el polimorfismo de un sólo nucleótido (SNP) de *CAPN1* y *CAPN3*, el sabor, la densidad de la fibra y la suavidad de la carne en el pollo (Zhang et al. 2007, 2008, 2009).

Se ha determinado la presencia de CAPN en *M. gallopavo* en pechuga de pavos de línea comercial, evaluando su actividad proteolítica dentro de las primeras 24 horas *post mortem* (Northcutt et al., 1998b). Sin embargo, hasta ahora no se han realizado estudios bioquímicos o moleculares de las CAPNs en guajolote doméstico de traspatio.

Recientemente se publicó la secuencia del genoma de *M. gallopavo* a partir de una hembra de una línea comercial, en el banco de datos internacional NCBI. Dentro de la información publicada, se cuenta con la secuencia del cromosoma 5 donde se ha localizado la posición de un gen similar a calpaína 3 (calpain-3-like) con un tamaño de 23,892 pb (No. de Acceso: LOC100546035). De acuerdo a un análisis de predicción mediante el software Ensembl genebuild, se estableció la secuencia de dos probables ARNm, (Números de Acceso: ENSMGAP00000012038 y ENSMGAP00000017351) que llevan una secuencia codificante similar a CAPN3 con un tamaño predicho de 2948 b y que codifican para 810 aa. Sin embargo, hasta ahora no se ha realizado el aislamiento y estudios de la calpaína 3 expresada en tejido muscular esquelético de *M. g. gallopavo*. Por otro lado, tampoco existen estudios para la identificación de polimorfismos tipo SNP que pudieran estar relacionados a la suavidad de la carne.

### III. JUSTIFICACIÓN.

Debido a su influencia potencial sobre el crecimiento del músculo y su papel en la organización miofibrilar, el gen *CAPN3* ha cobrado importancia como gen candidato para el diseño de esquemas de SAM o Selección Asistida por Genes (SAG). Sin embargo, gran parte de la información disponible acerca de éste gen proviene de estudios en humanos, ratones y otras especies de mamíferos, y podría no ser directamente aplicable a las aves de corral.

Por otro lado, las aproximaciones al estudio de las calpaínas en ganado se basan en la búsqueda de SNPs correlacionados con la calidad de la carne en el ganado (QTLs), incluyendo *Gallus gallus*. Sin embargo, este tipo de estudios no contempla el aislamiento y análisis de los genes candidatos, sino sólo el estudio de fragmentos de ADN (exones e intrones) amplificados a partir de los genes y su análisis para la búsqueda de SNPs, sin considerar los efectos de éstos cambios sobre el funcionamiento de las proteínas. A pesar de su importancia económica, para *M. gallopavo* no existe ningún estudio genético molecular, aunque se dispone de la secuencia genómica de un gen similar a calpaína 3 localizado en el cromosoma 5 de *Meleagris gallopavo* y del predicho la secuencia de dos ARN mensajeros. Se considera entonces, que la identificación, aislamiento y análisis del gen *CAPN3* de *M. gallopavo* contribuye al conocimiento básico y aporta información útil en futuros estudios de ese gen como candidato para SAG.

#### **IV. OBJETIVOS.**

##### **Objetivo general**

Caracterizar el gen de la calpaína 3 de *Meleagris gallopavo gallopavo*.

##### **Objetivos particulares**

- Identificar y aislar el ADNc de un gen que codifica para la calpaína 3 de *Meleagris gallopavo gallopavo* de traspatio de Michoacán.
- Realizar un análisis de comparación del ADNc del gen de calpaína 3 con las secuencias genómicas y del ARNm predicho reportados previamente para *Meleagris gallopavo gallopavo*.
- Realizar un análisis de comparación del ADNc de calpaína 3 con las secuencias de genes o proteínas de CAPN3 publicadas en bases de datos internacionales.

## **V. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **V.1. Material biológico**

Para la obtención de ARN total, se colectaron muestras biológicas de tejido de músculo esquelético (pechuga, muslo y pierna) de *M. g. gallopavo* (de un año de edad), del municipio de Huiramba, Michoacán, México. Para garantizar la integridad del ARN, se almacenaron las muestras en nitrógeno líquido y posteriormente a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta ser utilizadas.

### **V.2. Purificación de ARN total**

Se realizó extracción de ARN total de tejido, por el protocolo TRizol (Invitrogene), como se describe a continuación: Se tomó 100 mg de tejido y trituró en mortero con nitrógeno líquido, hasta formar un polvo fino y se colocó en un microtubo de 1.5 ml estéril previamente lavado con agua dietilpirocarbonada estéril ( $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ ), se adicionó 1 ml de TRizol (fenol e isotiocianato de guanidina) y se homogenizó, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, después se añadió 200  $\mu\text{l}$  de cloroformo, se agitó en vórtex durante 15 segundos, y se incubó de 2-3 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó la muestra a 12000 rpm durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo, se añadió 500  $\mu\text{l}$  de isopropanol absoluto, se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se recuperó la pastilla y se lavó con 1 ml de etanol al 75%, se centrifugó a 7500 rpm durante 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se secó la pastilla a temperatura ambiente durante 5-10 minutos, se resuspendió en 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$  mezclando por inversión, se incubó a  $55-60^{\circ}\text{C}$  durante 10-15 minutos y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Para revisar la integridad del ARN, la muestra se separó por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con Sybr Safe (Invitrogene), en TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8), con una corriente de 60 voltios (volts) durante 45 minutos. El gel fue visualizado en un fotodocumentador de luz UV (Logic 200, Imagin System) a 254 nm utilizando el software Kodak Gel Logic 2000. Se midió la concentración ARN purificado en un espectrofotómetro (BioPhotometer plus Eppendorf).

### V.3. Síntesis de ADNc y amplificación por RT-PCR

Se trató a la muestra con DNasa I (Invitrogene); se agregó a un microtubo de 0.2 ml estéril 1 µg de ARN total, 1 µl de buffer de reacción para DNasa I, 0.2 µl de DNasa I y H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> hasta un volumen total de 10 µl, se mezcló por inversión y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente. Para la inactivación de la reacción se adicionó 1 µl de EDTA 25 mM, se incubó a 65°C durante 10 minutos, se transfirió a hielo y se centrifugó brevemente.

Para la amplificación del gen de *CAPN3* se utilizó el kit de origen comercial SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity (Invitrogene). En un microtubo de 0.2 ml estéril, se preparó la siguiente mezcla de reacción: 1 µg de ARN total, 12.5 µl de reacción mix (buffer con 0.4 mM de cada dNTP, 2.4 mM de MgSO<sub>4</sub>), 1 µl (10 pmol) de cada oligonucleótido, 0.5 µl de enzima mix (SuperScript® III/ Platinum® Taq High Fidelity) y agua destilada, desionizada, estéril (H<sub>2</sub>O<sub>dde</sub>) hasta un volumen de 25 µl. El microtubo con la mezcla de reacción se incubó en un termociclador (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones; un ciclo de 60°C por 30 minutos y 94°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 15 minutos, alineamiento a 60°C por 30 segundos, y extensión 68°C por 3 minutos; y una extensión final de 68°C por 5 minutos.

Se diseñaron juegos de oligonucleótidos específicos con base en la secuencia del ARNm predicho para calpain-3-like (No. de Acceso: ENSMGAP00000012038) de *M. gallopavo* (Cuadro 1), mediante el software DNASTAR. Como control positivo se amplificó un fragmento de 876 pb del gen de la β-actina utilizando los oligonucleótidos directo 5'-ATGGTGGGAATGGGTCAGAA-3' y reverso 5'-TCGTACTCCTGCTTGCTGA-3', reportados previamente (Torner et. al., 1999).

Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% en buffer TAE 1X, teñido con Sybr Safe (Invitrogene), utilizando el marcador de tamaño molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogene), con una corriente de 70 volts durante 45 minutos. El gel fue visualizado y registrado en un

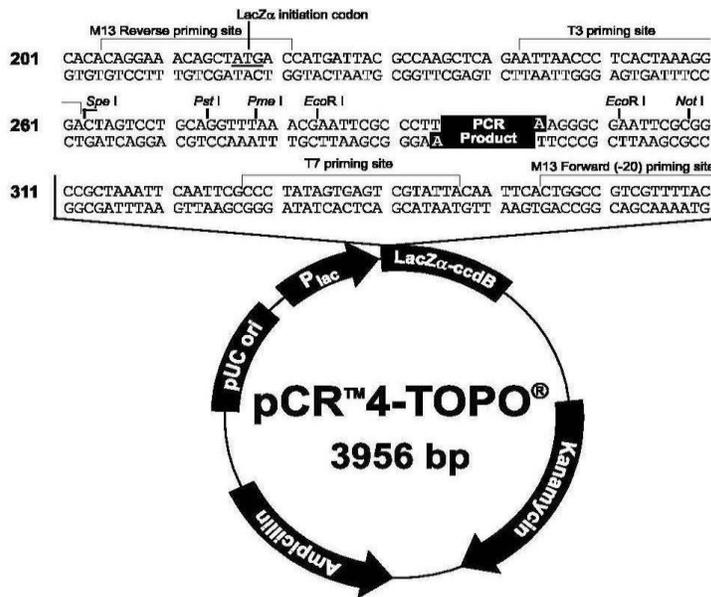
fotodocumentador de luz UV (Logic 200, Imagin System) a 254 nm utilizando el software Kodak Gel Logic 2000.

**Cuadro 1.** Oligonucleótidos utilizados para amplificar ADNc de CAPN3-like.

	Nombre	Secuencia	Tm (°C)	Fragmento esperado (pb)
Directo	PMgc3I-A	5´ CACACTGGGTCGGCACAC 3´	55.0 °C	1156
Directo	PMgc3I-B	5´ GAGAACTGAACTAGATGGGATTGT 3´	55.1 °C	1298
Reverso	PMgc3I-R	5´ GTAATTGGGGATCGATGGAGTTCA 3´	52.8 °C	927
Directo	PMgc3I-IF	5´ CGATGGAGGACTTCACTGGAGGAG 3´	57.9 °C	1013
Reverso	PMgc3I-IR	5´ CTGGTGGGGTTCGTATGTGGATG 3´	57.9 °C	1013
Directo	PMgc3I-DIF	5´ GAAAATCCGTCTGCAACACAAG 3´	53.9 °C	975
Reverso	PMgc3I-DIR	5´ GTCCATTCCACTCCACCTGTCC 3´	56.8 °C	782

#### V.4. Clonación de productos de amplificación

Los productos de amplificación se ligaron en el vector pCR<sup>TM</sup>4-TOPO (Invitrogene) (Fig. 8). En un tubo de 0.2 ml estéril se colocó 4 µl de producto de PCR fresco, 1 µl de solución de sales, vector 0.5 µl y H<sub>2</sub>O<sub>dde</sub> hasta un volumen final de 6 µl, se mezcló la reacción y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente (se puede conservar a -20°C).



**Figura 8.** Mapa del vector que muestra las características y la secuencia que rodea el sitio de clonación TOPO ®.

Para la transformación de la células, se adicionaron 2  $\mu$ l de la reacción de ligación a un microtubo con 50  $\mu$ l de células competentes de la cepa TOP10 de *E. coli* y se mezcló. En seguida, se incubó en hielo durante 30 minutos y después a 42°C durante 30 segundos e inmediatamente se transfirió a hielo. Se adicionaron 250  $\mu$ l de medio S.O.C. (2% triptona, 0.5% extracto de levadura, 0.42 mM NaCl, 0.1 mM KCl, 0.42mM MgCl<sub>2</sub>, 0.42 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.8 M dextrosa) y se incubó a 37°C durante una hora a 225 rpm en termomixer (Eppendorf Thermomixer). Finalmente, se espatuló las células transformantes en cajas Petri con medio LBA-Amp (1  $\mu$ l de ampicilina por 1 ml de medio) y se incubó a 37°C durante toda la noche (Incubator 1545 Shel Lab).

### V.5. Purificación de plásmidos recombinantes

Se seleccionaron las colonias transformantes, con un palillo estéril se transfirió a un tubo de ensaye de 15 ml con 2 ml de medio LB-Amp (2  $\mu$ l de ampicilina). Los cultivos se incubaron en una incubadora orbital (Lab.line Incubator-Sharker Orbit) durante toda la noche a 37°C y 150 rpm. La purificación de plásmidos recombinantes se realizó mediante el método Birnboim y Dolly (1979), como se describe a continuación: Se

centrifugó 1.5 ml del cultivo por 10 segundos a 13000 rpm y se descartó el sobrenadante conservando solo 50 µl para resuspender la pastilla, se añadió 150 µl de solución Birnboim I (Glucosa 50 mM, EDTA 10 mM y Tris-HCl 25 mM) y 300 µl de solución Birnboim II (NaOH 0.2 M, SDS 1%) y se agitó cuidadosamente. Posteriormente se añadió 300 µl de solución Birnboim III (acetato de sodio 3 M pH 5.2) y se mezcló por inversión, se añadió 300 µl de cloroformo mezclando en vórtex hasta observar la muestra color blanco, se centrifugó a 13000 rpm durante tres minutos y se transfirió la fase acuosa a un microtubo estéril de 1.5 ml. Se agregó 700 µl de isopropanol frío (-20°C), se mezcló y se centrifugó por 15 minutos a 12000 rpm, se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 750 µl de etanol al 70% frío (-20°C), se centrifugó tres minutos a 12000 rpm y se decantó el etanol, para después secar la pastilla durante 40 minutos en ultraconcentrador (Genevac), se resuspendió en 50 µl de H<sub>2</sub>O<sub>dde</sub>, y se agregó 1 µl de RNasa A (10 mg/ml), se incubó por una hora a 37 °C. Se revisó la integridad de los plásmidos por separación en electroforesis en gel de agarosa al 1.2% en TAE 1X, teñido con Sybr safe (Invitrogene), utilizando el marcador de tamaño molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogene), con una corriente de 70 volts durante 30 minutos. El gel fue visualizado y registrado en un fotodocumentador de luz UV (Logic 200, Imagin System) a 254 nm utilizando el software Kodak Gel Logic 2000.

Para liberar los insertos de los plásmidos se realizó digestión enzimática con la enzima *EcoRI* (Invitrogene). En una reacción con un volumen total de 10 µl, se agregó 8 µl de plásmido purificado, 1 µl de Buffer 10X, 0.5 µl de la enzima y 0.5 µl de H<sub>2</sub>O<sub>dde</sub>, se mezcló cuidadosamente y se incubó durante una hora a 37°C. Los productos de digestión se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.2 %, teñido con Sybr Safe, a 80 volts durante 45 minutos, utilizando el marcador de tamaño molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogene).

## **V.6. Limpieza de plásmidos con bromuro de etidio para secuenciación**

Para la secuenciación del ADN, se realizó la limpieza de los plásmidos recombinantes con insertos de tamaño esperado, mediante el método de Br.Et/sales (Stemmer, 1991). Se ajustó el volumen de cada muestra a 250 µl con H<sub>2</sub>O<sub>dde</sub>. Se

adicionaron 5 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml) y se mezcló perfectamente. Se agregó 140 µl de acetato de amonio (7.5 M) y 420 µl de Fenol/Cloroformo/Isoamílico (25:24:1), se mezcló y se centrifugó a 12000 rpm durante 2 minutos (Thermo). Se removió cuidadosamente la fase acuosa y se transfirió a un microtubo de 1.5 ml estéril, se adicionaron 800 µl de etanol absoluto frío (-20°C) y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó cinco minutos a 12000 rpm para precipitar el ADN y se lavó el precipitado con 300 µl de etanol al 70% frío (-20°C). Se decantó el sobrenadante conservando la pastilla y se secó en ultraconcentrador (Genevac). Se resuspendió la pastilla en 50 µl de H<sub>2</sub>O<sub>dde</sub>. Se revisó la integridad de los plásmidos en un gel de agarosa al 1% teñido con Sybr safe 1X (Invitrogen).

### **V.7. Secuenciación**

La secuenciación de los plásmidos se realizó por el método de dideoxy (Sanger et al., 1975), mediante el sistema comercial DNA Sequencing (BigDye v3.1 Terminador Cycle Sequencing Ready Reaction Applied Biosystems) a través del servicio comercial de Elim Biopharm y MacroGen, USA. Para la primera secuenciación se usó el juego de oligonucleótidos universales M13 y los oligonucleótidos específicos diseñados en este estudio, PMgc3I-A, PMgc3I-B y PMgc3I-R (Cuadro 1). Para la secuenciación del gen completo se utilizaron dos pares de oligonucleótidos específicos anidados, IF, IR, DIF y DIR, diseñados en este estudio con base en la secuencia obtenida inicialmente y la secuencia del ARN predicho.

### **V.8. Análisis de secuencias**

El análisis de las secuencias se llevó a cabo utilizando el programa en línea Blast, de banco de datos NCBI para una identificación preliminar de las secuencias. Para la identificación de plásmidos recombinantes por la digestión enzimática con *EcoRI*, se utilizó el software Codon Code Aligner. Para edición, alineamiento, ensamble de las secuencias se utilizó el software, BioEdit 7.09 y Clustal W; análisis filogenéticos, MEGA5.2, MrBayes v3.1., FigTree v1.4.0. y Dendroscope 3.2.10.; y para modelaje de la proteína y comparación de estructuras de proteínas, se utilizaron los software Swiss-

Model (Swiss-PdbViewer 4.1.0) (Guex y Peitsch, 1997). Además, para la predicción de la estructura secundaria se utilizó el software J pred (Cole et al., 2008).

El análisis filogenético de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos deducidos de *CAPN3* de éste estudio y las secuencias reportadas en base de datos se realizó bajo los criterios de Neighbor-joining (NJ), Máxima verosimilitud (ML) utilizando los modelos de evolución de GTR+G+I (General Time Reversible más Gamma distributed with Invariant sites) para las secuencias de nucleótidos, y el modelo JTT+G+I+F (Jones-Taylor-Thornton más Gamma distributed with Invariant sites with Frequences) para los aminoácidos, y bayesianos con valores de soporte generados con 100,000 repeticiones. En el cuadro 2 se indican las secuencias nucleotídicas y las secuencias de aminoácidos deducidos de *CAPN3* utilizadas en los análisis.

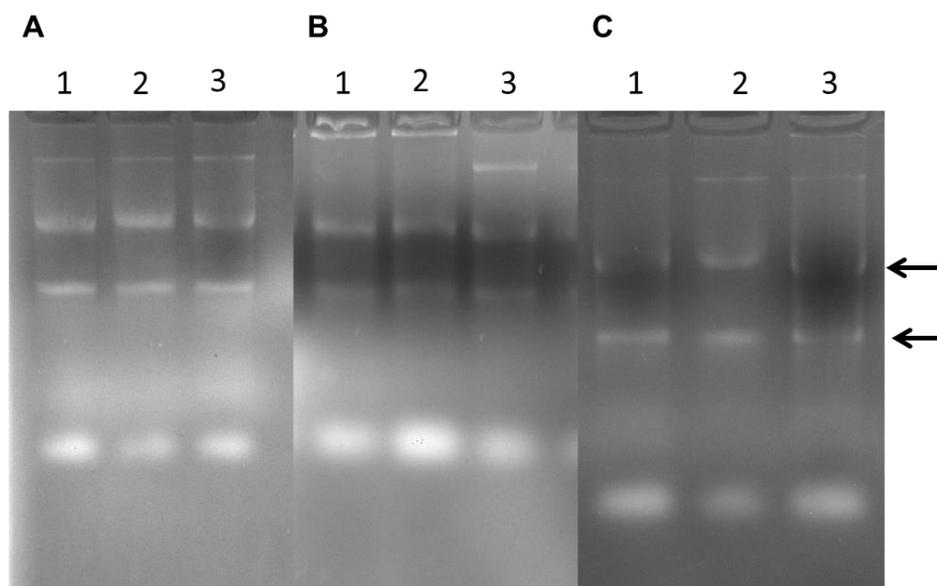
**Cuadro 2.** Secuencias de genes o proteínas de CAPN3 utilizadas para los análisis filogenéticos, reportadas en base de datos (NCBI).

