



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS
ASOCIADOS A LA CALIDAD DE LA CARNE
EN LA CUENCA DEL PAPALOAPAN DEL
ESTADO DE OAXACA**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRIA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

BIOL. CARMEN MONSERRAT DESGARENNES ALCALA

ASESOR DE TESIS:

D. PH. JOSÉ ABAD ZAVALA

CO-ASESOR DE TESIS:

DRA. SANDRA TRINIDAD DEL MORAL VENTURA

TUXTEPEC, OAXACA, DICIEMBRE DE 2014

DEDICATORIA

Primeramente a Dios por las bendiciones recibidas y la oportunidad de alcanzar mis metas y ser mejor ser humano.

A mi Madre María Lorena por haberme apoyado en todo momento y ser un ejemplo junto con papi Ángel gracias los amo.

A mis hermanos Dony, Geluz, Lalo, Coco y mis niños por animarme a seguir adelante y ser mi apoyo moral en los momentos más difíciles los amo.

A mi Esposo Pedro por apoyarme y estar conmigo en esta aventura gracias te amo.

A mi Pedrito hijo gracias por estar junto conmigo y acompañarme en esta etapa de mi vida la cual disfrute mucho contigo a mi lado desde mi vientre, mi bebe no pudo ser más perfecta, lo mejor en mi vida es tu compañía, gracias te amo.

A mis compañeros y amigos Marianita, Marlene, Sandra, Alejandro, y Amado gracias por la oportunidad de vivir esta etapa de mi vida y convivirla con ustedes.

A mis asesores, el Dr. José Abad y la Dra. Sandra del Moral gracias por el apoyo, el tiempo que me dedicaron con paciencia despejando mis dudas,

AGRADECIMIENTOS

A mi Esposo y a mi hijo por estar a mi lado en esta etapa.

A mi Madre, a mis hermanos y sobrinos por apoyarme y estar conmigo, gracias por sus consejos.

A la Universidad del Papaloapan por la oportunidad de formarme como profesional y por permitirme lograr un triunfo más en la vida.

Al Dr. Rafael por apoyarme y ayudarme con mis experimentos.

Al Dr. Guillermo por todo y a mis profesores por su dedicación y vocación en la enseñanza dándome la oportunidad de aprender nuevas cosas y ser una mejor profesionista.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO


San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca a 28 de Octubre de 2014

LP Yesenia Barrientos Arenal
Jefa de Servicios Escolares
Universidad del Papaloapan

Sirva la presente para informarle que el jurado para el examen para obtener el grado de Maestro en Biotecnología de la I. A. Carmen Monserrat Desgarenes Alcalá, matrícula 12140002, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título “Identificación de polimorfismos asociados a la calidad de la carne en la Cuenca del Papaloapan del Estado de Oaxaca” para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

Sin otro asunto en particular me despido quedando atento ante cualquier duda o aclaración

Atentamente,


Dr. Guillermo Ramírez Galicia
Jefe de la División de Estudios de Posgrado
Cubículo 10. gramirez@unpa.edu.mx, memorgal@gmail.com



Cep IA Carmen Monserrat Desgarenes Alcalá
Cep Archivo

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax. Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax. Tel. 01(281)8729230



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Tuxtepec, Oaxaca a 5 de septiembre de 2014

I. A. Carmen Monserrat Desgarenes Alcalá
Estudiante de la Maestría en Biotecnología
Universidad del Papaloapan

Por este medio le informo que el jurado para su examen para obtener el grado en Maestro en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores

Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa	UNPA	Presidente
Dr. Julián Mario Peña Castro	UNPA	Vocal
Dr. Víctor Manuel Meza Villalvazo	UNPA	Secretario
Dr. Alfredo Trejo Córdoba	UNPA	1er Suplente
Dr. Enrique Villalobos Amador	UNPA	2o Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente



Dr. Guillermo Ramírez Galicia
Jefe de la División de Estudios de
Posgrado



M en C. Héctor López Arjona
Vice-rector Académico
VoBo
VICE-RECTORIA
ACADEMICA

Ccp Dr. José Abad Zavaleta Asesor
Ccp Dra. Sandra Trinidad del Moral Ventura Co-asesor
Ccp Archivo

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax. Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax. Tel. 01(281)8729230

ÍNDICE

	Pag.
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ANEXOS	X
ABREVIATURAS	XI
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISION DE LITERATURA	4
3.1. Historia y generalidades de los bovinos	4
3.2. Situación de la ganadería en México	4
3.3. Papel del sistema de calpaínas, en las características de la importancia económica del ganado bovino	5
3.4. Estructura de las calpaínas	7
3.5. Estructura de calpastatina	8
3.6. Regulación de las calpaínas	8
3.7. La calpastatina como regulador de la acción de calpaínas	10
3.8. CAPN/CAST y su papel en el desarrollo del músculo	11
3.9. Poliformismos en los genes de μ-calpaina y calpastatina y su utilidad a nivel comercial	13
4. JUSTIFICACIÓN	16
5. MATERIALES Y METODOS	18
5.1. Toma de muestras de sangre	18
5.2. Amplificación de Productos de PCR	18
5.3. Genotificación	19

5.4. Análisis estadístico.....	20
6. RESULTADOS.....	21
6.1. Polimorfismos de CAPN1.....	21
6.2. Polimorfismos de CAST.....	25
7. DISCUSIÓN.....	28
8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	32
9. LITERATURA CITADA.....	33

ÍNDICE DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la identificación de SNP, CAPN1 y CAST.....	19
Tabla 2. Ubicación genómica y patrón de restricción esperado de los marcadores moleculares <i>CAPN1 316</i> , <i>CAPN1 530</i> y <i>CAST</i>	20
Tabla 3. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas y esperadas en bovinos de doble propósito.....	22
Tabla 4. Frecuencias genotípicas y alélicas de CAPN1-530 observadas y esperadas en bovinos de doble propósito.....	24
Tabla 5. Frecuencias genotípicas y alélicas de CAST observadas y esperadas en bovinos de doble propósito.....	26