Especie		No. De acceso
<i>Meleagris gallopavo</i>	calpaina-3-like predicho	XM_003206475.1
	calpaina 3 (p94)	NM_001004405.1
	CAPN3, raza Shandi Black-bone	FJ497056.1
<i>Gallus gallus</i>	CAPN3, raza Black-bone	FJ232591.1
	calpaina 3	ACL50974.1
	CAPN3	ACI95287.1
<i>Anas platyrhynchos</i>	calpaina 3	NP_001004405.1
	calpaina 3 (p94) predicho variante X1	XM_005021676.1
	calpaina 3 (p94) predicho variante X2	XM_005021677.1
	calpaina 3 (p94) predicho variante X3	XM_005021678.1
	calpaina 3 (p94) predicho variante X4	XM_005021679.1
	calpaina 3 (p94) predicho variante X5	XM_005021680.1
	calpaina 3 (p94) predicho variante X6	XM_005021681.1
	calpaina 3 (p94) predicho variante X7	XM_005021682.1
	calpaina 3 (p94) predicho variante X8	XR_217403.1
	calpaina 3 (p94) predicho variante X9	XR_217404.1
	calpaina 3 (p94) predicho variante X10	XR_217405.1
	calpaina 3 (p94) predicho variante X11	XR_217406.1
	calpaina 3, parcial	EOA99793.1
<i>Columba livia</i>	calpaina 3 (p94) predicho	XM_005502212.1
	calpaina 3	EMC83746.1
<i>Falco cherruq</i>	calpaina 3 (p94) predicho variante X1	XM_005441052.1
	calpaina 3 (p94) predicho variante X2	XM_005441053.1
	calpaina 3 (p94) predicho variante X3	XM_005441054.1
	calpaina 3 (p94) predicho variante X4	XM_005441055.1
<i>Falco peregrinus</i>	calpaina 3 (p94) predicho variante X1	XM_005243765.1
	calpaina 3 (p94) predicho variante X2	XM_005243766.1
	calpaina 3 (p94) predicho variante X3	XM_005243767.1
	calpaina 3 (p94) predicho variante X4	XM_005243768.1
<i>Melospittacus undulatus</i>	calpaina 3 (p94) predicho variante X1	XM_005143908.1
	calpaina 3 (p94) predicho variante X2	XM_005143909.1
	calpaina 3 (p94) predicho variante X3	XM_005143910.1
	calpaina 3 (p94) predicho variante X4	XM_005143911.1
<i>Zonotrichia albicollis</i>	calpaina 3 (p94) predicho variante X1	XM_005479996.1
	calpaina 3 (p94) predicho variante X2	XM_005479997.1
	calpaina 3 (p94) predicho variante X3	XM_005479998.1
<i>Geospiza fortis</i>	calpaina 3 (p94) predicho variante X1	XM_005419400.1
	calpaina 3 (p94) predicho variante X2	XM_005419401.1
	calpaina 3 (p94) predicho variante X3	XM_005419402.1
	calpaina 3 (p94) predicho variante X4	XM_005419403.1
	calpaina 3 (p94) predicho variante X5	XM_005419404.1
<i>Pseudopodoces humilis</i>	calpaina 3 (p94) predicho variante X1	XM_005522499.1
	calpaina 3 (p94) predicho variante X2	XM_005522500.1
<i>Ficedula albicollis</i>	calpaina 3 (p94) predicho variante X1	XM_005047007.1
	calpaina 3 (p94) predicho variante X2	XM_005047008.1
<i>Taeniopygia guttata</i>	calpaina 3 (p94) predicho variante 1	XM_002200309.1
<i>Chrysemys picta bellii</i>	calpaina 3 (p94) predicho	XM_005284611.1
<i>Xenopus tropicalis</i>	calpaina 3-like predicho variante X1	XM_002935335.2
	calpaina 3 predicho isoforma X2	XP_004917296.1
<i>Danio rerio</i>	calpaina 3b	NM_001243321.1
	calpaina 3	NP_001004571.1
	calpaina 3	ACY78226.1
<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	calpaina 3 (p94) predicho variante X1	XM_004687877.1
<i>Condylura cristata</i>	calpaina 3 (p94) predicho variante 1	XM_003756039.1
<i>Sarcophilus harrisii</i>	calpaina 3-like predicho	XM_001362793.1
<i>Monodelphis domestica</i>	calpaina 3 (p94) predicho variante 1	XM_003987244.1
<i>Felis catus</i>	calpaina 3 (p94) predicho variante X6	XM_005638296.1
	calpaina 3 predicho isoforma X2	XP_005638349.1
<i>Canis lupus familiaris</i>	calpaina 3 (p94) predicho variante X2	XM_004861642.1
<i>Heterocephalus glaber</i>	calpaina 3	EHB10342.1
<i>Dasyptes novemcinctus</i>	calpaina 3 (p94) predicho	XM_004481525.1
<i>Ochotona princeps</i>	calpaina 3 (p94) predicho variante X4	XM_004578148.1
	calpaina 3 predicho isoforma X1	XP_004578202.1
<i>Equus caballus</i>	calpaina 3 (p94) predicho variante X7	XM_005603111.1
	calpaina 3 predicho isoforma X1	XP_001503324.1
<i>Bos taurus</i>	calpaina 3 (p94) predicho variante X1	XM_005211549.1
	calpaina 3 (p94) predicho variante X5	XM_005211553.1
	calpaina 3 (p94)	AAI49198.1
<i>Bos grunniens</i>	calpaina 3	NP_776685.1
	calpaina 3	AFP73395.1
<i>Ovis aries</i>	calpaina 3 (p94)	NM_001009212.1
	calpaina 3	NP_001009212.1
<i>Sus scrofa</i>	calpaina 3	NM_214171.1
	calpaina 3	NP_999336.1
<i>Pan paniscus</i>	calpaina 3 predicho isoforma 1	XP_003805652.1
<i>Saimiri boliviensis boliviensis</i>	calpaina 3 predicho isoforma 1	XP_003929010.1
<i>Mustela putorius furo</i>	calpaina 3 predicho isoforma X2	XP_004751249.1
<i>Cricetulus griseus</i>	calpaina 3 predicho isoforma 3	XP_003498099.1
	calpaina 3 predicho isoforma 4	XP_003498100.1
<i>Pongo abelii</i>	calpaina 3 predicho isoforma 2	XP_002825393.1
<i>Ailurogalea melanoleuca</i>	calpaina 3-like predicho isoforma 1	XP_002913243.1
<i>Microtus ochrogaster</i>	calpaina 3 predicho isoforma X1	XP_005364361.1
<i>Odobenus rosmarus divergens</i>	calpaina 3 predicho isoforma 1	XP_004400444.1
<i>Macaca mulatta</i>	calpaina 3	EHH27247.1
<i>Papio anubis</i>	calpaina 3 predicho isoforma 1	XP_003900875.1
<i>Loxodonta africana</i>	calpaina 3 predicho isoforma 1	XP_003418723.1
<i>Trichechus manatus latirostris</i>	calpaina 3 predicho isoforma 1	XP_004380720.1
<i>Homo sapiens</i>	calpaina 3 predicho isoforma X1	XP_005254760.1
<i>Otlemur garnettii</i>	calpaina 3 predicho isoforma 2	XP_003791801.1
<i>Macaca fascicularis</i>	calpaina 3	EHH63011.1
<i>Echinops telfairi</i>	calpaina 3 predicho isoforma X1	XP_004709429.1
<i>Ictidomys tridecemlineatus</i>	calpaina 3 predicho isoforma X1	XP_005316513.1
<i>Orcinus orca</i>	calpaina 3 predicho isoforma 1	XP_004273997.1
<i>Capra hircus</i>	calpaina 3 predicho isoforma X2	XP_005685591.1
	calpaina 3 isoforma a	NP_031627.2
<i>Mus musculus</i>	calpaina 3	AAI39791.1
	calpaina 3 variante a	NM_007601.3

## VI. RESULTADOS.

### VI.1. Extracción de ARN total

Se obtuvo el ARN total del músculo esquelético de *M. gallopavo*. En la figura 9 se observan las bandas correspondientes a los ARN ribosomales 28S y 18S para los tres tejidos, lo cual indica que el ARN total extraído fué de buena calidad.



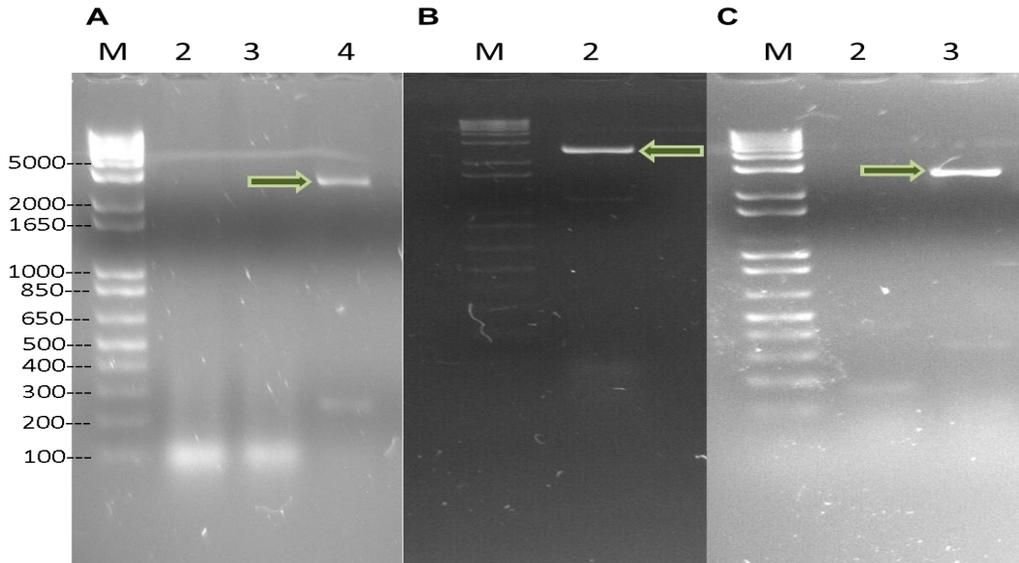
**Figura 9.** ARN extraídos de muestras de músculo esquelético de *M. gallopavo*. Gel de agarosa al 2% en TAE 1X, teñido con Sybr safe. A) Muslo, B) Pechuga, y C) Pierna.

### VI.2. Síntesis y clonación del ADNc de *CAPN3*

En la figura 10, se muestran los productos de amplificación obtenidos de las muestras de músculo esquelético de pierna, muslo y pechuga de *M. gallopavo*. Como se puede observar, para cada muestra de tejido se obtuvo un fragmento esperado de 2818 b de acuerdo al tamaño molecular del predicho calpaína 3-like.

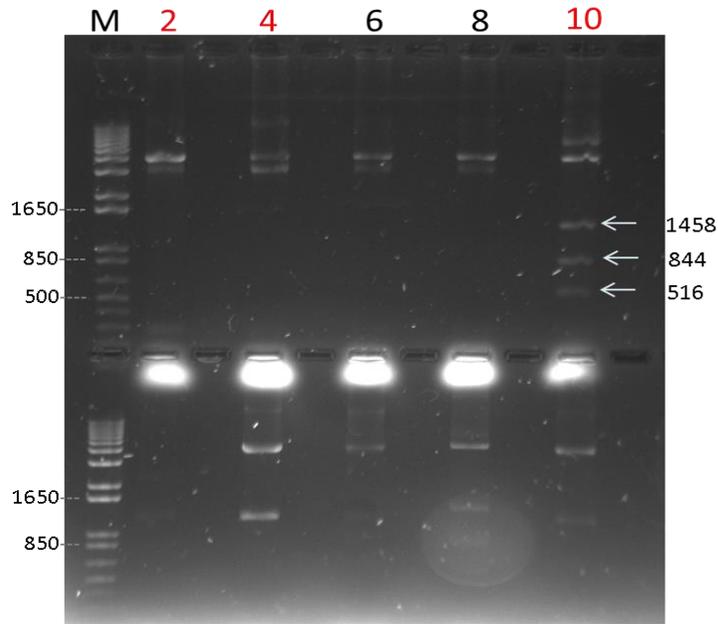
Los productos de amplificación se ligaron al vector de clonación pCR<sup>TM</sup>4-TOPO y se realizó la transformación de la cepa TOP10 de *E.coli* de acuerdo a la metodología ya descrita. Se aislaron 21 colonias transformantes de muslo y 29 colonias transformantes de pechuga, que fueron analizadas para la identificación de los probables insertos de

ADNc de *CAPN3*. Previamente se realizó un análisis de restricción de la secuencia del ARNm predicho de calpaína 3-like y se identificaron dos sitios de restricción para *EcoRI*, por lo cual se esperaba un patrón de restricción del inserto en tres fragmentos de 1458, 844 y 516 pb.

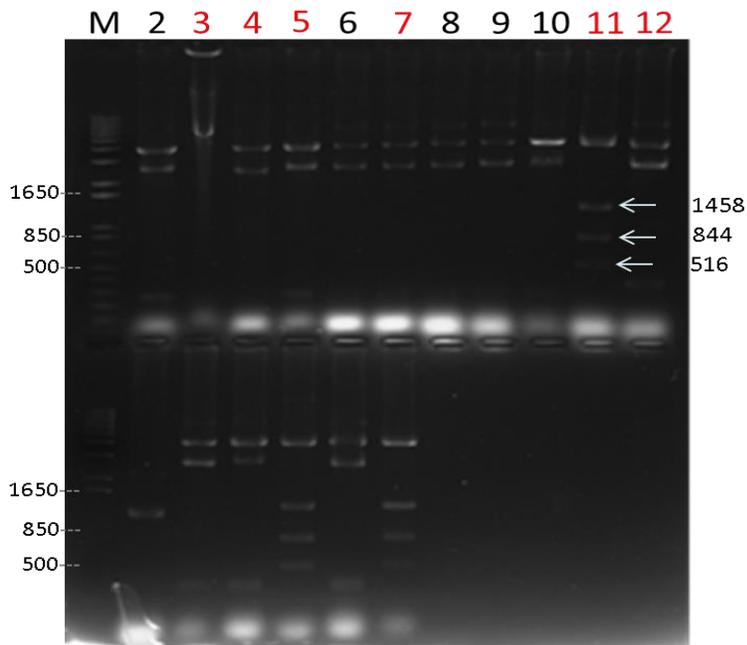


**Figura 10.** Productos de amplificación obtenidos de músculo esquelético de *M. gallopavo*. Gel de agarosa al 2% en TAE 1X, teñido con Syber Safe. A) Pierna, B) Pechuga, y C) Muslo. Carriles M, marcador de tamaño molecular 1 Kb DNA Plus Ladder; carriles 2, 3 y 4, producto de amplificación de aproximadamente 2818 b.

En las figuras 11 y 12 se muestran los patrones de digestión de los plásmidos recombinantes aislados, a partir de los cuales se identificaron y seleccionaron 3 de muslo y 7 de pechuga que presentaron un inserto con el patrón de restricción esperado.



**Figura 11.** Productos de la digestión enzimática de plásmidos recombinantes obtenidos de muslo de *M. gallopavo*. Gel de agarosa al 1.2% en TAE 1X, teñido con Syber Safe. Carril M, marcador de tamaño molecular 1 Kb DNA Plus Ladder; carriles 2, 4 y 10, plásmidos seleccionados para secuenciar. Con las flechas se indican los productos de restricción con *EcoRI*.



**Figura 12.** Productos de la digestión enzimática de plásmidos recombinantes obtenidos de pechuga de *M. gallopavo*. Gel de agarosa al 1.2% en TAE 1X, teñido con Syber Safe. Carril M, marcador de tamaño molecular 1 Kb DNA Plus Ladder; carriles que presentaron los tres

fragmentos y carriles 3, 4, 5 y 12, plásmidos seleccionados para secuenciar. Con las flechas se indican los productos de restricción con *EcoRI*.

### **VI.3. Análisis de la secuencia del ADNc de *CAPN3***

El análisis de comparación de las secuencias de los insertos en los plásmidos recombinantes BRPe62 (aislado de pechuga) y BRM61 (aislado de muslo) mostró 100% de identidad entre ellos, y la comparación con las bases de datos internacionales (NCBI), mostró identidad de 99% con el ARNm predicho de calpaína 3-like de *M. gallopavo*, 97% con el ARNm de *CAPN3* de *Gallus gallus* y 77% con el de *Mus musculus* (Cuadro 3). Cabe destacar, que la mayoría de las secuencias reportadas en base de datos son ARNm predichos obtenidos a partir de las secuencias genómicas. La secuencia del ADNc de *CAPN3* de éste estudio mostró dos transiciones, T/C en el sitio 1281 pb y A/G en el sitio 1707 pb, respecto al predicho de calpaína 3-like.

La comparación de la secuencia de aminoácidos deducidos de *CAPN3* con las secuencias reportadas en bases de datos del NCBI, mostró porcentajes de identidad en un rango de 98% con *G. gallus* a 77% con el de *M. musculus* (Cuadro 3).

El ADNc completo del gen de *CAPN3* de *M. gallopavo*, presentó un tamaño de 2586 pb con un marco de lectura de 810 aminoácidos (Fig. 13), un UTR 5´ de 138 pb y un UTR 3´ de 15 pb. La comparación de la secuencia de aminoácidos deducida del ADNc de *CAPN3* con la secuencia del predicho de calpaína 3-like mostró 99% de identidad con cambios en la posiciones 330 (Ser/Pro) y 472 (Ser/Gly). Para corroborar éste cambio, se secuenció dos veces en ambas cadenas.

**Cuadro 3.** Comparación de secuencias de nucleótidos y secuencias de aminoácidos deducidos del gen de *CAPN3*, reportadas en base de datos (NCBI).

Especie		Identidad	No. De acceso
<i>Meleagris gallopavo</i>	calpaina-3-like predicho	99%	XM_003206475.1
<i>Gallus gallus</i>	calpaina 3	97%	FJ232591.1
	calpaina 3	98%	ACL50974.1
<i>Anas platyrhynchos</i>	calpaina 3 (p94) predicho variante X2	92%	XM_005021677.1
<i>Columba livia</i>	calpaina 3 (p94) predicho	92%	XM_005502212.1
<i>Pseudopodoces humilis</i>	calpaina 3, predicho isoforma X1	92%	XP_005522556.1
<i>Falco cherruq</i>	calpaina 3 (p94) predicho variante X1	91%	XM_005441052.1
<i>Melopsittacus undulatus</i>	calpaina 3 (p94) predicho variante X1	91%	XM_005143908.1
<i>Zonotrichia albicollis</i>	calpaina 3 (p94) predicho variante X2	90%	XM_005479997.1
<i>Geospiza fortis</i>	calpaina 3 (p94) predicho variante X1	89%	XM_005419400.1
<i>Ficedula albicollis</i>	calpaina 3 (p94) predicho variante X1	89%	XM_005047007.1
<i>Taeniopygia guttata</i>	calpaina 3 (p94) predicho variante 1	89%	XM_002200309.1
<i>Chrysemys picta bellii</i>	calpaina 3 (p94) predicho	84%	XM_005284611.1
<i>Mus musculus</i>	calpaina 3	77%	AAI39791.1
	calpaina 3 variante a	77%	NM_007601.3

```

MPSAINPAVAQQTAAGSVSSTTSTTTEGTGGGTGGIYSALISRNQPIIKVKEKTYEELHKKC
LEKNILYEDPDFPPNETSLFYQKVPKFEWKPREICENPRFIIGGANRTDICQGELGDC
WFLAAIACLT LNKKLLCRVIPHDQSFQNYAGIFHFQFWRYGDWVDVIIDDCLPTYNNQLV
FTKSSQRNEFW SALLEKAYAKLHGSYEALKGGNTTEAMEDFTGGVTEFYEIKDAPKDIYK
IMKHAIARGSLMASSIDN LGFSYGAAPRSDIGEMIARMVKNLENAQMTHTPTVDHGGTD
ERPAWTIMPMQYETRMSCGLVKGHAYPVTAVEETT FKG EKIRLIRLRNPWGQVEWNGP
WSDKSEEWNFIEKEEEKIRLQHKILEDFWISFEDFMRHFTKLEICNLTPDTLEADKLQTW
TVSVNEGRWVRGCSAGGCRNYPDTFWTNPQYRLKLL EEDDDPEDEEVICGFLVALMQK
NRRKERKLGANLYTIGFAIYEVPKEMHGT KHHLQKDFFLYNASKARSKTYINMREISERFR
LPPSEYVII PSTYEPHQEGEFILRVFSEKRSLSEVENMIEADRPSKKKKKGKPIIFVSDRAN
SNKELTTDEDAGKDGEKTHVDEK KRSSAKAREKSEETQFRNIFRQIAGDDMEINAEELR
NVLNNVVKHKHDLKTEGFELESCRS MIALMDTDGSGKINFDEFRLWWDKIKSWQKIFKHY
DADHSGTINSYEMRNAVKDAGFRLNNQLYDIITMRYADKNMNI DFDSFICCFVRLDAMFR
AFHAFDKDGDGIIKLNVLWLQLTMYA

```

**Figura 13.** Secuencia de aminoácidos deducidos de *CAPN3* de *M. g. gallopavo*.

El análisis de alineamiento clustal a nivel de aminoácidos con secuencias deducidas a partir del gen *CAPN3*, obtenidas en base de datos, permitió la identificación de los dominios conservados, así como los aminoácidos que conforman el sitio catalítico (Fig. 14). Los dominios identificados en la secuencia son, dominio CysPc, dominio C2L y dominio EF-hand, y por ende IS1 e IS2. Dentro del dominio CysPc, el

residuo de Cys (C) está en la posición 123, la His (H) en la posición 327 y Asn (N) en la posición 351. Además de los cambios antes mencionados, Ser/Pro<sup>330</sup> y Ser/Gly<sup>472</sup>.

```

Ficedula      MPTAINAAVARQQAAG ---- SVPS ---- ATIG-TTEGAGGGTAGIYSAIIS 42
P.humilis    MPTAINAAVAQQTAAG ---- SVPS ---- ATIG-TTEGAGGGTGGIYSAIIS 42
Geospiza     MPTAINAAVAQRQAAG ---- SVPS ---- TTAG-TTEGAGGGTGGIYSAIIS 42
Z.albicollis MPTAINAVVAQQTAAG ---- SVPS ---- STAG-TTEGAGGGTGGIYSAIIS 42
T.guttata    MPTAINAVVAQQTAAG ---- SVPS ---- TAAG-TTEGAGGGTGGIYSAIIS 42
Falco        MPTAINAAVAQQTAAG ---- SVPS ---- ATISTTTTEGVGGGTGGIYSAIIS 43
F.cherrug    MPTAINAAVAQQTAAG ---- SVPS ---- ATISTTTTEGVGGGTGGIYSAIIS 43
Columba      MPTAINAVVAQQTAAG ---- SVPS ---- PATSTTTTEGAGGGTGGIYSAIIS 43
Meleagris    MPTAINAAVAQQTAAG ---- SVS ---- STSTTTTEGTGGGTGGIYSAIIS 42
Gallus       MPTAINAAVAQQTAAG ---- SVP ---- STSTTTTEGTGGGTGGIYSAIIS 42
Anas         MPTAINAAVAQQTAAG ---- SVPS ---- ATVSTTTTEGTGGGTGGIYSAIIS 43
M.undulatus  MPTAINAAVAQQTAAG ---- SVPS ---- AISTTTTEGAGGGTGGIYSAIIS 43
Chrysemys    MPTAINAVVAQQTETG ---- SVPS ---- TNIS-TTATTEGGSGGIYSAIIS 42
Ovis         MPTVISASVAPRTGAEPRSP --- GPLA ---- QAAQKGTTEAGGGNPSGIYSAIIS 48
B.taurus     MPTVISASVAPRTGAEPRSP --- GPLA ---- QAAQKGTTEAGGGNPSGIYSAIIS 48
S.scrofa     MPTVISASMAPRTGAS-QVP --- RTMP ---- QAAQKGTTEAGVGNPGGKYSAIIS 47
Equus        MPTVISASVASRTGAEPRSP --- GPVA ---- HPAQSTTEGGGNPSGNYSAIIS 48
Mus          MPTVISPTVAPRTGAEPRSP --- GPVP ---- HPAQKTEAGGGHPSGIYSAIIS 48
H.sapiens    MPTVISASVAPRTGAEPRSP --- GPVP ---- HPAQKATEAGGGNPSGIYSAIIS 48
Xenopus      MPSEILPEQAQKTESG ---- GPV ---- SAVTGGASDGAAPG-GGIYSAIIS 39
Danio        MPYTPSGFFCDRLIRE ---- --- RRRRDGEGSLKPIRF 32
Hippoglossus MEDKTHEGKVLVEDT ---- --- QVKVLHETBASHGDDKADYBPVGANSIYSALIS 50

```

```

Ficedula      RNQPIISTK-EKTYEELHKKCLEKNIYEDPDFPNNESSLFYSQ --- SEVFEWMP 96
P.humilis    RNQPIISVK-EKTYEELHKKCLEKNVYEDPDFPNNESSLFYSQ --- SEVFEWMP 96
Geospiza     RNQPIIHVK-EKTYEELHKKCLEKNIYEDPDFPNNESSLFYSQ --- SEVFEWMP 96
Z.albicollis RNQPIIHVK-EKTYEELHKKCLEKNIYEDPDFPNNESSLFYSQ --- SEVFEWMP 96
T.guttata    RNQPIIHVK-EKTYEELHKKCLEKNIYEDPDFPNNESSLFYSQ --- SEVFEWMP 96
Falco        RNQPIIKVK-QKTYEDLHKACLEKNIYEDPDFPNNESSLFYSQ --- IPIFEWMP 97
F.cherrug    RNQPIIKVK-QKTYEDLHKACLEKNIYEDPDFPNNESSLFYSQ --- IPIFEWMP 97
Columba      RNQPIIRVN-EKTYEELHKKCLEKNIYEDPDFPNNESSLFYSQ --- IPIFEWMP 97
Meleagris    RNQPIIKVK-EKTYEELHKKCLEKNIYEDPDFPNNESSLFYSQ --- VPIFEWMP 96
Gallus       RNQPIIKVK-EKTYEELHKKCLEKNIYEDPDFPNNESSLFYSQ --- VPIFEWMP 96
Anas         RNQPIIKVK-EKTYEELHKKCLEKNIYEDPDFPNNESSLFYSQ --- IPIFEWMP 97
M.undulatus  RNQPIIRVK-EKTYEELHKKCLEKNIYEDPDFPNNESSLFYSQ --- IPIFEWMP 97
Chrysemys    RNQPIIGVR-EKTFEELYKCKLEKNIYEDPDFPNNESSLFYSQ --- LPIFEWMP 96
Ovis         RNFPPIIGVK-EKTFEQLHKKCLEKNIYEDPDFPNNESSLFYSQ --- FPIQFVMP 102
B.taurus     RNFPPIIGVK-EKTFEQLHKKCLEKNIYEDPDFPNNESSLFYSQ --- FPIQFVMP 102
S.scrofa     RNFPPIIGVK-EKTFEQLHKKCLEKNIYEDPDFPNNESSLFYSQ --- FPIQFVMP 102
Equus        RNFPPIIGVK-EKTFEQLHKKCLEKNIYEDPDFPNNESSLFYSQ --- FPIQFVMP 102
Mus          RNFPPIIGVK-EKTFEQLHKKCLEKNIYEDPDFPNNESSLFYSQ --- FPIQFVMP 102
H.sapiens    RNFPPIIGVK-EKTFEQLHKKCLEKNIYEDPDFPNNESSLFYSQ --- FPIQFVMP 102
Xenopus      RNLPIIGGR-EKTFEELHKKCLEKNIYEDPDFPNNESSLFYSQ --- FPIFEWMP 93
Danio        SGQ-----DYTLKQBYLQKKTPEDETEPATVDSIGYELGHNSVANIWMVMP 83
Hippoglossus RNEAVKDAKRLKTFLELRDKYLKRVLEDELEFANDSSLFYSQ --- PSMLEWMP 105

```

```

Ficedula      EICENPFIIGGANTDICQBELGNCWFLAAIACLTLNALLC VIPHQDSFIQNYAGI 156
P.humilis    EICENPFIIGGANTDICQBELGNCWFLAAIACLTLNALLC VIPHQDSFIQNYAGI 156
Geospiza     EICENPFIIGGANTDICQBELGNCWFLAAIACLTLNALLC VIPHQDSFIQNYAGI 156
Z.albicollis EICENPFIIGGANTDICQBELGNCWFLAAIACLTLNALLC VIPHQDSFIQNYAGI 156
T.guttata    EICENPFIIGGANTDICQBELGNCWFLAAIACLTLNALLC VIPHQDSFIQNYAGI 156
Falco        HEICENPFIIGGANTDICQBELGNCWFLAAIACLTLNALLC VIPHQDSFIQNYAGI 157
F.cherrug    HEICENPFIIGGANTDICQBELGNCWFLAAIACLTLNALLC VIPHQDSFIQNYAGI 157
Columba      EICENPFIIGGANTDICQBELGNCWFLAAIACLTLNALLC VIPHQDSFIQNYAGI 157
Meleagris    EICENPFIIGGANTDICQBELGNCWFLAAIACLTLNALLC VIPHQDSFIQNYAGI 156
Gallus       EICENPFIIGGANTDICQBELGNCWFLAAIACLTLNALLC VIPHQDSFIQNYAGI 156
Anas         EICENPFIIGGANTDICQBELGNCWFLAAIACLTLNALLC VIPHQDSFIQNYAGI 157
M.undulatus  EICENPFIIGGANTDICQBELGNCWFLAAIACLTLNALLC VIPHQDSFIQNYAGI 157
Chrysemys    TEICENPFIIGGANTDICQBELGNCWFLAAIACLTLNALLC VIPHQDSFIQNYAGI 156
Ovis         PEICENPFIIGGANTDICQBELGNCWFLAAIACLTLNALLC VIPHQDSFIQNYAGI 162
B.taurus     PEICENPFIIGGANTDICQBELGNCWFLAAIACLTLNALLC VIPHQDSFIQNYAGI 162
S.scrofa     PEICENPFIIGGANTDICQBELGNCWFLAAIACLTLNALLC VIPHQDSFIQNYAGI 161
Equus        PEICENPFIIGGANTDICQBELGNCWFLAAIACLTLNALLC VIPHQDSFIQNYAGI 162
Mus          PEICENPFIIGGANTDICQBELGNCWFLAAIACLTLNALLC VIPHQDSFIQNYAGI 162
H.sapiens    PEICENPFIIGGANTDICQBELGNCWFLAAIACLTLNALLC VIPHQDSFIQNYAGI 162
Xenopus      PEICENPFIIGGANTDICQBELGNCWFLAAIACLTLNALLC VIPHQDSFIQNYAGI 153
Danio        EICDNPQFIVGGAS TDICQBELGNCWLLAAIACLTLNALLC VIPHQDSFIQNYAGI 143
Hippoglossus SEICDNPQFIVGGAS TDICQBELGNCWLLAAIACLTLNALLC VIPHQDSFIQNYAGI 165

```

```

Ficedula      FHFQFWYGDWVDVVIDDCLPTXNNQLVFTSSQ NEFWSALLE AYA LHGSYEALGG 216
P.humilis    FHFQFWYGDWVDVVIDDCLPTXNNQLVFTSSQ NEFWSALLE AYA LHGSYEALGG 216
Geospiza     FHFQFWYGDWVDVVIDDCLPTXNNQLVFTSSQ NEFWSALLE AYA LHGSYEALGG 216
Z.albicollis FHFQFWYGDWVDVVIDDCLPTXNNQLVFTSSQ NEFWSALLE AYA LHGSYEALGG 216
T.guttata    FHFQFWYGDWVDVVIDDCLPTXNNQLVFTSSQ NEFWSALLE AYA LHGSYEALGG 216
Falco        FHFQFWYGDWVDVVIDDCLPTXNNQLVFTSSQ NEFWSALLE AYA LHGSYEALGG 217
F.cherrug    FHFQFWYGDWVDVVIDDCLPTXNNQLVFTSSQ NEFWSALLE AYA LHGSYEALGG 217
Columba      FHFQFWYGDWVDVVIDDCLPTXNNQLVFTSSQ NEFWSALLE AYA LHGSYEALGG 217
Meleagris    FHFQFWYGDWVDVVIDDCLPTXNNQLVFTSSQ NEFWSALLE AYA LHGSYEALGG 216
Gallus       FHFQFWYGDWVDVVIDDCLPTXNNQLVFTSSQ NEFWSALLE AYA LHGSYEALGG 216
Anas         FHFQFWYGDWVDVVIDDCLPTXNNQLVFTSSQ NEFWSALLE AYA LHGSYEALGG 217
M.undulatus  FHFQFWYGDWVDVVIDDCLPTXNNQLVFTSSQ NEFWSALLE AYA LHGSYEALGG 217
Chrysemys    FHFQFWYGDWVDVVIDDCLPTXNNQLVFTSSQ NEFWSALLE AYA LHGSYEALGG 216
Ovis         FHFQFWYGDWVDVVIDDCLPTXNNQLVFTSSQ NEFWSALLE AYA LHGSYEALGG 222
B.taurus     FHFQFWYGDWVDVVIDDCLPTXNNQLVFTSSQ NEFWSALLE AYA LHGSYEALGG 222
S.scrofa     FHFQFWYGDWVDVVIDDCLPTXNNQLVFTSSQ NEFWSALLE AYA LHGSYEALGG 221
Equus        FHFQFWYGDWVDVVIDDCLPTXNNQLVFTSSQ NEFWSALLE AYA LHGSYEALGG 222
Mus          FHFQFWYGDWVDVVIDDCLPTXNNQLVFTSSQ NEFWSALLE AYA LHGSYEALGG 222
H.sapiens    FHFQFWYGDWVDVVIDDCLPTXNNQLVFTSSQ NEFWSALLE AYA LHGSYEALGG 222
Xenopus      FHFQFWYGDWVDVVIDDCLPTXNNQLVFTSSQ NEFWSALLE AYA LHGSYEALGG 213
Danio        FHFQFWYGDWVDVVIDDCLPTXNNQLVFTSSQ NEFWSALLE AYA LHGSYEALGG 203
Hippoglossus FHFQFWYGDWVDVVIDDCLPTXNNQLVFTSSQ NEFWSALLE AYA LHGSYEALGG 225

```

Ficedula	NNTEAMEDFTGGVTEFFYEIDAPDIYIMHAIDGSLMASSIDDDLGFYGSAPNTD	275
P.humilis	NNTEAMEDFTGGVTEFFYEIDAPDIYIMHAIDGSLMASSIDDDLGFYGSAPNSN	275
Geospiza	NNTEAMEDFTGGVTEFFYEIDAPDIYIMHAIDGSLMASSIDDDLGFYGSAPNSN	275
Z.albicollis	NNTEAMEDFTGGVTEFFYEIDAPDIYIMHAIDGSLMASSIDDDLGFYGSAPNSN	275
T.guttata	NNTEAMEDFTGGVTEFFYEIDAPDIYIMHAIDGSLMASSIDDDLGFYGSAPNSN	275
Falco	NNTEAMEDFTGGVTEFFYEIDAPDIYIMHAIDGSLMASSIDDDLGFYGSAPNSN	276
F.Cherrug	NNTEAMEDFTGGVTEFFYEIDAPDIYIMHAIDGSLMASSIDDDLGFYGSAPNSN	276
Columba	NNTEAMEDFTGGVTEFFYEIDAPDIYIMHAIDGSLMASSIDDDLGFYGSAPNSD	276
Meleagris	NNTEAMEDFTGGVTEFFYEIDAPDIYIMHAIDGSLMASSIDDDLGFYGSAPNSD	275
Gallus	NNTEAMEDFTGGVTEFFYEIDAPDIYIMHAIDGSLMASSIDDDLGFYGSAPNSD	275
Anas	NNTEAMEDFTGGVTEFFYEIDAPDIYIMHAIDGSLMASSIDDDLGFYGSAPNSD	276
M.undulatus	NNTEAMEDFTGGVTEFFYEIDAPDIYIMHAIDGSLMASSIDDDLGFYGSAPNSD	276
Chrysemys	NNTEAMEDFTGGVTEFFYEIDAPDIYIMHAIDGSLMASSIDDDLGFYGSAPNSD	275
Ovis	NNTEAMEDFTGGVTEFFYEIDAPDIYIMHAIDGSLMASSIDDDLGFYGSAPNSD	282
B.taurus	NNTEAMEDFTGGVTEFFYEIDAPDIYIMHAIDGSLMASSIDDDLGFYGSAPNSD	282
S.scrofa	NNTEAMEDFTGGVTEFFYEIDAPDIYIMHAIDGSLMASSIDDDLGFYGSAPNSD	281
Equus	NNTEAMEDFTGGVTEFFYEIDAPDIYIMHAIDGSLMASSIDDDLGFYGSAPNSD	282
Mus	NNTEAMEDFTGGVTEFFYEIDAPDIYIMHAIDGSLMASSIDDDLGFYGSAPNSD	282
H.sapiens	NNTEAMEDFTGGVTEFFYEIDAPDIYIMHAIDGSLMASSIDDDLGFYGSAPNSD	282
Xenopus	NNTEAMEDFTGGVTEFFYEIDAPDIYIMHAIDGSLMASSIDDDLGFYGSAPNSD	272
Danio	NTAEGMEDFTGGVTEFFYEIDAPDIYIMQALEGSLMGCSID	248
Hippoglossus	NTEAMEDFTGGVTEFFYEIDAPDIYIMQALEGSLMGCSID	270