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Interacción entre calpastatina y μ -calpaína. IV y VI.....	11
Figura 2. Localización (*) de los marcadores moleculares (SNP) identificados en el gen <i>CAPN1</i>	15
Figura 3. Genotipificación del gen <i>CAPN1-316</i> en bovinos de doble propósito con electroforesis en un gel de agarosa al 3%.....	21
Figura 4. Frecuencia alélica global para el SNP <i>CAPN1-316</i> (n=105).....	22
Figura 5. Frecuencia genotípica global para el SNP <i>CAPN1-316</i> (n=105).....	23
Figura 6. Genotipificación del gen <i>CAPN1-530</i> en bovinos de doble propósito con electroforesis en un gel de agarosa al 3%.....	24
Figura 7. Frecuencia genotípica global para el SNP <i>CAPN1-530</i> (n=45).....	25
Figura 8. Frecuencia alélica global para el SNP <i>CAPN1-530</i> (n=45).....	25
Figura 9. Genotipificación del gen <i>CAST</i> en bovinos de doble propósito con electroforesis en un gel de agarosa al 3 %.....	26
Figura 10. Frecuencia genotípica global para el SNP <i>CAST</i> (n=120). El genotipo de mayor frecuencia fue el CC (32.00 %) seguido por GC (28.00 %), siendo el AA (4.00 %) el menos común.....	27
Figura 11. Frecuencia alélica global para el SNP <i>CAST</i> (n=120). El alelo G (68.00 %) se encontró en mayor frecuencia en la población muestreada ($X^2P = 0.9803$).....	27

ANEXOS

	Pág.
ANEXO 1. MANUAL DE KIT DE EXTRACCION DE ÁCIDOS NUCLEI- COS.....	40
ANEXO 2. SECUENCIA DE3L GEN CAPN1.....	44
ANEXO 3. SECUENCIA DEL GEN CAST.....	46

ABREVIATURAS

μ-CAPN: μ-calpaina

CAST: gen que codifica para calpastatina

CAPN1-316 CC: Genotipo CC del gen *CANPN1-316* (Homocigoto dominante)

CAPN1-316 BGG: Genotipo GG del gen *CAPN1-316* (Homocigoto recesivo)

CAPN1-316 AB: Genotipo GC del gen *CAPN1-316* (Heterocigoto)

CAPN1-530 AA: Genotipo AA del gen *CANPN1-530* (Homocigoto dominante)

CAPN1-530 GG: Genotipo GG del gen *CAPN1-530* (Homocigoto recesivo)

CAPN1-530 GA: Genotipo GA del gen *CAPN1-530* (Heterocigoto)

CAST CC: Genotipo AA del gen *CAST* (Homocigoto dominante)

CAST GG: Genotipo GG del gen *CAST* (Homocigoto recesivo)

CAST GA: Genotipo GA del gen *CAST* (Heterocigoto)

kb: kilobases

pb: pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

RFLP: Polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción de ADN
(Restriction Fragment Length Polymorphism)

PCR-RFLP: Reacción en cadena de la polimerasa – polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción de ADN.

RESUMEN

IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS ASOCIADOS A LA CALIDAD DE LA CARNE EN LA CUENCA DEL PAPALOAPAN DEL ESTADO DE OAXACA.

Con el objetivo de determinar las frecuencias alélicas de los genes *CAPN1* y *CAST* en bovinos de doble propósito, se tomaron muestras de plasma sanguíneo a 331 bovinos de doble propósito en la región de la Cuenca del Papaloapan del estado de Oaxaca. A partir del material genético extraído, se amplificaron con los marcadores *CAPN1-316*, *CAPN1-530* y *CAST*. Las pruebas de RFLP's en los marcadores *CAPN1-316*, *CAPN1-530* y *CAST* se realizaron utilizando las enzimas de restricción *Btg I*, *Ava II* y *Rsa I*, para el diagnóstico de los alelos C-G, A-G y C-G de los marcadores, respectivamente. Las frecuencias genotípicas obtenidas para *CAPN1-316* correspondieron a 0.03, 0.86 y 0.11 para los homocigotos AA, GG, y para el heterocigoto GA, respectivamente. Las frecuencias alélicas fueron 0.86 y 0.14 para el alelo G y A, respectivamente. Para el marcador *CAPN1-530* las frecuencias genotípicas fueron de 0.02, 0.85 y 0.13 para CC, GG y GC, respectivamente, con una frecuencia alélica de 0.85 para G y 0.15 para el alelo C. Las frecuencias obtenidas para el marcador *CAST* fueron de 0.32, 0.28 y 0.4 para CC, GG y GC, respectivamente, con una frecuencia alélica de 0.68 para el alelo G y 0.32 para el alelo C. La población en estudio no se encuentra en equilibrio Hardy Weinberg. El valor de χ^2P con dos grados de libertad fue de 0.964, 0.985 y 0.9803 para *CAPN1-316*, *CAPN1530* y *CAST*, respectivamente.

Palabras clave: Bovinos de doble propósito, frecuencias genotípicas, *CAPN1*, *CAST*, Terneza de la carne.

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF POLYMORPHISM ASSOCIATED WITH THE QUALITY OF MEAT ON THE BASIN STATE OF OAXACA PAPALOAPAN.

With the objective of determining the gene allele frequencies *CAPN1* y *CAST* in double purpose bovines, samples of blood plasma were extracted from 331 double purpose bovines. These materials were used to amplify the markers *CAPN1-316*, *CAPN1-530* y *CAST*. RFLP tests were performed using the restriction enzyme *Btg I* to diagnose alleles A and G of the *CAPN1* gene, *Ava II* to diagnose alleles C and G of the *CAPN1-530* gene, and *Rsa I* to diagnose alleles C and G the *CAST* gene. The genotype frequencies obtained were found to be 0.03, 0.86 and 0.11 for homozygote AA, GG, and heterozygous GA, respectively, for the case of the *APN1-316* gene. The allele frequencies were 0.86 and 0.14 for alleles G and A, respectively. The genotype frequencies obtained were found to be 0.03, 0.85 and 0.13 for homozygote CC, GG and heterozygous GC, respectively, for the *CAPN1-530* gene. The allele frequencies were 0.15 and 0.85 for alleles C and G. The genotype frequencies obtained were found to be 0.32, 0.28 and 0.4 for homozygote CC, GG and heterozygous GC, respectively, for the *CAST* gene. The allele frequencies were 0.68 and 0.32 for alleles G and C, respectively. The population studied is not found to be in Hardy Weinberg equilibrium, the χ^2P value with two degrees of freedom was 0.964, 0.985 and 0.9803 to *CAPN1-316*, *CAPN1530* and *CAST* respectively.

Keywords: Double purpose bovines, genotype frequencies, *CAPN1*, *CAST*, Meat tenderness.

1. INTRODUCCIÓN

La carne es el tejido animal, principalmente muscular, que se consume como alimento, siendo la ternura o suavidad de la carne uno de los rasgos importantes en la producción de ganado de carne, ya que los consumidores la consideran como el atributo más importante de la palatabilidad de carne (Soria *et al.* 2010).