Ficedula	IGELIA MVNQNENAQMPTQSTVDYQGM EEPAWTIVPMQYET MSCGLVGHAYSVTAV	334
P.humilis	IGELIA MVNQNENAQMPTQSTVDYQGM EEPAWTIVPMQYET MSCGLVGHAYSVTAV	334
Geospiza	IGELIA MVNQNENAQMPTQSTVDYQGM EEPAWTIVPMQYET MSCGLVGHAYSVTAV	334
Z.albicollis	IGELIA MVNQNENAQMPTQSTVDYQGM EEPAWTIVPMQYET MSCGLVGHAYSVTAV	334
T.guttata	IGELIA MVNQNENAQMPTQSTVDYQGM EEPAWTIVPMQYET MSCGLVGHAYSVTAV	334
Falco	IGELIA MVNQNENAQMTHSTIDYHGT DEEPAWTIVPMQYET MSCGLVGHAYSVTAV	335
F.Cherrug	IGELIA MVNQNENAQMTHSTIDYHGT DEEPAWTIVPMQYET MSCGLVGHAYSVTAV	335
Columba	IGELIA MVNQNENAQMTHPTVDYQGT DEEPAWTIVPMQYET MSCGLVGHAYSVTAV	335
Meleagris	IGEMIA MVNQNENAQMTHPTVDHGGT DEEPAWTIVPMQYET MSCGLVGHAYSVTAV	334
Gallus	IGELIA MVNQNENAQMTHPTVDYQGT DEEPAWTIVPMQYET MSCGLVGHAYSVTAV	334
Anas	IGEMIA MVNQNENAQMTHPTVDYQGT DEEPAWTIVPMQYET MSCGLVGHAYSVTAV	335
M.undulatus	IGELIA MVNQNENASQMSYPTVDYQAT DEEPAWTIVPMQYET MSCGLVGHAYSVTAV	335
Chrysemys	IGELIA MVNQNENASMP TDSLDLDFQVSEEPAWTIVPMQYET MSCGLVGHAYSVTAV	334
Ovis	MGELIE MVNQNENASLL DSDLLIFEGCSDDPEPT TIVPVQYET MACGLVGHAYSVTGL	342
B.taurus	MGELIE MVNQNENASLL DSDLLIFEGCSDDPEPT TIVPVQYET MACGLVGHAYSVTGL	342
S.scrofa	MGDLIA MVNQNENASLL DSDLLIFEGCSDDPEPT TIVPVQYET MACGLVGHAYSVTGL	341
Equus	MGDLIA MVNQNENASLL DSDLLIFEGCSDDPEPT TIVPVQYET MACGLVGHAYSVTGL	341
Mus	MGELIA MVNQNENASLL DSDLLIFEGCSDDPEPT TIVPVQYET MACGLVGHAYSVTGL	341
H.sapiens	MGELIA MVNQNENASLL DSDLLIFEGCSDDPEPT TIVPVQYET MACGLVGHAYSVTGL	341
Xenopus	MEDAIM MIESVGDTE P DTNNGGQ PEPVATLVVQLET MANGLVGHAYSVTGV	328
Danio		324
Hippoglossus		296

Ficedula	EETVFGEK ILLV LNPWGQVWNGAWSDESEVWDSVNEAEETLQYVVEDGEF	391
P.humilis	EETVFGEK ILLV LNPWGQVWNGAWSDESEVWDSVNEAEETLQYVVEDGEF	391
Geospiza	EETVFGEK ILLV LNPWGQVWNGAWSDESEVWDSVNEAEETLQYVVEDGEF	391
Z.albicollis	EETVFGEK ILLV LNPWGQVWNGAWSDESEVWDSVNEAEETLQYVVEDGEF	391
T.guttata	EETVFGEK ILLV LNPWGQVWNGAWSDESEVWDSVNEAEETLQYVVEDGEF	391
Falco	EETVFGEK ILLV LNPWGQVWNGAWSDESEVWDSVNEAEETLQYVVEDGEF	392
F.Cherrug	EETVFGEK ILLV LNPWGQVWNGAWSDESEVWDSVNEAEETLQYVVEDGEF	392
Columba	EETTFGEK ILLV LNPWGQVWNGAWSDESEVWDSVNEAEETLQYVVEDGEF	392
Meleagris	EETTFGEK ILLV LNPWGQVWNGAWSDESEVWDSVNEAEETLQYVVEDGEF	391
Gallus	EETTYGEK ILLV LNPWGQVWNGAWSDESEVWDSVNEAEETLQYVVEDGEF	391
Anas	EETTFGEK ILLV LNPWGQVWNGAWSDESEVWDSVNEAEETLQYVVEDGEF	392
M.undulatus	EETTFGEK ILLV LNPWGQVWNGAWSDESEVWDSVNEAEETLQYVVEDGEF	392
Chrysemys	EETTFGEK ILLV LNPWGQVWNGAWSDESEVWDSVNEAEETLQYVVEDGEF	391
Ovis	EETTFGEK ILLV LNPWGQVWNGAWSDESEVWDSVNEAEETLQYVVEDGEF	399
B.taurus	EETTFGEK ILLV LNPWGQVWNGAWSDESEVWDSVNEAEETLQYVVEDGEF	399
S.scrofa	EETTFGEK ILLV LNPWGQVWNGAWSDESEVWDSVNEAEETLQYVVEDGEF	398
Equus	EETTFGEK ILLV LNPWGQVWNGAWSDESEVWDSVNEAEETLQYVVEDGEF	398
Mus	EETTFGEK ILLV LNPWGQVWNGAWSDESEVWDSVNEAEETLQYVVEDGEF	398
H.sapiens	EETTFGEK ILLV LNPWGQVWNGAWSDESEVWDSVNEAEETLQYVVEDGEF	398
Xenopus	EETTFGEK ILLV LNPWGQVWNGAWSDESEVWDSVNEAEETLQYVVEDGEF	385
Danio	EETTFGEK ILLV LNPWGQVWNGAWSDESEVWDSVNEAEETLQYVVEDGEF	334
Hippoglossus	EETTFGEK ILLV LNPWGQVWNGAWSDESEVWDSVNEAEETLQYVVEDGEF	355

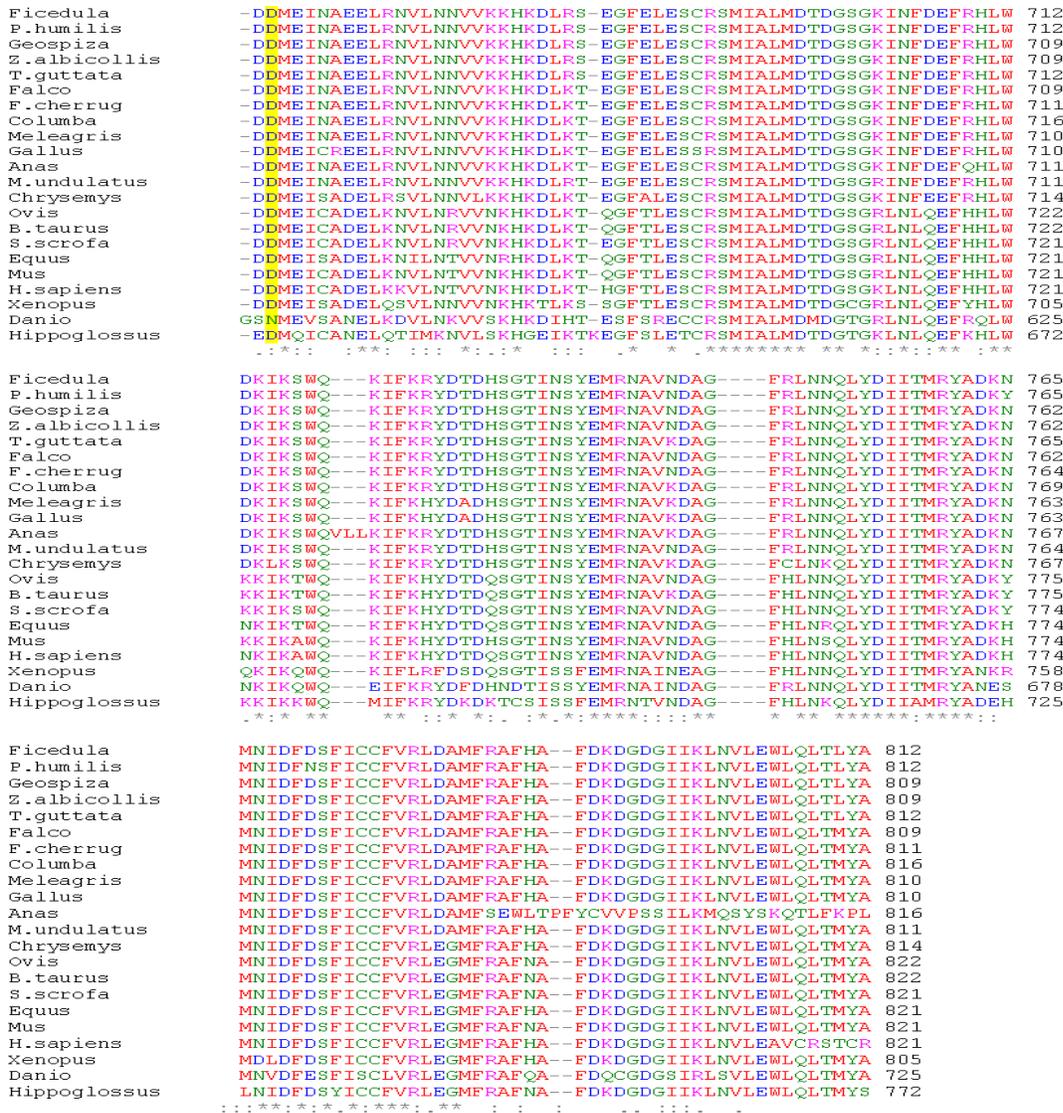
Ficedula	ISFQDFM HFT LEICNLPDPTLEADKLFQTTWTVSVNEGRWVRGCSAGGCCNYPDFFWTNP	451
P.humilis	ISFQDFM HFT LEICNLPDPTLEADKLFQTTWTVSVNEGRWVRGCSAGGCCNYPDFFWTNP	451
Geospiza	ISFQDFM HFT LEICNLPDPTLEADKLFQTTWTVSVNEGRWVRGCSAGGCCNYPDFFWTNP	451
Z.albicollis	ISFQDFM HFT LEICNLPDPTLEADKLFQTTWTVSVNEGRWVRGCSAGGCCNYPDFFWTNP	451
T.guttata	ISFQDFM HFT LEICNLPDPTLEADKLFQTTWTVSVNEGRWVRGCSAGGCCNYPDFFWTNP	451
Falco	ISFQDFM HFT LEICNLPDPTLEADKLFQTTWTVSVNEGRWVRGCSAGGCCNYPDFFWTNP	452
F.Cherrug	ISFQDFM HFT LEICNLPDPTLEADKLFQTTWTVSVNEGRWVRGCSAGGCCNYPDFFWTNP	452
Columba	ISFQDFM HFT LEICNLPDPTLEADKLFQTTWTVSVNEGRWVRGCSAGGCCNYPDFFWTNP	452
Meleagris	ISFQDFM HFT LEICNLPDPTLEADKLFQTTWTVSVNEGRWVRGCSAGGCCNYPDFFWTNP	451
Gallus	ISFQDFM HFT LEICNLPDPTLEADKLFQTTWTVSVNEGRWVRGCSAGGCCNYPDFFWTNP	451
Anas	ISFQDFM HFT LEICNLPDPTLEADKLFQTTWTVSVNEGRWVRGCSAGGCCNYPDFFWTNP	452
M.undulatus	ISFQDFM HFT LEICNLPDPTLEADKLFQTTWTVSVNEGRWVRGCSAGGCCNYPDFFWTNP	452
Chrysemys	ISFQDFM HFT LEICNLPDPTLEADKLFQTTWTVSVNEGRWVRGCSAGGCCNYPDFFWTNP	451
Ovis	MSYDDFYHFT LEICNLPDPTLEADKLFQTTWTVSVNEGRWVRGCSAGGCCNYPDFFWTNP	459
B.taurus	MSYDDFYHFT LEICNLPDPTLEADKLFQTTWTVSVNEGRWVRGCSAGGCCNYPDFFWTNP	459
S.scrofa	MSYDDFYHFT LEICNLPDPTLEADKLFQTTWTVSVNEGRWVRGCSAGGCCNYPDFFWTNP	458
Equus	MSYDDFYHFT LEICNLPDPTLEADKLFQTTWTVSVNEGRWVRGCSAGGCCNYPDFFWTNP	458
Mus	MSYDDFYHFT LEICNLPDPTLEADKLFQTTWTVSVNEGRWVRGCSAGGCCNYPDFFWTNP	458
H.sapiens	MSYDDFYHFT LEICNLPDPTLEADKLFQTTWTVSVNEGRWVRGCSAGGCCNYPDFFWTNP	459
Xenopus	MSYDDFYHFT LEICNLPDPTLEADKLFQTTWTVSVNEGRWVRGCSAGGCCNYPDFFWTNP	445
Danio	MSYDDFYHFT LEICNLPDPTLEADKLFQTTWTVSVNEGRWVRGCSAGGCCNYPDFFWTNP	394
Hippoglossus	MSYDDFYHFT LEICNLPDPTLEADKLFQTTWTVSVNEGRWVRGCSAGGCCNYPDFFWTNP	415

Ficedula	QYRLKLLLEEDDDPEDEEVICSFVVALMQNRRKERKLGANLYTIGFAIYVPP---KEMH	507
P.humilis	QYRLKLLLEEDDDPEDEEVICSFVVALMQNRRKERKLGANLYTIGFAIYVPP---KEMH	507
Geospiza	QYRLKLLLEEDDDPEDEEVICSFVVALMQNRRKERKLGANLYTIGFAIYVPP---KEMH	507
Z.albicollis	QYRLKLLLEEDDDPEDEEVICSFVVALMQNRRKERKLGANLYTIGFAIYVPP---KEMH	507
T.guttata	QYRLKLLLEEDDDPEDEEVICSFVVALMQNRRKERKLGANLYTIGFAIYVPP---KEMH	507
Falco	QYRLKLLLEEDDDPEDEEVVCSFLVALMQNRRKERKLGANLYTIGFAIYVPP---KEMH	508
F.Cherrug	QYRLKLLLEEDDDPEDEEVVCSFLVALMQNRRKERKLGANLYTIGFAIYVPP---KEMH	508
Columba	QYRLKLLLEEDDDPEDEEVVCSFLVALMQNRRKERKLGANLYTIGFAIYVPPAL---DLMH	510
Meleagris	QYRLKLLLEEDDDPEDEEVICSFVVALMQNRRKERKLGANLYTIGFAIYVPP---KEMH	507
Gallus	QYRLKLLLEEDDDPEDEEVICSFVVALMQNRRKERKLGANLYTIGFAIYVPP---KEMH	507
Anas	QYRLKLLLEEDDDPEDEEVICSFVVALMQNRRKERKLGANLYTIGFAIYVPP---KEMH	508
M.undulatus	QYRLKLLLEEDDDPEDEEVICSFVVALMQNRRKERKLGANLYTIGFAIYVPP---QEMH	508
Chrysemys	QYRLLELEEDDDPEDNEVVCSEFLVALMQNRRKERKLGANLLTIGFAIYVPP---KEMH	507
Ovis	QYRLKLLLEEDDDPDDSEVICSEFLVALMQNRRKDRKLGANLFTIGFAIYVPP---KEMH	515
B.taurus	QYRLKLLLEEDDDPDDSEVICSEFLVALMQNRRKDRKLGANLFTIGFAIYVPP---KEMH	515
S.scrofa	QYRLKLLLEEDDDPDDSEVICSEFLVALMQNRRKDRKLGANLFTIGFAIYVPP---KEMH	514
Equus	QYRLKLLLEEDDDPEDSEVICSEFLVALMQNRRKNRKLGANLFTIGFAIYVPP---KEMH	514
Mus	QYRLKLLLEEDDDPEDSEVICSEFLVALMQNRRKDRKLGANLFTIGFAIYVPP---KEMH	514
H.sapiens	QYRLKLLLEEDDDPDDSEVICSEFLVALMQNRRKDRKLGASLFTIGFAIYVPP---KEMH	514
Xenopus	QYRLKLLLEEDDDPADNEVVCSEFLVALMQNRRKDRKAGANLFTIGFAIYVPP---KEMH	501
Danio	QYRLRLLEEDDDPEDDEVACTFVVALMQNRRKERKLGANLLTIGFPIYVPP---KEMH	450
Hippoglossus	QYRLQLYEEDDDPEDGTVACTLLVVALMQGRRMQHQGAKFLTIGFPIYVPP---KEMC	471

Ficedula	GTRHHLQDFFFLYNASKARSKTYINMREISERFLPPSEYVVIIPSTYDPHQEGEFLIRVF	567
P.humilis	GTRHHLQDFFFLYNASKARSKTYINMREISERFLPPSEYVVIIPSTYDPHQEGEFLIRVF	567
Geospiza	GTRHHLQDFFFLYNASKARSKTYINMREISERFLPPSEYVVIIPSTYDPHQEGEFLIRVF	567
Z.albicollis	GTRHHLQDFFFLYNASKARSKTYINMREISERFLPPSEYVVIIPSTYDPHQEGEFLIRVF	567
T.guttata	GTRHHLQDFFFLYNASKARSKTYINMREISERFLPPSEYVVIIPSTYDPHQEGEFLIRVF	567
Falco	GTRHHLQDFFFLYNASKARSKTYINMREISERFLPPSEYVVIIPSTYDPHQEGEFLIRVF	568
F.Cherrug	GTRHHLQDFFFLYNASKARSKTYINMREISERFLPPSEYVVIIPSTYDPHQEGEFLIRVF	568
Columba	GTRHHLQDFFFLYNASKARSKTYINMREISERFLPPSEYVVIIPSTYDPHQEGEFLIRVF	570
Meleagris	GTRHHLQDFFFLYNASKARSKTYINMREISERFLPPSEYVVIIPSTYDPHQEGEFLIRVF	567
Gallus	GTRHHLQDFFFLYNASKARSKTYINMREISERFLPPSEYVVIIPSTYDPHQEGEFLIRVF	567
Anas	GTRHHLQDFFFLYNASKARSKTYINMREISERFLPPSEYVVIIPSTYDPHQEGEFLIRVF	568
M.undulatus	GTRHHLQDFFFLYNASKARSKTYINMREISERFLPPSEYVVIIPSTYDPHQEGEFLIRVF	568
Chrysemys	GNKQHLQDFFFLYNASKARSKTYINMREISERFLPPSEYVVIIPSTYDPHQEGEFLIRVF	567
Ovis	GNKQHLQDFFFLYNASKARSKTYINMREISERFLPPSEYVVIIPSTYDPHQEGEFLIRVF	575
B.taurus	GNKQHLQDFFFLYNASKARSKTYINMREISERFLPPSEYVVIIPSTYDPHQEGEFLIRVF	575
S.scrofa	GNKQHLQDFFFLYNASKARSKTYINMREISERFLPPSEYVVIIPSTYDPHQEGEFLIRVF	574
Equus	GNKQHLQDFFFLYNASKARSKTYINMREISERFLPPSEYVVIIPSTYDPHQEGEFLIRVF	574
Mus	GNKQHLQDFFFLYNASKARSKTYINMREISERFLPPSEYVVIIPSTYDPHQEGEFLIRVF	574
H.sapiens	GNKQHLQDFFFLYNASKARSKTYINMREISERFLPPSEYVVIIPSTYDPHQEGEFLIRVF	574
Xenopus	GNKQHLQDFFFLYNASKARSKTYINMREISERFLPPSEYVVIIPSTYDPHQEGEFLIRVF	561
Danio	GNKQHLQDFFFLYNASKARSKTYINMREISERFLPPSEYVVIIPSTYDPHQEGEFLIRVF	510
Hippoglossus	GNKQHLQDFFFLYNASKARSKTYINMREISERFLPPSEYVVIIPSTYDPHQEGEFLIRVF	531

Ficedula	SEKRRSLSEEVENMIEAERPLVSTKKGKPIIFVSDRANSNKELTADENAGKDGKTKQADG	627
P.humilis	SEKRRSLSEEVENMIEAERPLVSTKKGKPIIFVSDRANSNKELTADENAGKDGKTKADD	627
Geospiza	SEKRRSLSEEVENMIEAERPLK---KKGKPIIFVSDRANSNKELTADENAGKDGKTKQADG	624
Z.albicollis	SEKRRSLSEEVENMIEAERPLK---KKGKPIIFVSDRANSNKELTADENAGKDGKTKQADG	624
T.guttata	SEKRRSLSEEVENMIEAERPLVSTKKGKPIIFVSDRANSNKELTADENAGKDGKTKQADG	627
Falco	SEKRRSLSEEAENMIEAERPS-----PIIFVSDRANSNKELTADENAGKDGKTKNLDG	620
F.Cherrug	SEKRRSLSEEAENMIEAERPSK---KKGKPIIFVSDRANSNKELTADENAGKDGKTKNLDG	626
Columba	SEKRRSLSEEVENMIEAERPSK---KKGKPIIFVSDRANSNKELTADENAGKDGKTKHVDG	628
Meleagris	SEKRRSLSEEVENMIEAERPSK---KKGKPIIFVSDRANSNKELTADENAGKDGKTKHVDG	625
Gallus	SEKRRSLSEEVENMIEAERPSK---KKGKPIIFVSDRANSNKELTADENAGKDGKTKHVDG	625
Anas	SEKRRSLSEEVENMIEAERPSK---KKGKPIIFVSDRANSNKELTADENAGKDGKTKHVDG	626
M.undulatus	SEKRRSLSEEVENMIEAERPSK---KKGKPIIFVSDRANSNKELTADENAGKDGKTKHVDG	626
Chrysemys	SEKRRSLSEEVENMIEAERPSK---KKGKPIIFVSDRANSNKELTADENAGKDGKTKHVDG	626
Ovis	SEKRRSLSEEVENMIEAERPSK---KKGKPIIFVSDRANSNKELTADENAGKDGKTKHVDG	625
B.taurus	SEKRRSLSEEVENMIEAERPSK---KKGKPIIFVSDRANSNKELTADENAGKDGKTKHVDG	633
S.scrofa	SEKRRSLSEEVENMIEAERPSK---KKGKPIIFVSDRANSNKELTADENAGKDGKTKHVDG	632
Equus	SEKRRSLSEEVENMIEAERPSK---KKGKPIIFVSDRANSNKELTADENAGKDGKTKHVDG	632
Mus	SEKRRSLSEEVENMIEAERPSK---KKGKPIIFVSDRANSNKELTADENAGKDGKTKHVDG	632
H.sapiens	SEKRRSLSEEVENMIEAERPSK---KKGKPIIFVSDRANSNKELTADENAGKDGKTKHVDG	632
Xenopus	SEKRRSLSEEVENMIEAERPSK---KKGKPIIFVSDRANSNKELTADENAGKDGKTKHVDG	620
Danio	SEKRRSLSEEVENMIEAERPSK---KKGKPIIFVSDRANSNKELTADENAGKDGKTKHVDG	531
Hippoglossus	SEKRRSLSEEVENMIEAERPSK---KKGKPIIFVSDRANSNKELTADENAGKDGKTKHVDG	589

Ficedula	KKR-----SSTKALE-----ESEEQKQFRNIFRQIAG-----	654
P.humilis	KKR-----SSAKAHE-----ESEEQKQFRNIFRQIAG-----	654
Geospiza	KKR-----SSTKAHE-----ESEEQKQFRNIFRQIAG-----	651
Z.albicollis	KKH-----SSTKGHE-----ESEEQKQFRNIFRQIAG-----	651
T.guttata	KKR-----SSTKAHE-----ESEEQKQFRNIFRQIAG-----	654
Falco	KKVS-----AASGKG-----ENR-----ACSEEENQFRNIFRQIAG-----	651
F.Cherrug	KKRP-----SAKAR-----ESSEEENQFRNIFRQIAG-----	653
Columba	KKVS-----AASGKG-----GNG-----ACEEEKQFRNIFRQIAG-----	658
Meleagris	KKR-----SSAK-----ARE-----KSEETQFRNIFRQIAG-----	652
Gallus	KKR-----SSAK-----ARE-----KSEETQFRNIFRQIAG-----	652
Anas	KKR-----HSAK-----ARE-----ENEEKQFRNIFRQIAG-----	653
M.undulatus	EKH-----PSTK-----TRE-----GSEEENQFRNIFRQIAG-----	653
Chrysemys	KKKSDEP-----TPTNADK-----DSEEKQFRNIFRQIAG-----	656
Ovis	QAKSPQL-----KPGNIDQ-----ESKEQRQFRNIFRQIAG-----	664
B.taurus	QAKSPQL-----EPGNTDQ-----ESEEQRQFRNIFRQIAG-----	664
S.scrofa	QEKSPKQ-----EPSNTDQ-----ESEEQQQFRNIFRQIAG-----	663
Equus	QERSPOP-----QPGITDQ-----ESEEQQQFRNIFRQIAG-----	663
Mus	RGETPOP-----RPGHTDQ-----ESEEQQQFRNIFRQIAG-----	663
H.sapiens	QEQSPQP-----QPGSSDQ-----ESEEQQQFRNIFRQIAG-----	663
Xenopus	KDK-----TSASTDT-----ESEEQKQFRNIFRQIAG-----	647
Danio	-----SPASTGE-----ESEEDQQFLSIFQHIAGDVSTGEAVSAW	566
Hippoglossus	-----KLLPEEE-----ESEEQKQFRNIFRQIAG-----	613



**Figura 14.** Alineamiento clustal de las secuencias de aminoácidos del gen *CAPN3*. Los residuos de aminoácidos conservados para el sitio catalítico se indican en cajas. En negritas y subrayados, los aminoácidos que cambiaron en *M. g. gallopavo* (Ser/Pro<sup>330</sup> y Ser/Gly<sup>472</sup>). En verde, el dominio CysPc que incluye a IS1. En azul, el dominio C2L, seguido de IS2 y el resto empezando en los aminoácidos marcados con amarillo el dominio EF-hand.

#### VI.4. Análisis filogenético

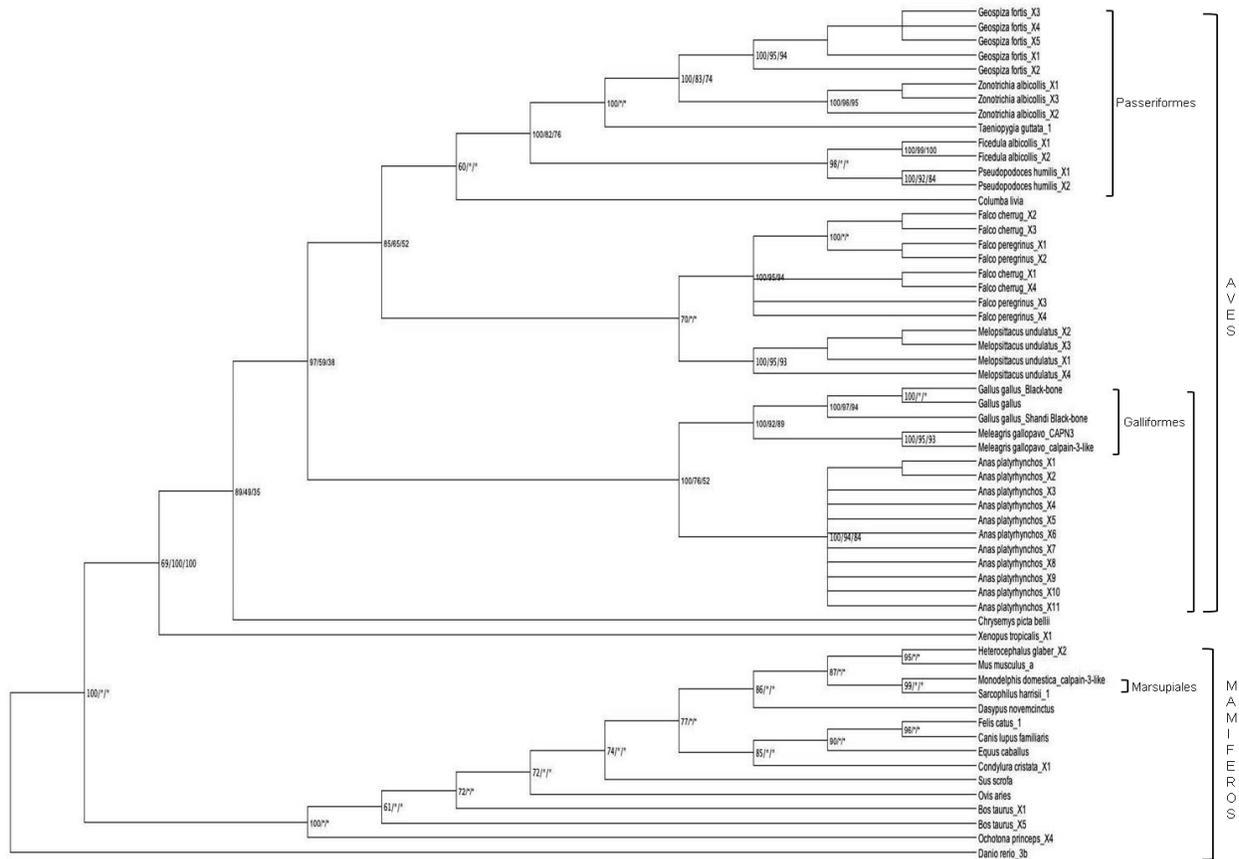
La topología de los árboles filogenéticos NJ, ML y bayesiano, construidos con 59 secuencias de nucleótidos ( $\approx 2818$  nt), se concentró en un sólo árbol, donde se observa al pez óseo *D. rerio* como monofilético basal ancestral. Además, la secuencia de *Xenopus tropicalis* se observa monofilética basal, relacionada con un gran clado que

incluye un subclado con reptiles y aves, y otro subclado con mamíferos. En el subclado de las aves se observa a la secuencia de la tortuga *Chrysemys picta bellii* como basal monofilética (Fig. 15). Adicionalmente, el subclado de las aves se separa en dos subclados, uno de los cuales incluye a las secuencias de los Galloanserae (pollo, guajolote y patos) y éstos a su vez, en Galliformes, *M. gallopavo* y *G. gallus* (pollo) y al Anseriforme *Anas platyrhynchos* (patos); se observa que la secuencia de CAPN3 de éste estudio forma un subclado con la secuencia del predicho de calpaína 3-like, indicando que se trata de dos alelos para el mismo gen. El segundo subclado de aves incluye a los Passeriformes *Taeripygia gutata*, *Ficedula albicollis*, *Pseudopodoces humillis*, *Zonotrichia albicollis* y *Geospiza fortis*, además de otras órdenes.

Como se esperaba, debido al bajo número de especies para las que se encuentran reportadas secuencias de CAPN3, se muestra una topología parafilética en el clado que incluye a las secuencias de los mamíferos, indicando que el análisis filogenético incluye al antepasado común, pero no a todos los descendientes. Sin embargo, se puede observar la formación de dos subclados, uno que incluye a roedores, marsupiales y al armadillo *Dasypus novemcinctus*; y otro subclado con el perro *Canis lupus*, el gato *Felis catus*, *Equus caballus* y el topo de nariz estrellada *Condylura cristata*.

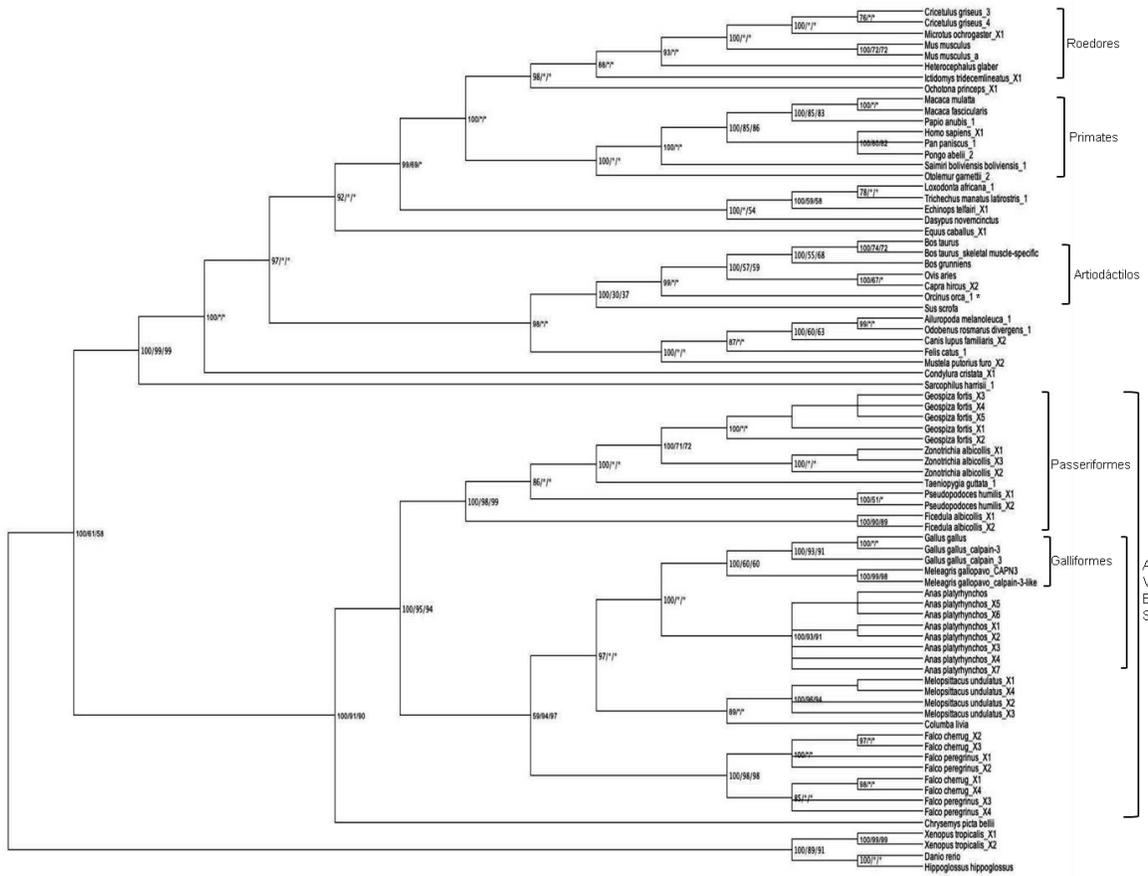
La topología de los árboles filogenéticos NJ, ML y bayesiano, construidos con 59 secuencias de aminoácidos deducidos y 20 secuencias de proteínas (toda la proteína), muestra a los teleósteos *H. hippoglossus* y *D. rerio* y al anfibio *X. tropicalis* como monofiléticos basales ancestrales (Fig. 16). Se observa un gran clado que incluye un subclado con reptiles y aves, y otro subclado con mamíferos. En el subclado que incluye a las aves se observa a la secuencia de la tortuga *Chrysemys picta bellii* como basal monofilética. Las aves, a su vez se muestran separadas en dos subclados, uno que incluye a Galloanserae y dentro de estos a *G. gallus* y *M. gallopavo* (Galliformes), *Melopsittacus undulatus* (periquito australiano), *Columba livia* (paloma) y *Falcos* (Falconiformes). Dentro del otro subclado encontramos a los Passeriformes, *F. albicollis* (papamoscas collarino), *P. humillis* (carbonero terrestre), *G. fortis* (pinzón), *Z. albicollis* (gorrión gorgiblanco) y *T. guttata* (pinzón cebra).

El clado de los mamíferos se separa en cuatro subclados, uno para primates, *Homo sapiens*, *Pan paniscus* (chimpancé pigmeo), *Pongo abelii* (orangután de sumatra), *Macaca fascicularis* (macaco cangrejero), *Macaca mulatta* (macaco rhesus), *Papio anubis* (papión oliva), *Saimiri boliviensis boliviensis* (mono ardilla boliviano) y *Otolemur garnettii* (gálago de garnet), otro con roedores (*Heterocephalus glaber*, *Cricetulus griceus*, *M. musculus*, *Microtus ochrogaster*), otro para artiodáctilos (*B. taurus*, *Capra hircus*, *Ovis aries* y *Sus scrofa*) y uno con especies del orden carnívora (*Mustela putorius furo*, *Felis catus*, *Canis lupus*, *Odobenus rosmarus divergens*, *Ailuropoda melanoleuca*), que adicionalmente muestran ramas parafiléticas debido a la baja cantidad de especies representadas.



**Figura 15.** Árbol filogenético consenso de secuencias de nucleótidos del gen *CAPN3*. Se muestran los valores de soporte de las tres topologías en el siguiente orden, bayesiano, ML y

NJ, los valores se generaron con 100,000 generaciones (bayesiano) y 1000 repeticiones de bootstraps (ML y NJ). \* Valores soporte menores de 50.



**Figura 16.** Árbol filogenético consenso de secuencias de aminoácidos del gen *CAPN3*. Se muestran los valores de soporte de las tres topologías en el siguiente orden, bayesiano, ML y NJ, los valores se generaron con 100,000 generaciones (bayesiano) y 1000 repeticiones de bootstraps (ML y NJ). \* Valores soporte menores de 50.

### VI.5. Análisis de la estructura proteica del gen *CAPN3* de *M. g. gallopavo*

Se realizó una predicción de la estructura secundaria de *CAPN3* utilizando el software en línea Jpred, donde se pueden identificar los dominios que presentan  $\alpha$ -hélices, láminas  $\beta$ -plegadas y giros (Fig. 17). Posteriormente, se realizó la predicción de la estructura terciaria de la proteína de *CAPN3* por el modelo de homología, utilizando el software en línea Swiss-Model. Se plasmaron dos modelos 3D de la proteína *CAPN3*:

Modelo 1) Incluye del aminoácido 31 al 809, se utilizó como templatado la proteína de la calpaína 2 humana forma II (PDB: 1kfuL) con una identidad de 44.08% (Fig. 18), mostrando los tres dominios conservados que se identificaron con el Clustal W, cabe señalar que al modelo se le realizó una minimización de energía libre con Swiss-PdbViewer 4.1.0; Modelo 2) Incluye el sitio catalítico (54-410 aa), se utilizó como templatado la proteína de calpaína 9 humana, sitio catalítico (PDB: 1zivA), con una identidad de 52.4% (Fig. 19), revelando los tres aminoácidos pertenecientes al dominio CysPc. Al no haber proteínas cristalizadas de otras aves, se utilizaron como templatados calpaínas humanas.

En el modelo con la proteína total se observa el dominio CysPc donde se indican los tres aminoácidos correspondientes al sitio catalítico (Figs. 18 B y C), el dominio rico en lámina  $\beta$ -plegada corresponde al dominio C2L y el extremo contrario al dominio catalítico CysPc, corresponde al dominio EF-hand (Fig. 18 B y C). El dominio IS1 es difícil de identificar, pero se encuentra asociado al dominio CysPc, y el dominio IS2 se ubica entre C2L y EF-hand. Cabe destacar la estructura de  $\alpha$ -hélice que sobresale de CysPc (Fig. 18) y que no se observa en la estructura de CAPN2 (Sorimachi et al., 2010; Sorimachi et al., 2011).