La demanda en países en desarrollo de productos pecuarios como la carne, es elevada. Por ejemplo, en México el consumo de carne bovina per cápita es de 17 kilogramos (Financiera Rural, 2012). Esto ha propiciado una inminente intensificación de los sistemas de producción, los cuales serán dependientes de especies élite altamente productivas y con mejor calidad de sus productos (FAO, 2003). Adicionalmente, la demanda de carne es cada vez más exigente en cuanto a cantidad y calidad, y para mejorar este aspecto cuantitativo de la producción animal es necesaria la selección de individuos genéticamente superiores de las especies de interés zootécnico destinadas a la producción.

El desarrollo de la biotecnología genómica en el área animal se ha promovido como una realidad necesaria en México, y sus objetivos se enfocan fundamentalmente en el desarrollo, establecimiento e implementación de técnicas y métodos moleculares en beneficio de los sistemas pecuarios del país (Parra-Bracamonte *et al.*, 2011). Esta disciplina ha evolucionado desde la identificación de fragmentos cortos de ADN hasta secuenciación del genoma entero de un organismo (Fadiel *et al.*, 2005), como es el caso de los bovinos. Los avances en dicha área han revolucionado las prácticas agropecuarias identificando genes asociados a características de importancia económica.

Existe una amplia evidencia que la proteólisis *posmortem* de las proteínas miofibrilares son responsables de la disminución del esfuerzo al corte durante el

almacenamiento (Soria *et al.*, 2010). La degradación proteolítica que ocurre durante la conversión de músculo a carne en el período de almacenamiento de la canal, a temperaturas de refrigeración, es regulada principalmente por el sistema de proteínas calpaina/calpastatina (CAPN/CAST) (Juszczuk *et al.*, 2007). CAST es una proteína inhibidora de la actividad de CAPN (Goll *et al.*, 1992). Las CAPN se encuentran en todos los tejidos y varía su concentración dependiendo del microambiente celular. Goll *et al.* (2003) sugieren que estas enzimas tienen diversas funciones dependiendo de la región donde se encuentren. En el músculo esquelético existen dos isoformas: μ -CAPN y m-CAPN las cuales se encargan de la degradación de las proteínas miofibrilares durante el almacenamiento *post-mortem* de la carne, pero también han sido implicadas en actividades a nivel celular como la transmisión de señales, apoptosis (muerte celular programada), regulación de ciclos, dispersión, anclaje, motilidad, invasión de tejido, la miogénesis la migración del mioblasto y su fusión para formar el miotubo. (Atencio *et al.*, 2000; Carragher *et al.*, 2002; Dedieu *et al.*, 2004; Leloup *et al.*, 2006)

Dada la importancia del sistema proteolítico CAST/CAPN y su relación con la ternura de la carne, el objetivo de este trabajo estimar la variabilidad de los genes asociados a la calidad de la carne (CAPN1 y CAST) en el ganado bovino de doble propósito de la región del Papaloapan, utilizando nuevas herramientas moleculares para la selección genética.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL:

Estimar la variabilidad de los genes asociados a la calidad de la carne (CAPN1 y CAST) en el ganado bovino de doble propósito de la región del Papaloapan, utilizando nuevas herramientas moleculares para la selección genética.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Diseñar oligonucleótidos para amplificación de los marcadores CAPN1 Y CAST
2. Determinar las variantes genéticas de los genéticas de los marcadores CAPN1 Y CAST
3. Determinar si la población se encuentra en equilibrio Hardy Weinberg.
4. Analizar la población genética con base en los marcadores.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Historia y generalidades de los bovinos

El ganado vacuno perteneciente al Género *Bos* se domesticó por el hombre como animal de trabajo durante el período Neolítico en Europa y Asia, evolucionando como especie dedicada a usos más complejos. Las diferentes razas europeas de *Bos taurus* y las que tienen su origen en Asia *Bos indicus*, se difundieron en todo el mundo para aprovechar su producción de carne y leche (ASERCA, 1995).

Los bovinos se desarrollaron en el subcontinente indio y sólo se propagaron a otras partes de Asia, al norte de África y Europa tras la glaciación hace unos 20,000 años. Se pueden distinguir dos subtipos: el jorobado *Bos primigenius namadicus* (antepasado de los cebúes actuales) y el *Bos primigenius primigenius* que carecía de joroba y dio lugar a los bovinos europeos actuales (Phillips, 2003). Los bovinos domésticos fueron desarrollados a partir de los salvajes *Bos primigenius* hace unos 8000-10000 años en el medio oriente, con el objetivo de tener leche y carne.

3.2. Situación de la ganadería en México

En México, el ganado bovino deriva en gran parte del ganado español introducido por los conquistadores, aunque hoy en día podemos observar un alto grado de cruces de *Bos taurus* y *Bos indicus* que se introdujeron en los años 70's. El ganado lechero es predominante de razas europeas, mientras que las razas de carne son originarias de recientes importaciones de ganado americano y brasileño. Los animales más cercanos al ganado introducido por los españoles, son los denominados criollos puros, que ahora se encuentran en las regiones más remotas

del país y que son capaces de soportar condiciones desérticas y alimentarse por romaneo y de hierbas. Los más comunes son los criollos mixtos, que resultan de la cruce de los primeros con las variedades europeas, americanas y asiáticas de ganado bovino (Álvarez-Romero y Medellín, 2005).

Dentro del ganado bovino nacional se encuentran las razas de Beefmaster, Hereford, Romagnola, Belga azul, Holstein Friesian, Salers, Bradford, Indobrasil, Santa Gertrudis, Brahaman, Jersey, Simental, Brangus, Angus, Hereford, Limusine, Tuli, Charolais, Marchigiana, Tropicarne, Droughtmaster, Nellore, Gyr y Pardo Suizo, ampliamente distribuido por todo el país.

La ganadería bovina se destaca por su importancia comercial y se practica de forma extensiva en Veracruz, Jalisco y Chiapas, donde se concentran el 30 % de las existencias nacionales (9,049,249 cabezas). Adicionalmente, Michoacán, Oaxaca, Sinaloa y Tabasco producen prácticamente el 55 % de la población bovina nacional. De aquí una buena parte se destina a la exportación, principalmente a Estados Unidos. En el resto, la ganadería se orienta de forma general a satisfacer la demanda del mercado interno (SAGARPA 2011).

En la región del Papaloapan del estado de Oaxaca se produce el 25.2 % (19 714 ton) de carne y 16.8 % (24 503 L) de leche de ganado bovino en el estado, siendo la principal región productora de leche y carne del estado (INEGI 2008).