En el modelo del sitio catalítico se observa a PC1 que contiene al aminoácido C<sup>123</sup> y PC2 que contiene a los aminoácidos H<sup>327</sup> y N<sup>351</sup> del dominio CysPc (Figs. 19 B y C). Adicionalmente, se observa al dominio de IS1 que sobresale rico en lámina  $\beta$ -plegada en el extremo contrario a PC1 y PC2 (Figs. 19 A y C).

La estimación de la calidad de los modelos tridimensionales (Anolea, Qmean y Gromos) predichos de CAPN3 de *M. g. gallopavo* se muestra en las figuras 20 y 21. Se estimó su calidad por el diagrama de Ramachandran, el cual realiza un cálculo de las distintas combinaciones de ángulos de torsión que están prohibidos debido a choques estéricos (excepto glicina) y los ángulos en zonas permitidas ( $\alpha$ -hélice con giro a la derecha e izquierda y láminas  $\beta$ -plegada), para la predicción de una proteína más estable.

Para el sitio catalítico, la mayoría de las interacciones de los aminoácidos indican energía libre negativa (barras en color verde) es decir, que la estructura modelada es

estable (Fig. 20) y es más fácilmente encontrarla de forma natural, además, el diagrama de Ramachandran mostró un 2.2% de aminoácidos en regiones no permitidas.

Para la proteína total, se observa un mayor nivel de energía libre positiva (barras rojas) y por lo tanto una estructura inestable, ya que, se tendría que aplicar energía al sistema para que se formará la estructura predicha; además en el diagrama de Ramachandran mostró 5.1% de aminoácidos en regiones no permitidas (excluyendo Gly), sugiriendo que el análisis basado en la estructura cristalizada de CAPN2 humana es útil pero no suficiente para la predicción del modelo de CAPN3, debido a la ausencia de los dominios NS, IS1 e IS2 (Fig. 21).

```

Query:  MPSAINPAVAQQTAAGSVSSTTSTTEGTGGGTGGIYSAIISRNQPIIKVKEKTYEELHK
Jpred:  --EE-----EEE-----HHHH-----HHHHHHHH
Conf:   8700077520000046777777077777653022202567877765650789999999

Query:  KCLEKNILYEDPDFFPNETSLFY SQKVFIKFEWKRPREICENPRFIIGGANRTDICQGEEL
Jpred:  HHHH---EE-----EEE-----HHHHHHHHHH
Conf:   987437843404677777777777510124455367740442677777777777

Query:  GDCWFLLAAIACLTLNKKLLCRVI PHDQSEFI QNYAGIFHFQFWR YGDWVDV IIDDCLPTYN
Jpred:  ---HHHHHHHHHH-----EEEE-----EEEEEEEEEE---EEEEEE-----
Conf:   7636899999998604662467631577777777704899985088558998700000058

Query:  NQLVFTKSSQRNEFW SALLEKAYAKLHGSY EALKGGNTTEAMEDFTGGVTEFYBIKDAPK
Jpred:  -----EEEEHHHHHHHHHH-----EEEE-----
Conf:   806888507887000131788688850367546777605788870047605770378876

Query:  DIYKIMKHAIARGSLMASSIDDNLGFSYGAA PRSDIGEMIARMVKNLENAQMTHPTVDHQ
Jpred:  -HHHHHHHHHH-----EEEE-----HHHHHHHHHH-----E-----
Conf:   468999998870365000005676510367787776457899999876146700002467

Query:  GTDERPAWTIMPQYETRMS CGLVKGHAYE VTAVEETTFKGEKIRLIRL RNPWQV EWNG
Jpred:  -----HHHH-----HEEEEEEEEE-----EEEEEE-----
Conf:   777777777776520070003678321000000000004788558888615777764234

Query:  FWSDKSEBNFIKEEEKIRLQHKILE DGEFWSIFEDFMRHFTKLEICNLTPDTLEADKIQ
Jpred:  -----HHHHHH-----EEEE--HHHHHH-----EEEEEE-----
Conf:   6777777777652566633678888407875005655415804788506777777776

Query:  TWTVSVNEGRVWRVGC SAGGCRNYPDTEFW TNPQYRLKLL EDDDPEDDEVICG FLVALMQK
Jpred:  -EEEEEE-----EEEEEE-----EEEEEE-----EEEEEE-----E-----
Conf:   1088884343335677777777777744889886056777777408899887336

Query:  NRRKERKLGANLYTIGFAIYE VPKEMHGT KHHLQKDFFLYNASKARS KTYINMRI SERF
Jpred:  -----EEEEEE-----EEEEEE-----E-----
Conf:   77777777642000002563467777777777777777777876200020000888

Query:  RLPPSEYVVIIPSTYEPHQEGE FILLRVS EKASLSEVENMI EADRPSK KKKGKPIIFVSD
Jpred:  E-----EEEEEE-----EEEEEE-----EEEE-----E-----
Conf:   5388845899880057888745899984575007506777777777777776441

Query:  RANSNKELTDEEDAGKDGE KTHVDEK KRSSAKAREKSEEBTQFRNI FRQIAGDDMEINAE
Jpred:  -----HHHHHHHHHHHH-----HH-----
Conf:   00000467777777652110025677777777760688999988636888720008

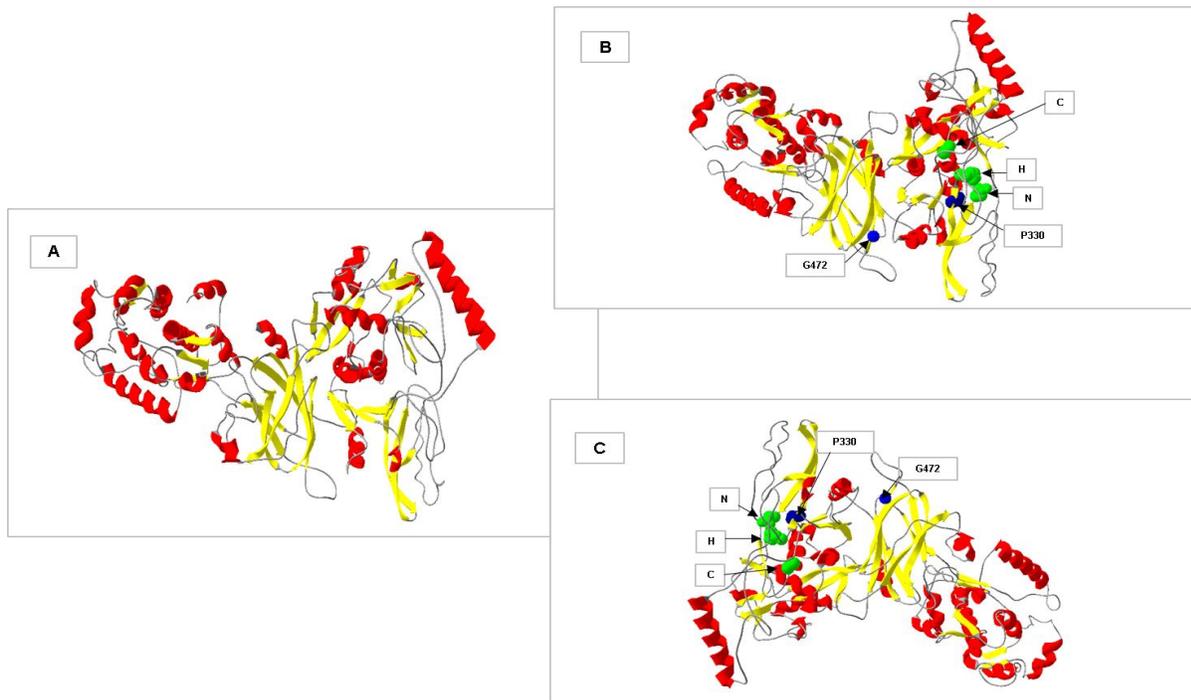
Query:  ELRNVLNNVVKHKDKTEGFELES CRSMI ALMDDT DSGGKINFDEF RHLWDKIKSWQKIF
Jpred:  HHHHHHHHH-----HHHHHHHHHHHH-----EE--HHHHHHHHHHHHHHHHHH
Conf:   89999987026777777636899999988507888500208999999999999999999

Query:  KHYDADHSGTINSYEMRNAVK DAGFLNQLYDI ITMRYADKNMNIDF DSFICCFVRLDA
Jpred:  HHH-----EE-HHHHHHHHHHH-----HHHHHHHHHHHH-----HHHHHHHHHHHHHH
Conf:   88037888021068899998861000777888999875067888850068999999999999

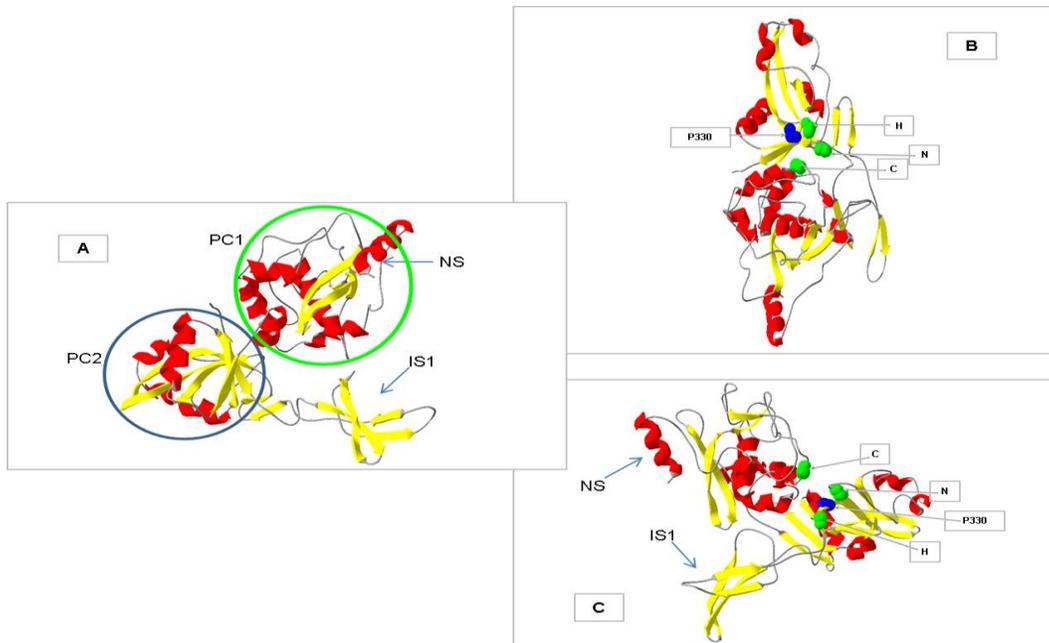
Query:  MFRAFHAFDKDGDGIIKLN VLEWLQLTMYA
Jpred:  HHHHHHH-----EEEEHHHHHHHHHHHH--
Conf:   999998605788605530067887654179

```

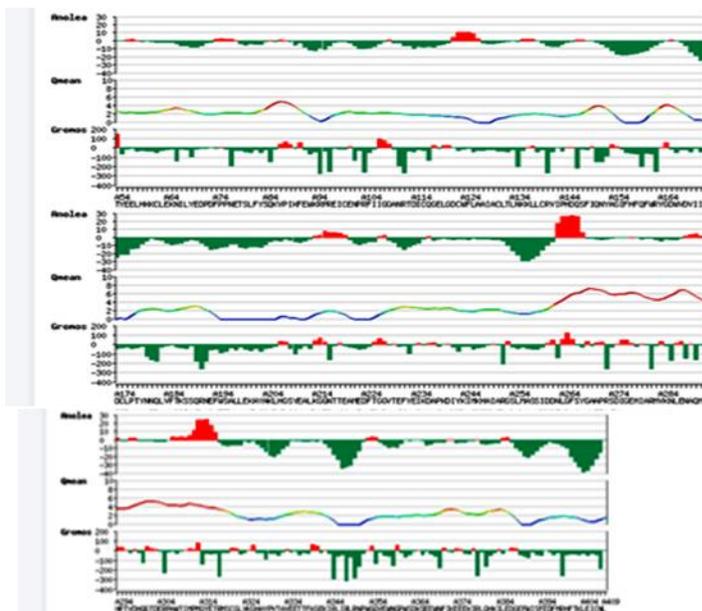
**Figura 17.** Predicción de la estructura secundaria de la secuencia de aminoácidos del gen CAPN3 de *M. g. gallopavo*. H= α-hélice, E= β-plegada y (-) son giros.



**Figura 18.** A) Estructura tridimensional de CAPN3 de *M. g. gallopavo*. B) y C) Estructuras que muestran los aminoácidos del sitio catalítico en esferas verdes (C123, H327 y N351) y los cambios ocurridos en las láminas  $\beta$  dentro del dominio CysPc y dominio C2L (lámina  $\beta$  plegada al centro en amarillo y esferas azules); modelos obtenidos por el software Swiss-PDBV 4.10.



**Figura 19.** A) Estructura tridimensional del sitio catalítico de CAPN3 de *M. g. gallopavo*. B) y C) Estructuras que muestran los aminoácidos del sitio catalítico en esferas verdes (C123, H327 y N351) y cambio en la lámina  $\beta$  dentro del dominio CysPc (esferas azules); modelos obtenidos mediante el software Swiss-PDBV 4.10.



**Figura 20.** Estimación de la calidad del modelo tridimensional para el sitio catalítico de CAPN3.

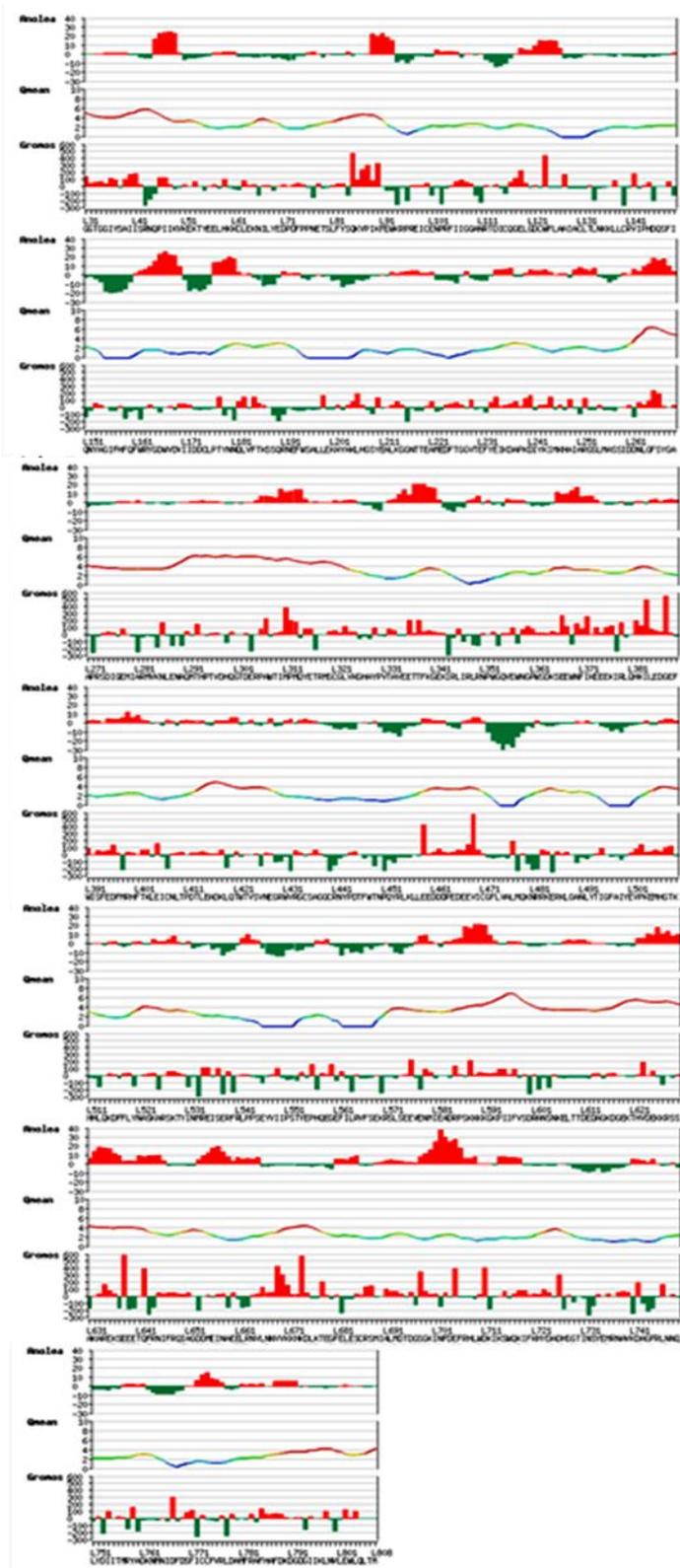
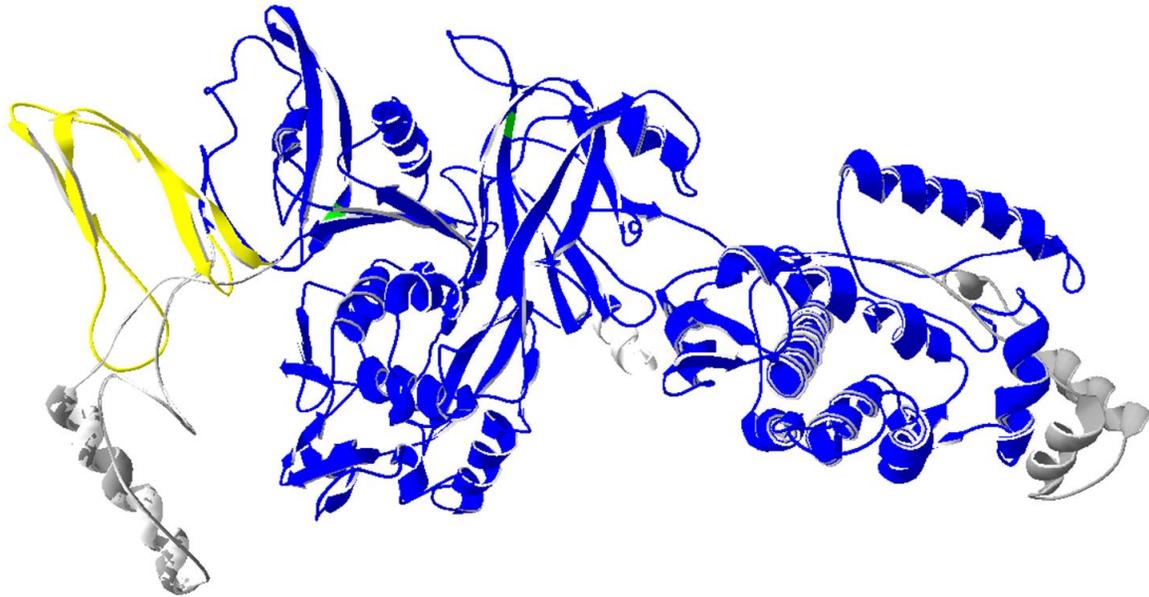


Figura 21. Estimación de la calidad del modelo tridimensional para CAPN3.

A continuación, se comparó el modelo sobrelapado de CAPN3 con las estructuras terciarias del predicho calpaína 3-like de *M. gallopavo* y CAPN3 de *G. gallus*. Como se puede observar en la figura 22, la estructura en azul es compartida por los tres modelos, la estructura en gris combinado con blanco es compartida por CAPN3 y calpaína 3-like de *M. gallopavo*, la estructura en blanco es específica de CAPN3 de éste estudio, la estructura en gris es específica de calpaína 3-like, y la estructura en amarillo es específica de CAPN3 de *G. gallus*. En verde se indican los cambios de Ser/Pro<sup>330</sup> y Ser/Gly<sup>472</sup>, CAPN3 de éste estudio. Para corroborar la posible formación de las  $\alpha$ -hélices y láminas  $\beta$ -plegadas de la estructura terciaria del dominio CysPc de las tres proteínas, se realizó un análisis de predicción de estructura secundaria y alineamiento (Fig. 23). Como se puede observar, las tres estructuras son similares desde el aa I<sup>40</sup> hasta N<sup>263</sup>, pero en el dominio PC2 del aa L<sup>264</sup> a A<sup>270</sup> CAPN3 de *G. gallus* presenta lámina  $\beta$ -plegada ausente en las secuencias de *M. gallopavo*. A continuación del aa R<sup>273</sup> a N<sup>289</sup> las estructuras de *M. gallopavo* presentan  $\alpha$ -hélice, en cambio en éste dominio *G. gallus* presenta lámina  $\beta$ -plegada del aa E<sup>278</sup> a R<sup>282</sup>. Adicionalmente, *G. gallus* presenta lámina  $\beta$ -plegada desde el aa T<sup>296</sup> a D<sup>303</sup>, ausente en el mismo dominio de las proteínas de *M. gallopavo*. Por lo anterior, la estructura secundaria y el modelo 3D sugieren un cambio de  $\alpha$ -hélice (gris con blanco) en las proteínas de *M. gallopavo* a láminas  $\beta$ -plegadas en *G. gallus* en el dominio PC2 de CysPc. Adicionalmente, las estructuras de *M. gallopavo* presentan una  $\alpha$ -hélice en el dominio IS1 que no está en *G. gallus*.

Finalmente, se realizó el modelo sobrelapado de la estructura del sitio catalítico de CAPN3 de *M. g. gallopavo*, el predicho calpaína 3-like de *M. gallopavo* y CAPN3 de *G. gallus* (Fig. 24) usando de nuevo como plantilla el dominio CysPc cristalizado de CAPN9 humana (se indica el cambio de Ser/Pro<sup>330</sup>). Como se puede observar, la  $\alpha$ -hélice de PC2 de las CAPN3 de *M. gallopavo* se desplaza hacia adentro de la estructura haciéndola más compacta. Sin embargo, no se observa la lámina  $\beta$ -plegada que presenta PC2 en *G. gallus* en la estructura secundaria y el modelo de la proteína

completa, sugiriendo que la plantilla de CAPN9 humana modifica la lámina  $\beta$ -plegada a  $\alpha$ -hélice debido a que en la misma posición presenta una estructura similar.

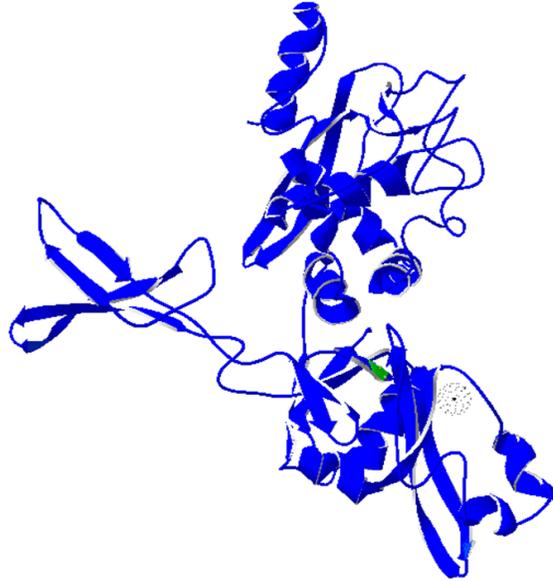


**Figura 22.** Comparación del modelo tridimensional de CAPN3 con calpaína 3-like de *M. gallopavo* y CAPN3 de *G. gallus*. En azul, estructura compartida por los tres modelos, en verde se indica el cambio Ser/Gly<sup>472</sup> y Ser/Pro<sup>330</sup> en CAPN3 de este estudio, en gris con blanco, estructura compartida por CAPN3 y calpaína 3-like, en gris, estructura específica de calpaína3-like y en amarillo láminas  $\beta$ -plegadas específicas de CAPN3 de *G. gallus*.

Calpaina 3-like	40	I	ISRNQPIIKV	KEKTYEELHK	KCLEENILYE	DPDFPPNETS
<i>M. g. gallopavo</i>	31		GGTGGIYSAI	ISRNQPIIKV	KEKTYEELHK	KCLEKNILYE
<i>G. gallus</i>	38	SAI	ISRNQPIIKV	KEKTYEELHK	KCLEKNILYE	DPDFPPNETS
		*	*****	*****	*****	*****
Calpaina 3-like	81		LFYSQKVPIK	FEWKRPREIC	ENFRFIIGGA	NRTDICOQEL
<i>M. g. gallopavo</i>	81		LFYSQKVPIK	FEWKRPREIC	ENFRFIIGGA	NRTDICOQEL
<i>G. gallus</i>	81		LFYSQKVPIK	FEWKRPREIC	ENFRFIIGGA	NRTDICOQEL
			*****	*****	*****	*****
Calpaina 3-like	131		CLTLNKKLLC	RVIPHDQSF I	QNYAGIFHFQ	FWRYGDWVDV
<i>M. g. gallopavo</i>	131		CLTLNKKLLC	RVIPHDQSF I	QNYAGIFHFQ	FWRYGDWVDV
<i>G. gallus</i>	131		CLTLNKKLLC	RVIPHDQSF I	QNYAGIFHFQ	FWRYGDWVDV
			*****	*****	*****	*****
Calpaina 3-like	181		NQLVFTKSSQ	RNEFWSALLE	KAYAKLHGSY	EALKGGNTTE
<i>M. g. gallopavo</i>	181		NQLVFTKSSQ	RNEFWSALLE	KAYAKLHGSY	EALKGGNTTE
<i>G. gallus</i>	181		NQLVFTKSSQ	RNEFWSALLE	KAYAKLHGSY	EALKGGNTTE
			*****	*****	*****	*****
Calpaina 3-like	231		EFYEIKDAPK	DIYKIMKHAI	ARGSLMASSI	DDNLGFSYGA
<i>M. g. gallopavo</i>	231		EFYEIKDAPK	DIYKIMKHAI	ARGSLMASSI	DDNLGFSYGA
<i>G. gallus</i>	231		EFYEIKDAPK	DIYKIMKHAI	ARGSLMASSI	DDNLGFSYGA
			*****	*****	*****	*****
Calpaina 3-like	281		ARMVKNLENA	QMTYSTVDYQ	GTDERPAWTI	MPMQYETRMS
<i>M. g. gallopavo</i>	281		ARMVKNLENA	QMTHTPTVDHQ	GTDERPAWTI	MPMQYETRMS
<i>G. gallus</i>	281		ARMVKNLENA	QMTHTPTVDHQ	GTDERPAWTI	MPMQYETRMS
			*****	*****	*****	*****
Calpaina 3-like	331		VTAVEETTYK	GEKMLVRLR	NFWGQVEWNG	FWSDKSEEWN
<i>M. g. gallopavo</i>	331		VTAVEETTFK	GEKRLIRLR	NFWGQVEWNG	FWSDKSEEWN
<i>G. gallus</i>	331		VTAVEETTFK	GEKRLIRLR	NFWGQVEWNG	FWSDKSEEWN
			*****	*****	*****	*****
Calpaina 3-like	381		QHKIAEDGEF	WISFEDFMRH	FTKLEICNLT	PDLEADKQK
<i>M. g. gallopavo</i>	381		QHKILEDEGF	WISFEDFMRH	FTKLEICNLT	PDLEADKQK
<i>G. gallus</i>	381		QHKILEDEGF	WISFEDFMRH	FTKLEICNLT	PDLEADKQK
			*****	*****	*****	*****
Calpaina 3-like	431		WVRGCSAGGC	RNYPDTEFTN	POYRLKLEE	DDDPEDEEVI
<i>M. g. gallopavo</i>	431		WVRGCSAGGC	RNYPDTEFTN	POYRLKLEE	DDDPEDEEVI
<i>G. gallus</i>	431		WVRGCSAGGC	RNYPDTEFTN	POYRLKLEE	DDDPEDEEVI
			*****	*****	*****	*****
Calpaina 3-like	481		NRRKERKIGA	NLXTIGFAIY	EVPKEMHGTK	HHLQKDFFLY
<i>M. g. gallopavo</i>	481		NRRKERKIGA	NLXTIGFAIY	EVPKEMHGTK	HHLQKDFFLY
<i>G. gallus</i>	481		NRRKERKIGA	NLXTIGFAIY	EVPKEMHGTK	HHLQKDFFLY
			*****	*****	*****	*****
Calpaina 3-like	531		INMREISERF	RLPPSEVII	PSTYEPHQEG	EFILRVFSEK
<i>M. g. gallopavo</i>	531		INMREISERF	RLPPSEVII	PSTYEPHQEG	EFILRVFSEK
<i>G. gallus</i>	531		INMREISERF	RLPPSEVII	PSTYEPHQEG	EFILRVFSEK
			*****	*****	*****	*****
Calpaina 3-like	581		IEADRPSKKK	KGKPIIEVSD	RANSNKELTT	DEDAGKDEK
<i>M. g. gallopavo</i>	581		IEADRPSKKK	KGKPIIEVSD	RANSNKELTT	DEDAGKDEK
<i>G. gallus</i>	581		IEADRPSKKK	KGKPIIEVSD	RANSNKELTT	DEDAGKDEK
			*****	*****	*****	*****
Calpaina 3-like	631		AKAREKSEEE	TOPRNIHQI	AGDDMEICRE	ELRNVLNNVV
<i>M. g. gallopavo</i>	631		AKAREKSEEE	TOPRNIHQI	AGDDMEICRE	ELRNVLNNVV
<i>G. gallus</i>	631		AKAREKSEEE	TOPRNIHQI	AGDDMEICRE	ELRNVLNNVV
			*****	*****	*****	*****
Calpaina 3-like	681		FELESSRSMI	ALMDTDGSGK	INFDEFRLW	DKI KSWQKIF
<i>M. g. gallopavo</i>	681		FELESCRSMI	ALMDTDGSGK	INFDEFRLW	DKI KSWQKIF
<i>G. gallus</i>	681		FELESCRSMI	ALMDTDGSGK	INFDEFRLW	DKI KSWQKIF
			*****	*****	*****	*****
Calpaina 3-like	731		INSYEMRNAV	KDAGFRLNNO	LYDIITMRYA	DKNMNIIDFS
<i>M. g. gallopavo</i>	731		INSYEMRNAV	KDAGFRLNNO	LYDIITMRYA	DKNMNIIDFS
<i>G. gallus</i>	731		INSYEMRNAV	KDAGFRLNNO	LYDIITMRYA	DKNMNIIDFS
			*****	*****	*****	*****
Calpaina 3-like	781		MFRAPHAFDK	DGDGIIKLV	LEWLQTM	hhhhhh
<i>M. g. gallopavo</i>	781		MFRAPHAFDK	DGDGIIKLV	LEWLQTM	hhhhhh
<i>G. gallus</i>	781		MFRAPHAFDK	DGDGIIKLV	LEWLQTM	hhhhhh
			*****	*****	*****	*****

**Figura 23.** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la comparación de los modelos tridimensionales de CAPN3 de *M. g. gallopavo*, *G. gallus* y calpaina 3-like de *M. gallopavo*. En

color verde se indican los cambio Ser/Gly<sup>472</sup> y Ser/Pro<sup>330</sup>. h=  $\alpha$ -hélice, s= lámina  $\beta$ -plegada.  
\*Similitud de aa. Ausencia de \* o . (punto), refieren que hay cambio de aa en las secuencias.



**Figura 24.** Comparación del modelo tridimensional del dominio catalítico CysPc de CAPN3 de *M. g. gallopavo* con el predicho calpaína 3-like de *M. gallopavo* y CAPN3 de *G. gallus*. En color verde se indica el cambio Ser/Pro<sup>330</sup>, y se visualiza un sitio de unión a calcio (punto negro).

## VII. DISCUSIÓN.

### VII.1. Caracterización del gen *CAPN3* de *M. g. gallopavo*

Con base en la secuencia del predicho para calpaína 3 reportado en NCBI (No. de Acceso: ENSMGAP00000012038), ubicado en el cromosoma 5 de *M. gallopavo*, se logró el aislamiento del ADNc del gen *CAPN3*, que presentó un tamaño de 2818 pb en su región codificante (2586 pb incluyendo parte de los UTRs). Éste es el primer ADNc de *CAPN3* aislado e identificado que confirma la expresión del gen en tejido muscular de *M. g. gallopavo*. El análisis de comparación de la secuencia del ADNc de *CAPN3* con la secuencia del ARNm predicho de calpaína 3-like, mostró una similitud de 99%, indicando que se trata de dos alelos diferentes para el mismo gen de *M. g. gallopavo*. La identificación de un nuevo alelo fue congruente con la descripción de *CAPN3* como un gen multialélico en *G. gallus* (Zhang et al, 2009), pero también en *M. g. gallopavo* donde en un trabajo previo se identificaron polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) en secuencias del gen calpaína 3-like amplificadas a partir del ADN de 24 individuos de trapatio de las cinco regiones fisiográficas de Michoacán. Uno de estos SNPs genera cambios en tres aminoácidos dentro del sitio C2L (Contreras-Campos, 2013).

Respecto a las diferencias que se presentaron en la secuencia de aminoácidos de *CAPN3*, Ser/Pro<sup>330</sup> (dominio CysPc) y Ser/Gly<sup>472</sup> (domino C2L), son cambios a nivel de grupo. La Ser pertenece al grupo de aminoácidos polares sin carga, teniendo un índice hidropático de -0.8, es decir, se presenta en un ambiente acuoso. La Pro y Gly son del grupo de aminoácidos apolares alifáticos, con un índice hidropático de -1.6 y -0.4, respectivamente. El grupo secundario (imino) de la Pro, se mantiene en una conformación rígida que reduce la flexibilidad estructural de la proteína en este punto, no así con la Gly, ya que tiene la estructura del aminoácido más sencillo, de ahí el mínimo impedimento estérico, lo que permite más flexibilidad estructural en la proteína (Lehninger, 2009). Lo anterior sugiere, que los cambios encontrados podrían dar las características especiales a la *CAPN3* respecto a su dependencia de sodio además de calcio. El número de secuencias de nucleótidos de genes de *CAPN3* en bases de datos

(58) reportados en bases de datos, es mayor en comparación con las secuencias de proteínas (20) y no hay proteínas de CAPN3 cristalizadas disponibles.

La comparación por alineamiento clustal mostró que las secuencias deducidas de aminoácidos de genes y de proteínas de CAPN3 de todos los organismos analizados (aves, reptil, peces, anfibios y mamíferos) incluyendo CAPN3 de este estudio, conservan el dominio NS, el dominio catalítico CysPc incluyendo el IS1, así como los tres aminoácidos del sitio catalítico (C, H y N), el dominio C2L, el IS2 y EF-hand, independientemente de su tamaño, como se reportó previamente (Goll et al., 2003; Sorimachi et al., 2010).

## VII.2. Análisis filogenético

A pesar de la poca cantidad de secuencias de genes y de proteínas de CAPN3 con que se contó para el análisis filogenético, se pudo corroborar el proceso evolutivo propuesto en los árboles filogenéticos construidos a partir de citocromo C (Lehninger, 2009). En el caso de la tipología del árbol construido con secuencias de nucleótidos, se observó una separación clara en un clado que incluye a los mamíferos y otro clado donde se encuentra a anfibios, reptiles y aves. El pez óseo (teleosteo) *D. rerio*, se mostró como ancestro basal. Por otro lado, el anfibio *X. tropicalis* y la tortuga *C. picta bellii* se mostraron como ancestros basales del subclado que incluye a las aves. Adicionalmente, el subclado de las aves se separa en subclados de Galliformes, Falconiformes y Passeriformes. El análisis filogenético de éste estudio fue congruente pero mostró mejor resolución comparado con el realizado previamente por Macqueen y colaboradores (2010), quienes usaron pocas secuencias de peces teleosteos, entre ellos *H. hippoglossus*, *D. rerio*, que forman un clado, y las secuencias del anfibio *X. tropicalis*, del galliforme *G. gallus* y de *H. sapiens* que forman otro clado.

Debido al bajo número de especies para las que se encuentran reportadas secuencias de CAPN3, se presentó una topología parafilética para los mamíferos. A pesar de lo anterior, se pudo observar la formación de un subclado con roedores y marsupiales.

En el árbol filogenético construido con las secuencias de aminoácidos, se observa a los teleósteos y anfibios como monofiléticos basales ancestrales de reptiles, aves y mamíferos. Por otro lado, similar al análisis con secuencias de nucleótidos, los reptiles se observan como ancestrales a las aves y éstas se separan en un subclado que incluye a Galliformes (primeras aves en diferenciarse) y Falconiformes (los más recientes) y en otro subclado a las Passeriformes.

Corroborando los resultados con el análisis de secuencias de nucleótidos, la topología muestra al clado de los mamíferos separado en tres o más subclados con ramas parafiléticas debido a la baja cantidad de especies representadas. Sin embargo, se observa la formación de un subclado para los primates y el agrupamiento de artiodáctilos y roedores.

### **VII.3. Análisis de la estructura proteica del gen *CAPN3* de *M. g. gallopavo***

El análisis estructural de las proteínas puede ser una herramienta importante para el estudio de la evolución de los organismos, ya que las diferencias estructurales pueden reflejar propiedades importantes como la especificidad de sustrato de enzimas y otros que no pueden inferirse a partir del análisis de secuencias de aminoácidos solamente.

La predicción de los modelos de la proteína CAPN3 de *M. g. gallopavo*, resultaron en un modelo inestable debido a que se utilizó un templado de calpaína 2 de humano, cuya identidad es de 44.08% debido a la ausencia de los dominios NS, IS2 e IS2. Sin embargo, se pudieron detectar los dominios característicos de CAPN3. La predicción del modelo del sitio catalítico resultó en una estructura estable, similar a la reportada previamente para el modelo de CAPN3 en *G. gallus* donde también se utilizó como templado la calpaína 9 humana (Walker et al., 2008). La calpaína 9 es una calpaína tejida específica de tracto gastrointestinal (carente de los dominios de inserción IS1 e IS2 característicos de la calpaína 3).