3.3. El papel del sistema de Calpaínas, en las características de la importancia económica del ganado bovino

La degradación proteolítica del músculo que ocurre durante la conversión de músculo a carne en el período de almacenamiento de la carcasa a temperaturas de refrigeración es regulada principalmente por el sistema de CAPN/CAST (Koohmarie *et al.*, 1994; Juszczuk *et al.*, 2007).

Las CAPN son proteínas heterodiméricas que constan de una subunidad catalítica grande (80 kDa) y una regulatoria pequeña (28 kDa). La actividad de estas proteasas es regulada por CAST, una proteína inhibidora de CAPN (Murachi, 1984; Goll *et al.*, 1992). La familia de las CAPN consiste de al menos 16 enzimas diferentes (Franco *et al.*, 2005), que pueden ser típicas o atípicas (con o sin la subunidad EF1) dependiendo del tejido de procedencia. A pesar de que los miembros de esta familia se encuentran en todos los tejidos, las CAPN varían en cuanto a su concentración dependiendo del micro-ambiente celular. Las enzimas proteolíticas, tienen funciones diferentes según la región donde se encuentran (Goll *et al.*, 2003).

En el músculo esquelético existen dos isoformas principales: μ -CAPN y m-CAPN (Goll *et al.*, 2003). Además, de su rol en la degradación de las proteínas miofibrilares durante el almacenamiento *post-mortem* de la carne, han sido implicadas en actividades importantes a nivel celular como son la transmisión de señales, apoptosis (muerte celular programada), regulación de ciclos, dispersión, anclaje, motilidad, e invasión de tejido por la célula (Atencio *et al.*, 2000; Carragher *et al.*, 2002; Dedieu *et al.*, 2004). En relación a la miogénesis, Leloup *et al.*, (2007) demostraron que las CAPN juegan un rol crítico en las etapas tempranas de este fenómeno como en la migración del mioblasto y su fusión para formar el miotubo.

La calidad de la carne del ganado *Bos indicus* se ha calificado como pobre en términos de suavidad en comparación con la de razas *Bos taurus* (Marshall, 1999), debido a la ausencia de copias de alelos favorables del gen de la calpaína (Page *et al.*, 2004; Casas *et al.*, 2005; White *et al.*, 2005) o a una mayor actividad de la proteína endógena inhibidora de la actividad de la calpaína, la calpastatina, (Pringle *et al.*, 1997). Dentro de la raza, los factores genéticos controlan solo el 30

% de la variación de la terneza. Este 30 % representa la heredabilidad (efecto de genes aditivos) de esta característica. En consecuencia, dentro de una raza, el 70 % de la variación se explica por factores ambientales y efectos de genes no aditivos (Fernández, 2005).

3.4. Estructura de las calpaínas

El sistema de CAPN consta primordialmente de 2 proteasas ricas en cisteína las cuales dependen de la presencia de calcio (Ca^{2+}) para ser activadas (Goll *et al.*, 2003). La secuencia de aminoácidos de μ - y m -CAPN en vertebrados conserva su identidad hasta en un 90% (DeLuca *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 2001) indicando que ésta secuencia es de gran importancia fisiológica. Existen hasta cuatro dominios de CAPN enzimáticamente activos (Hosfield *et al.*, 1999; Strobl *et al.*, 2000; Sorimachi y Suzuki, 2001; Pal *et al.*, 2003). Franco *et al.*, (2005) determinaron que el dominio I es una α -hélice sencilla presente en el terminal N de algunas CAPN. Este puede interactuar con los dominios VI de subunidades no catalíticas y pueden ser importantes para la estabilidad de la proteína. El dominio II, contiene la triada catalítica Cys¹⁰⁵, His262 y Asn286. Al momento de la activación, estos tres residuos se cambian y son alineados en un espacio preciso debido a cambios estructurales que se llevan a cabo (Franco *et al.*, 2005). El dominio III consiste de ocho láminas β superpuestas una encima de la otra (Franco *et al.*, 2005)

Esta región se encuentra envuelta en el enlace de Ca^{2+} y fosfolípidos (Tompa *et al.*, 2001). El dominio IV y VI en las subunidades catalíticas y regulatorias contienen cinco subunidades EF, los cuales interactúan para ensamblarse con otras moléculas para hacer heterodímeros (Blanchard *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1997; Hosfield *et al.*, 1999). El dominio V de la subunidad regulatoria aparenta tener una

estructura flexible a consecuencia de tener un alto contenido de glicina, a lo que probablemente se deba que no se haya podido estudiar por cristalografía (Franco *et al.*, 2005).

3.5. Estructura de calpastatina

La calpastatina (CAST) inhibe únicamente a μ - y n-CAPN (Goll *et al.*, 2003). Para verificar este hecho, su actividad se ha probado en otras proteasas ricas en cisteína como papaína, catepsína B, bromelína y ficína (Crawford *et al.*, 1990), sin embargo no se ha encontrado ningún tipo de inhibición. CAST se encuentra conformada por hélices aleatorias (Konno *et al.*, 1997). La evidencia disponible indica que CAST es un monómero en solventes no-denaturalizantes y funciona como tal en células del músculo (Otsuka y Goll, 1987). Al igual que sus sustratos, la actividad de CAST depende de la presencia de Ca^{2+} . La estructura de la calpastatina consta de cuatro secuencias repetidas homólogas a un intervalo de 140 aminoácidos (dominios I, II, III y IV) y un dominio L en el N-terminal. Posee tres regiones altamente conservadas dentro de los dominios I-IV, los cuales son responsables por la inhibición, donde una molécula de CAST puede neutralizar varias de CAPN1 (Lonergan, 1999). El dominio L no tiene efecto inhibitorio de CAPN1, pero se ha sugerido que es importante para la interacción con proteínas de la membrana celular como las que componen los canales L de Ca^{2+} (Kameyama *et al.*, 1998). La región N-terminal contiene 68 aminoácidos en el Dominio XL y tiene tres sitios potenciales para la fosforilación de AMP cíclico (Cong *et al.*, 1998).

3.6. Regulación de las calpaínas

La actividad de CAPN está regulada por diversos mecanismos. El más estudiado de estos es el de activación por Ca^{2+} , de aquí se deriva el nombre de estas proteasas (Guroff, 1964). Las proteasas μ - y m- CAPN, no existen en células

vivas en los niveles requeridos para la activación de los dominios proteolíticos por Ca^{2+} . Por ello se teoriza que un mecanismo regulador de la actividad de esta proteasa disminuye los requerimientos de Ca^{2+} *in vivo* (Franco *et al.*, 2005). Al activarse, las subunidades catalíticas de algunas CAPN son autolizadas. Cuando las CAPN se activan se remueve el dominio I y se libera el enlace entre el terminal N de las subunidades catalíticas y regulatorias. Con esta modificación, se permite el movimiento libre del dominio II (el dominio catalítico) (Molinari *et al.*, 1994; Baki *et al.*, 1996; Elce *et al.*, 1997; Guttman *et al.*, 1997; Suzuki y Sorimachi, 1998).

La unidad catalítica activa tiene un requerimiento menor de Ca^{2+} (Suzuki *et al.*, 1981b; Imajoh *et al.*, 1986; Baki *et al.*, 1996; Suzuki y Sorimachi, 1998). Sin embargo, el requerimiento es solo para la progresión de la catálisis y no para la activación (Franco *et al.*, 2005). El enlace a fosfolípidos también disminuye el requerimiento de Ca^{2+} *in vitro* (Saido *et al.*, 1992; Suzuki *et al.*, 1992; Tompa *et al.*, 2001), pero se desconoce su relevancia *in vivo*.

Desde la caracterización de m-CAPN ha sido claro que la concentración de Ca^{2+} requerida para activar dicha enzima (400–800 μM) es mucho más alta que la existente en células normales, la cual es de 300–400 *nM* (Jacquemond, 1997; Maravall *et al.*, 2000). Enzimáticamente, μ -CAPN solamente trabaja bajo la presencia de concentraciones micromolares de Ca^{2+} . Kaprell y Goll (1989) encontraron que en bovinos μ -CAPN enlaza 5-8 iones de Ca^{2+} , mientras que m-CAPN enlaza a 11-20.

Estas condiciones son importantes para determinar el modo de acción de dichas enzimas y su actividad en distintas etapas fisiológicas del animal y de la maduración de la carne. Sin embargo, la enzima proteolítica principal involucrada en la degradación miofibrilar es μ -CAPN.

Durante el almacenamiento *postmortem* de la carne a temperaturas de refrigeración (maduración), la actividad de m-CAPN permanece constante o disminuye levemente durante los primeros 7 días. Sin embargo, la actividad de μ -CAPN disminuye luego de 3 días de maduración (Camou *et al.*, 2007). Experimentos utilizando a ratones carentes del gen de μ -CAPN mostraron poca degradación de nebulina, distrofina, metavinculina, desmina y troponina T durante este periodo.. La degradación de estas proteínas por CAPN ha sido vinculada con el enternecimiento de la carne (Geesink *et al.*, 2006). Estos hallazgos y aquellos que demuestran que μ -CAPN, no m-CAPN es responsable de la proteólisis *postmortem* del músculo indican que es factor para enternecimiento de la carne durante el proceso de maduración (Koohmarie, 1996; Geesink y Koohmariaae, 2000; Geesink *et al.*, 2006).

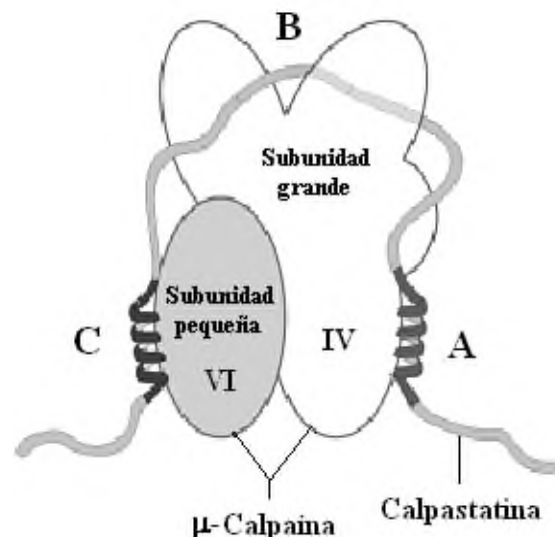
3.7. Calpastatina como reguladora de la calpaína.

Diversos estudios cinéticos han demostrado que la calpastatina es un inhibidor competitivo de dos proteasas dependientes de Ca^{2+} , la μ -CAPN y la m-CAPN (Eimori *et al.*, 1988). Las calpaínas, principales enzimas proteolíticas del músculo (Killefer *et al.*, 1994), son heterodímeros compuestos por la misma subunidad pequeña (28 kDa) y diferente subunidad grande. La subunidad pequeña (con función regulatoria) contiene dos dominios denominados: V y VI y la subunidad grande (con función catalítica) comprende cuatro dominios: I, II, III y IV.

La subunidad grande posee una homología del 55-65 % entre ambas calpaínas (μ -CAPN y m- CAPN) (Sorimachi y Suzuki, 2001). En presencia de Ca^{2+} una molécula de calpastatina puede inhibir hasta cuatro moléculas de calpaína (Cong *et al.*, 1998). Este ión es esencial para que esta interacción se produzca, ya que en presencia del mismo se forman α -hélices en los subdominios A y C de la

calpastatina (Yang et al., 1994) y se evidencian estructuras abiertas en la superficie de los dominios IV y VI de las calpaínas, promoviendo la interacción entre ambas proteínas (Todd et al., 2003). Los subdominios A (Ser 15 a Gly 29) y C (Ile90 a Thr109) de la calpastatina se asocian a los dominios IV y VI de las calpaínas respectivamente, quedando el subdominio B próximo al sitio activo de las CAPN (IIa y/o IIb) bloqueando el acceso de los sustratos al mismo (Figura 1). (Pfizer et al., 2008, Kiss et al., 2008).