La comparación de la estructura secundaria y el modelo 3D de CAPN3 con el predicho de calpaína 3-like de *M. gallopavo* y CAPN3 de *G. gallus*, mostró que las proteínas de *M. gallopavo* presentan una  $\alpha$ -hélice en PC2 del dominio CysPc, que

cambia a lámina  $\beta$ -plegada en *G. gallus*. En el modelo 3D sobrelapado ambas estructuras secundarias se desplazan hacia fuera de núcleo de PC1, corroborando la inestabilidad de los modelos debido a que la plantilla de CAPN2 humana utilizada en el modelaje es insuficiente para el análisis. El modelo del dominio catalítico CysPc sobrelapado para las tres proteínas, mostró que la  $\alpha$ -hélice en PC2 de CAPN3 y calpaina 3-like de *M. gallopavo* se desplazó hacia adentro del núcleo del dominio, sugiriendo que ésta es la posición estable, sin embargo, la lámina  $\beta$ -plegada en PC1 de *G. gallus* parece modificarse a  $\alpha$ -hélice, debido probablemente a que la CAPN9 humana utilizada como plantilla, presenta una  $\alpha$ -hélice. A pesar de que CAPN9 permitió obtener un modelo estable del dominio catalítico CysPc para las tres CAPN3 analizadas, es necesaria una proteína cristalizada que permita conocer la verdadera estructura de la proteína.

## VIII. CONCLUSIONES.

- Se aisló e identificó el gen de *CAPN3* de *M. g. gallopavo*, de un tamaño de 2586 pb con un marco de lectura de 810 aminoácidos y se detectaron cambios en Ser/Pro<sup>330</sup> (dominio CysPc) y Ser/Gly<sup>472</sup> (dominio C2L) respecto al predicho de calpaína 3-like y otras secuencias de CAPN3.
- La comparación de secuencias nucleótidos y de aminoácidos deducidos con las bases de datos, mostró 99-77% de identidad con las secuencias reportadas, las cuales son principalmente predichos.
- En el análisis clustal se identificaron los dominios: NS, CysPc (C123, H327 y N351) que incluye a IS1, C2L, IS2 y EF-hand.
- En los árboles filogenéticos, se observó claramente la división de dos clados (aves-reptiles y mamíferos), con ancestros comunes.
- La predicción del modelo 3D del sitio catalítico de la proteína, utilizando el templado PDB: 1zivA, generó una estructura estable.
- La predicción del modelo de la proteína completa usando como templado la calpaína 2 de humana, generó una estructura inestable, aún con la minimización de energía.
- La comparación estructural de CAPN3 con calpaína 3-like de *M. gallopavo* y CAPN3 de *G. gallus*, mostró divergencias estructurales en PC2 del dominio catalítico CysPc.

## IX. BIBLIOGRAFÍA.

- Becerril C. A. 2000. Los animales en la cultura prehispánica. En: UNAM editor. Primera Jornada de la Historia de la Medicina Veterinaria y Zootecnia. México, 25-30.
- Beckmann J. and Spencer M. 2008. Calpain 3, the “gatekeeper” of proper sarcomere assembly, turnover and maintenance. *Neuromuscular Disorders* 18(12): 913-921. Doi:10.1016/j.nmd.2008.08.005
- Berti P. J. and Storer A. C. 1995. Alignment/phylogeny of papain superfamily of cysteine proteases. *J. Mol. Biol.* 246: 273-283.
- Birnboim H. C. and Dolly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 24, 7(6): 1513-23.
- Boateng S. Y. and Goldspink P. H. 2007. Assembly and maintenance of the sarcomere night and day. *Cardiovascular Research* 1, 77(4): 667-75.
- Clark K. A., Mcelhinny A. S., Beckerle M. C., Gregorio C. C. 2002. Striated muscle cytoarchitecture: An intricate web of form and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18: 637-706. Doi:10.1146/annurev.cellbio.18.012502.105840.
- Cole C., Barber J. D., Barton G. J. 2008. *Nucleic Acids Res.* 35 (suppl. 2) W197-W201.
- Crawford R. D. 1992. Introduction to Europe and diffusion of domesticated turkey from America. *Archivos de Zootecnia.* 41: 307-314  
[http://www.uco.es/organiza/servicios/publica/az/php/img/web/17\\_09\\_55\\_congreso\\_307\\_314.pdf](http://www.uco.es/organiza/servicios/publica/az/php/img/web/17_09_55_congreso_307_314.pdf)
- Dekkers J. C. M. 2004. Commercial application of marker and gene assisted selection in livestock; strategies and lessons. *J. Anim.Sci.* 82: E313-E328.
- Dunner S. y Cañón J. 2004. Aplicaciones de Genómica en Laboratorios de Producción Animal. En: <http://www.ucm.es/info/genetvet>.
- DuVerle D., Takigawa I., Ono Y., Sorimachi H., Mamitsuka H. 2010. CaMPDB: A resource for calpain and modulatory proteolysis. *Genome Informatics.* 22: 202-213.
- Ferguson D., Bruce H., Thompson J., Egan A., Perry D., Shorhose W. 2001. Factors affecting beef palatability; from farmgate to chilled carcass. *Aust. J. Exp. Agr.* 41: 879.
- Geesink G. H., Kuchay S., Chishti A. H., Koohmaraie M. 2006.  $\mu$ -Calpain is essential for postmortem proteolysis of muscle proteins. *J. Anim. Sci.* 4: 2834-2840.

- Goll E. D., Thompson F. V., Li H., Wei W., Cong J. 2003. The Calpain System. *Physiol. Rev.* 83: 731–801.
- Guex N. and Peitsch M. C. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis.* 18: 2714-2723.
- Guroff G. 1964. A neutral, calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. *The Journal of Biological Chemistry* 239: 149-155.
- Hauerslev S., Sveen M. L., Duno M., Angelini C., Vissing J. O., Krag T. 2012. Calpain 3 is important for muscle regeneration: Evidence from patients with limb girdle muscular dystrophies. *BMC Musculoskeletal Disorders* 13:43. <http://www.biomedcentral.com/1471-2474/13/43>.
- Herasse M., Ono Y., Fougerousse F., Kimura E., Stockholm D., Beley C., Montarras D., Pinset C., Sorimachi H., Suzuki K., Beckmann S. J., Richard I. 1999. Expression and Functional Characteristics of Calpain 3 Isoforms Generated through Tissue-Specific Transcriptional and Posttranscriptional Events. *Mol. Cell. Biol.* Vol. 19, No. 6. p. 4047–4055.
- Huelsenbeck J. P, Ronquist F: MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 2001, 17: 754–755.
- Kawabata Y., Hata S., Ono Y., Ito Y., Suzuki K., Abe K., Sorimachi H. 2003. Newly identified exons encoding novel variants of p94/calpain 3 are expressed ubiquitously and overlap the alpha-glucosidase C gene. *FEBS Lett.* 555: 623–630.
- Koohmaraie M., Whipple G., Kretchmar D. H., Crouse J. D., Mersmann H. J. 1991. Postmortem proteolysis in longissimus muscle from beef, lamb and pork carcasses. *J. Anim. Sci.* 69: 617-624.
- Krakauer H. A. 2008. Sexual selection and the genetic mating system of wild turkeys. *The Condor* 110(1): 1–12. DOI: 10.1525/cond.2008.110.1.1.
- Kramerova I., Kudryashova E., Wu B., Germain S., Vandenborne K., Romain N., Haller G. R., Verity M. A. and Spencer J. M. 2009. Mitochondrial abnormalities, energy deficit and oxidative stress are features of calpain 3 deficiency in skeletal muscle. *Human Molecular Genetics* 18(17): 3194–3205 doi:10.1093/hmg/ddp257.

- Kramerova I., Kudryashova E., Wu B., Ottenheijm C., Granzier H. and Spencer J. M. 2008. Novel role of calpain-3 in the triad-associated protein complex regulating calcium release in skeletal muscle. *Human Molecular Genetics* 17(21): 3271–3280.
- Laing N. G. and Nowak K. J. 2005. When contractile proteins go bad: the sarcomere and skeletal muscle disease. *BioEssays*. 27: 809-822. Doi:10.1002/bies.20269.
- Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P. A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R.: Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 2007, 23: 2947–2948.
- Lee H. L., Santé-Lhoutellier V., Vigouroux S., Briand Y., Briand M. 2008. Role of Calpains in Postmortem Proteolysis in Chicken Muscle. *Poultry Science* 87: 2126–2132. doi:10.3382/ps.2007-00296.
- Lehninger A. L. 2009. *Principios de Bioquímica*. Omega. Barcelona.
- Leopold S. A. 1990. *Fauna silvestre de México: Aves y mamíferos de caza* 2a ed. Ediciones Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables. México, D.F.
- Liang Z., Demko V., Wilson R. C., Johnson K. A., Ahmad R., Perroud P. F., Quatrano R., Zhao S., Shalchian-Tabrizi K., Otegui M. S., Olsen O., Johansen W. 2013. The catalytic domain CysPc of the DEK1 calpain is functionally conserved in land plants. *The Plant Journal*. Volume 75, Issue 5, pages 742–754.
- Lid S. E., Gruis D., Jung R., Lorentzen J. A., Ananiev E., Chamberlin M., Niu X. M., Meeley R., Nichols S., Olsen O. A. 2002. The defective kernel 1 (dek1) gene required for aleurone cell development in the endosperm of maize grains encodes a membrane protein of the calpain gene superfamily. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99: 5460–5465.
- Łopatniuk P. and Witkowski M. J. 2011. Conventional calpains and programmed cell death. *Acta Biochimica Polonica* 58(3): 287–296. [www.actabp.pl](http://www.actabp.pl)
- 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* 46: 43-56.
- López-Zavala R., Monterrubio-Rico T., Cano-Camacho H., Chassin-Noria O., Aguilera-Reyes U., Zavala-Páramo M. G. 2008a. Caracterización de sistemas de producción

del guajolote doméstico (*Meleagris gallopavo gallopavo*) de traspatio distribuidos en las cinco regiones fisiográficas del Estado de Michoacán, México. *Livestock Research for Rural Development* 20 (5).

López-Zavala R., Monterrubio-Rico T., Cano-Camacho H., Chassin-Noria O., Aguilera-Reyes U., Zavala-Páramo M. G. 2008b. Caracterización de sistemas de producción del guajolote (*Meleagris gallopavo gallopavo*) de traspatio en las regiones fisiográficas del Estado de Michoacán, México. *Téc. Pecu. Méx.* 46(3): 303-316.

López-Zavala R., Monterrubio-Rico T., Cano-Camacho H., Chassin-Noria O., Aguilera-Reyes U., Zavala-Páramo M. G. 2008. Características morfológicas y de producción de guajolotes (*Meleagris gallopavo*) criados en sistemas de traspatio en el Estado de Michoacán, México. *Livestock Research for Rural Development* 20 (5).

Losada H., Rivera J., Cortés J., Castillo A., González R. O., Herrera J. 2006. Un análisis de sistemas de producción de guajolotes (*Meleagris gallopavo*) en el espacio suburbano de la delegación Xochimilco al sur de la Ciudad de México. *Livestock Research for Rural Development* 18 (4) de <http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd18/4/losa18052.htm>

Macqueen D. J. Meischke L., Manthri S., Anwar A., Solberg C., Johnston I. A. 2010. Characterization of capn1, capn2-like, capn3 and capn11 genes in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.): Transcriptional regulation across tissues and in skeletal muscle at distinct nutritional states. *Gene* 453: 45-58.

Mallia J. G. 1998. Indigenous domestic turkeys of Oaxaca and Quintana Roo, Mexico. *Animal Genetic Resources Information* 23: 69-78.

Maruyama K., Matsubara S., Natori R., Nonomura Y., Kimura S., Ohashi K., Murakami F., Handa S., Eguchi G. 1977. Connectin, an elastic protein of muscle. *J. Biochem. (Tokyo)*. 82: 317-337.

Medrano J. A. 2000. Recursos Animales locales del centro de México. *Arch. Zootec.* 49: 385-390.

Melloni E., Aversa M., Stifanese R., De Tullio R., Defranchi E., Salamino F., Pontremoli S. 2006. Association of Calpastatin with Inactive Calpain. A novel mechanism to

control the activation of the protease? *Journal of Biological Chemistry* 281(34): 24945–24954.

Mock K. E., Theimer T. C., Rhodes O. E., Greenberg D. L., Keim F. 2002 Genetic variation across the historical range of the wild turkey (*Meleagris gallopavo*). *Molecular Ecology* 11: 643-657.

Motter M. M., Corva P., Krause M., Perez C. M., Soria L. 2009. Rol de la calpastatina en la variabilidad de la terneza de la carne bovina. *Journal of Basic & Applied Genetics* 20(1): 15-24.

Northcutt J. K., Buhr R. J., Young L. L. 1998a. Influence of preslaughter stunning of turkey breast muscle quality. *Poultry Science* 77: 487-492.

Northcutt J. K., Pringle T. D., Dickens J. A., Buhr R. J., Young L. L. 1998b. Effects of age and tissue type on the calpain proteolytic system in turkey skeletal muscle. *Poultry Science* 77:367-372.

Ojima K., Ono Y., Ottenheijm C., Hata S., Suzuki H., Granzier H. and Sorimachi H. 2011. Non-Proteolytic Functions of Calpain-3 in Sarcoplasmic Reticulum in Skeletal Muscles. *J. Mol. Biol.* 407: 439–449.

Okumura F., Shimogiri T., Shinbo Y., Yoshizawa K., Kawabe K., Mannen H., Okamoto S., Cheng H. H., Maeda Y. 2005. 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: 224–236.

Ono Y., Kakinuma K., Torii F., Irie A., Nakagawa K., Labeit S., Abe K., Suzuki K., Sorimachi H. 2004. Possible Regulation of the Conventional Calpain System by Skeletal Muscle-specific Calpain, p94/Calpain 3. *Journal of Biological Chemistry* 279(4): 2761–2771. <http://www.jbc.org>.

Ono Y., Ojima K., Torii F., Takaya E., Doi N., Nakagawa K., Hata S., Abe K., Sorimachi H. 2010. Skeletal muscle-specific calpain is an intracellular Na<sup>+</sup>-dependent protease. *J. Biol. Chem.* 285 (30): 22986-22998.

- Ono Y., Torii F., Ojima K., Doi N., Yoshioka K., Kawabata Y., Labeit D., Suzuki K., Abe K., Maeda T., Sorimachi H. 2006. Suppressed disassembly of autolyzing p94/CAPN3 by N2A connectin/titin in a genetic reporter system. *J. Biol. Chem.* 281: 18519-18531.
- Pal G. P., Elce J. S., Jia Z. 2001. Dissociation and aggregation of calpain in the presence of calcium. *J. Biol. Chem.* 276: 47233-47238. doi: 10.1074/jbc.M105149200.
- Richard I., Broux O., Allamand V., Fougerousse F., Chiannikulchai N., Bourg N., Brenguier L., Devaud C., Pasturaud P., Roudaut C., Hillaire D., Passos-Bueno M. R., Zats M., Tischfield J. A., Fardeau M., Jackson C. E., Cohen D., Beckmann J. S. 1995. Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell* 81: 27-40.
- Sanger F. and Coulson A. R. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 94: 441-448.
- Sarparanta J., Blandin G., Charton K., Vihola A., Marchand S., Milic A., Hackman P., Ehler E., Richard I., Udd B. 2010. Interactions with M-band Titin and Calpain 3 link myospryn (CMYA5) to tibial and Limb-girdle muscular dystrophies. *The Journal of Biological Chemistry* 285(30): 30304-30315.
- Snyder S. A. 2007. *Meleagris gallopavo*. In: fire effects information system, [on line]. U. S. Department of agriculture, forest service. Rocky mountain research station, fire sciences laboratory (producer) available from: <http://www.fs.fed.us/database/feis/>
- Sorimachi H., Hata S., Ono Y. 2011. Calpain chronicle—an enzyme family under multidisciplinary characterization. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* 87. doi: 10.2183/pjab.87.287.
- Sorimachi H., Hata S., Ono Y. 2011. Impact of genetic insights into calpain biology. *J. Biochem* 150(1): 23–37. doi:10.1093/jb/mvr070.
- 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., Imajoh-Ohmi S., Emori Y., Kawasaki H., Ohno S., Minami Y., 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 (33): 20106-20111.

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 (33): 20106-20111.

Sorimachi H., Tsukahara T., Okada-Ban M., Sugita H., Ishiura S., Suzuki K. 1995. Identification of a third ubiquitous calpain species-chicken muscle expresses four distinct calpains. *Biochimica et Biophysica Acta* 1261: 381-393.

Stangel P. W., Leberg P. L., Smith J. I. 1992. Systematics and population genetics. In *The Wild Turkey: Biology and Management*. Ed Dickinson J. G. Stackpole Books, Harrisburg. Pages 18-28.

Stemmer W. P. C. 1991. A 20-minute ethidium bromide/high-salt extraction protocol for plasmid DNA. *BioTechniques* 10, 726.

Stockholm D., Herasse M., Marchand S., Praud C., Roudaut C., Richard I., Sebille A., Beckmann S. J. 2001. Calpain 3 mRNA expression in mice after denervation and during muscle regeneration. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:C1561-C1569.

Suzuki K., Hata S., Kawabata Y., Sorimachi H. 2004. Structure, activation, and biology of calpain. *The American Diabetes Association* 53 (1).

Swofford D: *Swofford: PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony...* - *Google Scholar*. Sinauer; 2003.

Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S.: MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 2007, 24: 1596 -1599.

Taveau M., Bourg N., Sillon G., Roudaut C., Bartoli M., Richard I. 2003. Calpain 3 is activated through autolysis within the active site and lyses sarcomeric and sarcolemmal components. *Molecular and Cellular Biology* 23(24): 9127-9135. DOI: 10.1128/MCB.23.24.9127-9135.2003.

Torner L., Nava G., Dueñas Z., Corbacho A., Mejía S., López F., Cajero M., Martínez de la Escalera G., Clapp C. 1999. Changes in the expression of neurohypophyseal

prolactins during the estrous cycle and after estrogen treatment. *Journal of Endocrinology* 161: 423–432. 0022–0795/99/0161–423.

Uzcátegui-Bracho S. y Jerez-Timaure N. 2008. Factores que afectan la actividad de las proteasas dependientes del calcio y su relación con el proceso de ablandamiento de la carne. *Asociación Latinoamericana de Producción Animal*. Vol. 16, No. 3: 166-174.

Valadez A. R., García C. R., Rodríguez G. B., Gamboa C. L. 2001 Los guajolotes y la alimentación prehispánica. *Ciencia y Desarrollo* 157: 55-63.

Van Eenennaam A. 2004. Marker-Assisted selection in beef cattle. Sierra Foothill Research & Extension Center. [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)

Werner C., Riegel J., Wicke M. 2008. Slaughter performance of four different turkey strains, with special focus on the muscle fiber structure and the meat quality of the breast muscle. *Poultry Science* 87:1849-1859.

Zhang Y., Zhang X., O’Hare T. H., Payne W. S., Dong J. J., Scheuring C. F., Zhang M., Huang J. J., Lee M. K., Delany M. E., Zhang H. B., Dodgson J. B. 2011. A comparative physical map reveals the pattern of chromosomal evolution between the turkey (*Meleagris gallopavo*) and chicken (*Gallus gallus*) genomes. *BMC Genomics* 12: 447. doi:10.1186/1471-2164-12-447.

Zhang Z. R., Liu Y. P., Jiang X., Du H. R., Zhu Q. 2008. Study on association of single nucleotide polymorphism of CAPN1 gene with muscle fibre and carcass traits in quality chicken populations. *J. Anim. Breed Genet.* 125(4): 258-264.

Zhang Z. R., Liu Y. P., Yao Y. G., Jiang X. S., Du H. R., Zhu Q. 2009. Identification and association of the single nucleotide polymorphisms in calpain3 (CAPN3) gene with carcass traits in chickens. *BMC Genetics* 10:10. <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/10/10>.

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