Figura 1. Interacción entre CAST y μ -CAPN. IV y VI: dominios de la μ -CAPN en contacto



con los subdominios A y C de la CAST, respectivamente. El subdominio B de la CAST interactúa con los dominios I y II de la μ -CAPN (adaptada de Kiss et al., 2008)

3.8. CAPN/CAST y su papel en el desarrollo del músculo

Kosower et al. (1990) demostraron que la relación de CAPN/CAST determina el potencial de fusión entre células. En mioblastos de rata L8, se ha encontrado que los niveles de CAPN no cambian significativamente durante la diferenciación, mientras que los niveles de CAST disminuyen antes de la fusión de éste, reapareciendo pasada dicha etapa. La disminución de CAST permite la activación de CAPN por niveles adecuados de Ca^{2+} , induciendo la proteólisis requerida para la

fusión del mioblasto (Baroy *et al.*, 2005). Estudios previos demostraron que los roles de μ -CAPN y m-CAPN no cambian significativamente durante la diferenciación del mioblasto, sin embargo la expresión de CAST inhibió la fusión de los mismos, deteniendo su formación en miotubos (Barnoy *et al.*, 1996; Kent *et al.*, 2004). La actividad de las CAPN, en adición a su función en la desorganización de la membrana celular, está involucrada en la activación de transcripción de ciertos factores miogénicos (Barnoy *et al.*, 2005). La proporción CAPN/CAST es importante en la regulación de la expresión de estos factores de transcripción incluyendo la miogenina (Barnoy *et al.*, 2005). La miogenina es un factor de transcripción que determina la iniciación y mantenimiento del programa de miogénesis (Barnoy *et al.*, 2005). Esta es activada durante el cese de la división celular y sirve como un marcador de diferenciación del mioblasto y de la formación del miotubo (Olson y Molkenin, 1996; Conway *et al.*, 2004).

La sobre expresión de CAST ha sido utilizada para estudiar las funciones de CAPN en: degradación proteica musculoesquelética, motilidad y dispersión celular (Potter *et al.*, 1998; Dedieu *et al.*, 2003), crecimiento del fibroblasto (Xu *et al.*, 2002), ensamblaje de los microbellos celulares (Potter *et al.*, 2003) y la modulación de la expresión genética (Chen *et al.*, 2000). Por otra parte, la sobre expresión de CAST ha sido utilizada en experimentos *in vivo* para explicar condiciones como: distrofia muscular, desuso muscular luego de isquemia y el enternecimiento *post mortem* de la carne (Spencer *et al.*, 2002; Tidbal y Spencer, 2002; Maekawa *et al.*, 2003; Kent *et al.*, 2004). Al igual que el caso de *CAPN1*, al presente no existen datos que expliquen el efecto de mutaciones en el gen de *CAST* sobre el desarrollo músculo esquelético en ganado bovino.

3.9. Polimorfismos en los genes de μ -calpaína y calpastatina y su utilidad a nivel comercial

En ganado *Bos taurus* y *Bos indicus* se han identificado varios SNP (polimorfismos de nucleótidos simples) en el gen de μ -CAPN que se asocian con características de importancia económica (Page *et al.*, 2004; White *et al.*, 2005; Casas *et al.*, 2006), como la terneza o suavidad de la carne. Esta proteasa está involucrada en el desarrollo muscular (Barnoy *et al.*, 2005), pero su mayor importancia económica radica en su efecto sobre el grado de terneza de la carne (Geesink y Koohmaraie, 2000; Riley *et al.*, 2003; Rickner *et al.*, 2006). Dicha característica constituye uno de los criterios de selección más importantes para el consumidor a la hora de comprar carne (Brooks *et al.*, 2000). La falta de terneza en la carne es una causa de insatisfacción en el consumidor, resultando, en consecuencia, un aspecto importante para realizar investigación con fines de mejoramiento del ganado Cebú y sus cruza. La información obtenida de los animales portadores del gen de la suavidad de la carne podría incorporarse en programas de selección asistida por marcadores moleculares para mejorar la calidad de la carne en el ganado bovino. White *et al.* (2005) evaluaron el efecto de cinco marcadores distribuidos a lo largo de todo el gen de μ -CAPN y encontraron que dos SNP pueden ser utilizados para detectar una predisposición a variaciones en terneza en todas las especies de bovinos, incluyendo, bisontes (*Bison bison* y *Bison bonasus*) y yaks (*Bos grunniens*). Estos SNP fueron clasificados como CAPN1-316 y CAPN1-4751. Además, Soria *et al.* (2010) reportan otro SNP: CAPN1-530.

El polimorfismo CAPN1-316 se encuentra en el exón 9 de la región regulatoria (28 kDa) del gen en cuestión (Figura 2). Este SNP provoca que en esta

región se sustituya una citosina por una guanina (alelos C↔G) (White *et al.*, 2005). Dicha sustitución trae por consecuencia el cambio en un amino ácido de alanina por glicina (Ala↔Gly). (White *et al.*, 2005). El polimorfismo *CAPN1*-530 provoca que en esta región se sustituya una adenina por una guanina (alelos A/G) cambia Isoleucina por valina en el aminoácido 530 (Soria *et al.*, 2010). El alelo C, tanto en *CAPN1*-316 (Page *et al.*, 2002 y 2004; White *et al.*, 2005) como en *CAPN1*-4751 (White *et al.*, 2005; Casas *et al.*, 2006) han sido asociados con valores favorables de ternura de la carne, sin embargo, se han encontrado una baja proporción de éstos en las poblaciones de ganado para carne estudiadas (Page *et al.*, 2002 y 2004; White *et al.*, 2005; Casas *et al.*, 2006).

En *CAST* se ha identificado un SNP que consta de una sustitución de bases entre citosina por timina (alelos C↔T) el cual está asociado a la ternura de la carne (Casas *et al.*, 2006). Los animales homocigotos para timina (TT) producen carne con menores valores de fuerza de corte que aquellos homocigotos para citosina (CC) (Barendse, 2002). Schenkel *et al.* (2006) describieron la presencia de otro SNP en *CAST* el cual predisponía al animal a variaciones en la ternura similares a las descritas por Barendse (2002) y Casas *et al.* (2006). Sin embargo, a diferencia de los estudios anteriores, el SNP de *CAST* que consta de una sustitución de bases entre citosina por timina (alelos C↔T) consta de una sustitución de citosina por guanina (alelos C↔G). Este resulta en una menor fuerza de corte para el músculo *Longissimus dorsi* luego de 7 d posmortem en los animales homocigotos para el alelo C.

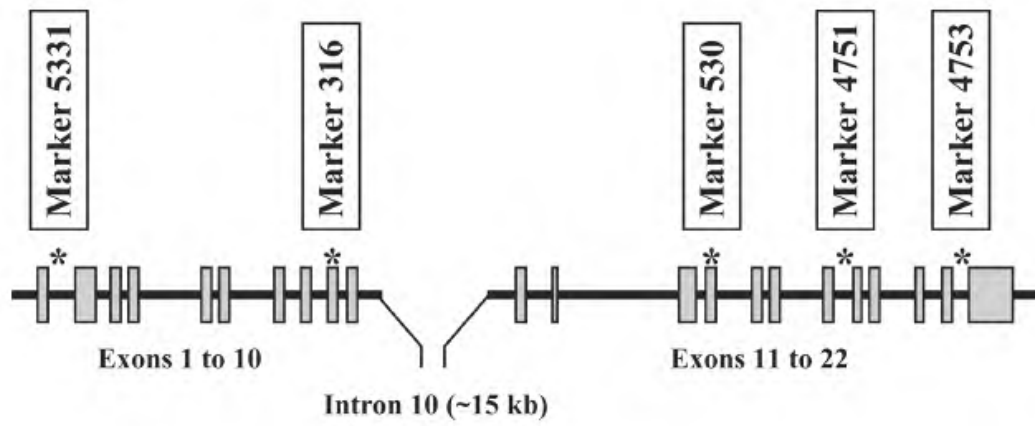


Figura 2. Localización (*) de los marcadores moleculares (SNP) identificados en el gen *CAPN1*. Fuente: White *et al.*, 2005.

4. JUSTIFICACIÓN

El sistema de ganadería de doble propósito es producto del cruce de Cebú, Criollo y razas europeas y es usado para la producción de leche y carne, basado en insumos locales y de bajo costo. Generalmente, este sistema ha sido considerado como ineficiente debido a que sus índices de productividad parcial han sido comparados con los sistemas intensivos de producción de leche y carne utilizados en los países desarrollados (Ortega y Ward, 2000). En nuestro país, este sistema de producción cobra especial importancia ya que el área tropical de México abarca 51.3 millones de ha, equivalentes al 26.2 % del territorio nacional. De esta superficie 19 millones de ha se dedican a la producción pecuaria, donde pastorean aproximadamente 12 millones de bovinos (40 % del inventario nacional), que producen el 28 % y 39 % de la leche y carne, respectivamente, que se consume en México (Ortega y Ward, 2000). Este tipo de ganadería se realiza principalmente en sistemas de pastoreo y la producción láctea se utiliza en la elaboración de quesos, en la venta directa al consumidor o a empresas industriales. La producción de carne se canaliza a la producción de reproductores y la producción de animales para crecimiento y finalización (SRA, 2009). Sin embargo, en estos sistemas de producción, la carencia de registros productivos es casi absoluta. En muy pocas explotaciones se cuenta con una base de datos que contenga registros confiables. Tampoco existen programas de mejoramiento genético ni pruebas de comportamiento para identificar y seleccionar animales que transmitan sus características de mayor eficiencia en producción de carne o leche. El mejoramiento genético por décadas ha sido sinónimo de importación de germoplasma debido a la idea preconcebida de que en ocasiones -a pesar de no contar con una justificación plena- el material genético extranjero es mejor (Parra-Bracamontes et

al., 2011) y se importa grandes cantidades tanto de ganado de pie de cría como de semen, que representaban un valor de 12.8 y 5.5 millones de dólares, respectivamente (Guin y Skaggs, 2005), colocando a México como un importador neto de germoplasma.

En la última década, el diagnóstico molecular ha surgido como una herramienta viable para aprovechar el potencial innato de los organismos vivos como recurso para solventar las demandas alimentarias de las poblaciones humanas. En los países en desarrollo esta tecnología ayudaría a utilizar los recursos genéticos disponibles, a seleccionar aquellos portadores de genes asociados a características de importancia económica y a utilizarlos en cruzamientos dirigidos para generar una nueva estirpe que mejore la calidad de sus productos. La tendencia actual del consumidor es demandar carne de buena calidad, lo que conlleva a los productores de bovinos en el trópico a seleccionar progenitores que transmitan estas características. Ambas necesidades pueden satisfacerse a través de la selección de características de importancia económica que pueden ser determinadas *in vivo*, como es el caso de los genes asociados a la calidad de la carne como la CPN/CAST y desarrollar herramientas de diagnóstico para mejorar la ganadería de la región mediante cruza dirigidas de los individuos genéticamente superiores y producción de embriones con los genes deseables.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. Toma de muestras de sangre

Se extrajeron muestras de sangre de la vena o arteria caudal (7-10 ml/animal) a 350 bovinos cruzados de Cebú por Europeo en la región del Papaloapan del estado de Oaxaca y se depositaron en tubos (Vacutainer®) que contenían EDTA como anticoagulante. Estas muestras se transportaron al laboratorio de Biología Molecular de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, Oaxaca, donde se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento.

5.2. Amplificación de Productos de PCR

Se extrajo el ADN mediante el Kit de Extracción de ADN Sanguíneo GF-1 (Vivantis®), usando la metodología indicada por el proveedor.

Se amplificaron los marcadores moleculares CAPN1 y CAST mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), utilizando 1 µl de ADN genómico, 10 pM de cada oligonucleótido en 25 µL de reacción del kit Dream Taq™ Green PCR Master Mix 2X (Fermentas). La PCR se realizó en el termociclador MAXYGENE (AXYGEN Scientific®) siguiendo las condiciones reacción: 1 ciclo 95 °C 3 min; 35 ciclos de 95 °C por 30 s, Ta por 30 s y 72 °C durante 30 s; finalmente 1 ciclo de 72 °C por 10 min (tabla 1).

Los productos de PCR se sometieron a un análisis de electroforesis, utilizando un gel de agarosa al 2 % en amortiguador TAE 1X. Se usaron 10 µl de producto de PCR obtenido. La electroforesis se realizó a 80 V por 40 min. Las amplificaciones se observaron en el sistema de fotodocumentación INGENIUS SYNGENNE®.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados

Marcador molecular	Secuencia	Ta (°C)
CAPN1 316	Directo: GAGCTGGCCCTCATAAGATAA Reverso: CCCATCCTCCATCTTGACC	58
CAPN1 530	Directo: GTGATTGTGCTGCGTTTCT Reverso: AGAGACGGTGACAGCACCCCTG	62
CAST	Directo: AAGTAAAGCCAAAGGAACACACA Reverso: AGGCTTTTTGGCTGAAAACA	58

5.3. Genotipificación

Las pruebas de PCR-RFLP para la terneza de la carne, se realizaron utilizando los marcadores CAPN1 316 con la enzima de restricción *Btg I* (Fermentas®), para el diagnóstico de los alelos C y G; CAPN1 530 con la enzima de restricción *Ava II* (Fermentas®), para el diagnóstico de los alelos A y G del gen CAPN1 de ambos marcadores y CAST con la enzima de restricción *Rsa I* (Fermentas®), para el diagnóstico de los alelos C y G del gen CAST. La digestión del producto amplificado con las enzimas de restricción se realizó con 15 µL del volumen de la reacción de PCR al cual se le adicionó 10 U de la enzima correspondiente, 2.5 µL de 10X Buffer y 6.5 µL de agua estéril, la mezcla se incubó por 12 horas a 37 °C en un horno de convección (tabla 2). Los fragmentos digeridos se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 3 % en buffer TAE 1X. Las condiciones de electroforesis fueron de 40 minutos a 80 Volts. Las bandas se visualizaron en un sistema de fotodocumentación. La lectura de los geles se realizó calculando el tamaño de alelos tomando como referencia la migración de fragmentos de un marcador de 50 pb (Fermentas).

Tabla 2. Ubicación genómica y patrón de restricción esperado de los marcadores moleculares CAPN1 316, CAPN1 530 y CAST

	CAPN1 316	CAPN1 530	CAST
No. de secuencia en Genbank	AF252504	AF248054	AY008267.1
Localización genómica	Cromosoma 29, Exón 9	Cromosoma 29, Exón 14	Cromosoma 7, Exón 5
Tamaño del producto de PCR (pb)	218	460	434
Enzima de restricción	<i>Btg I</i>	<i>Ava II</i>	<i>Rsa I</i>
Posiciones de corte	Alelo G: no corta Alelo C: 169	Alelo A: 44, 226 Alelo G: 44, 166	Alelo C: no corta Alelo G: 255
Patrón de restricción esperado (pb)	GG: 218 CC: 169, 49 GC: 218, 169, 49	AA: 44, 182, 234 GG: 44, 122, 294 AG: 294, 182, 122 44	CC: 434 GG: 168, 255 CG: 434, 255, 168

5.4. Análisis estadístico

Después de asignar el genotipo de cada uno de los animales de manera visual a partir del patrón de bandeo, se calcularon las frecuencias genotípicas, alélicas y haplotípicas.

Para el análisis estadístico de la variabilidad genética se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas, y el equilibrio de Hardy-Weinberg con la prueba de χ^2 (Ji cuadrada) con el programa estadístico SAS Versión 9.0 (2002), para los genes CPN1 y CAST, tomando en cuenta la ecuación $p^2+2pq+q^2$, donde:

p^2 = alelos en individuos homocigotos con un polimorfismo n

$2pq$ = frecuencia predicha para heterocigotos

q^2 = alelos en individuos homocigotos con un polimorfismo m

6. RESULTADOS

6.1. Polimorfismos de CAPN1

El producto de PCR del marcador CAPN1-316 se amplificó a partir de ADN genómico, obteniéndose un producto de 218 pb. El producto se digirió con la enzima *BtgI* (figura 3), observándose los patrones de restricción: 169 y 49 pb en los individuos que presentan el genotipo CC, un fragmento de 218 pb en los individuos GG (carriles 2,3,5,6,7,8,9,10 12, 13 y15) y tres fragmentos 218, 169 Y 49 Pb aproximadamente en los individuos GC (carriles 4,11 y1 4).

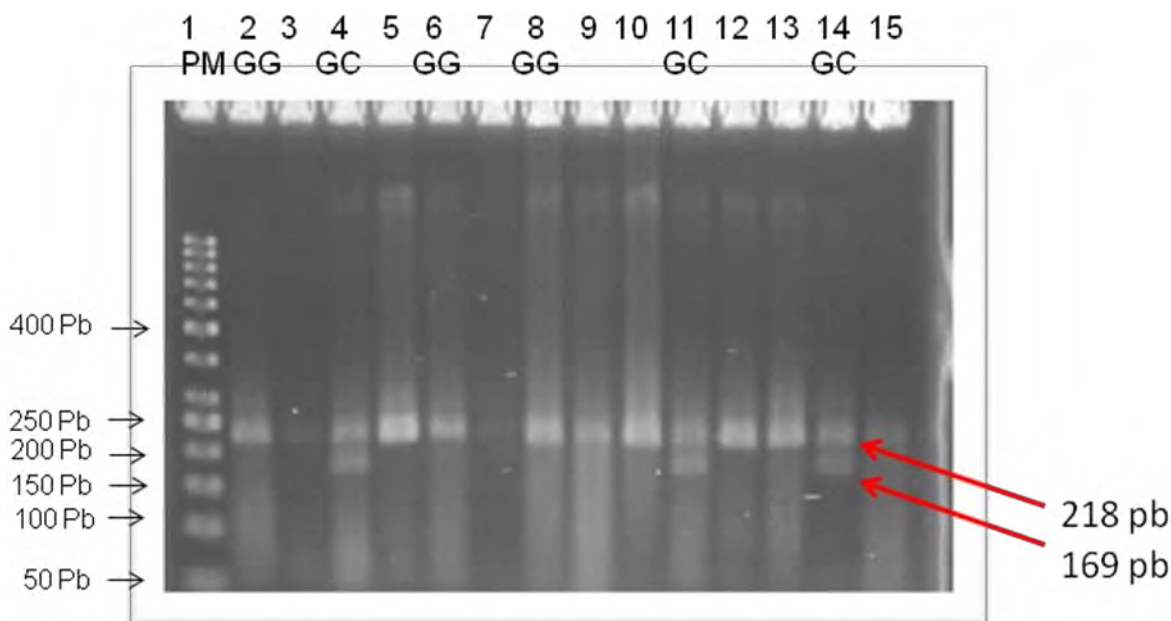


Figura 3. Genotipificación del gen *CAPN1-316* en bovinos de doble propósito con electroforesis en un gel de agarosa al 3 %.

Para *CAPN1-316* se observó que la frecuencia del genotipo CC fue de solamente 2.85 % de la población global (n=105), mientras que los genotipos CG y GG constituyeron el 11.43 % y 85.41 % de los animales, respectivamente (Tabla

4). El alelo C constituyó el 14 % del total, mientras que el G formó 86 % ($\chi^2 P = 0.964$). Asimismo, se observa la heterocigosidad media es de 0.114 de los mismos (Figura 4). Mientras que el genotipo de mayor frecuencia fue el GG (85.41 %) seguido por CG (11.43 %), siendo el CC (2.85 %) el menos común (Figura 5). La población en estudio no se encuentra en equilibrio de Hardy Weinberg con un valor de $\chi^2 = 7.702$ con dos grados de libertad ($P=0.964$).

Tabla 3. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas y esperadas en bovinos de doble propósito

Observado		Esperado (p^2 $2pq$ q^2)			
Genotipo	Número de individuos	Frecuencias Genotípicas	Frecuencias Genotípicas	Alelos	Frecuencias Alélicas
CC	3	0.03	0.84	G	0.86
GG	90	0.86	0.01	C	0.14
GC	12	0.11	0.16		

Heterocigosidad 0.114

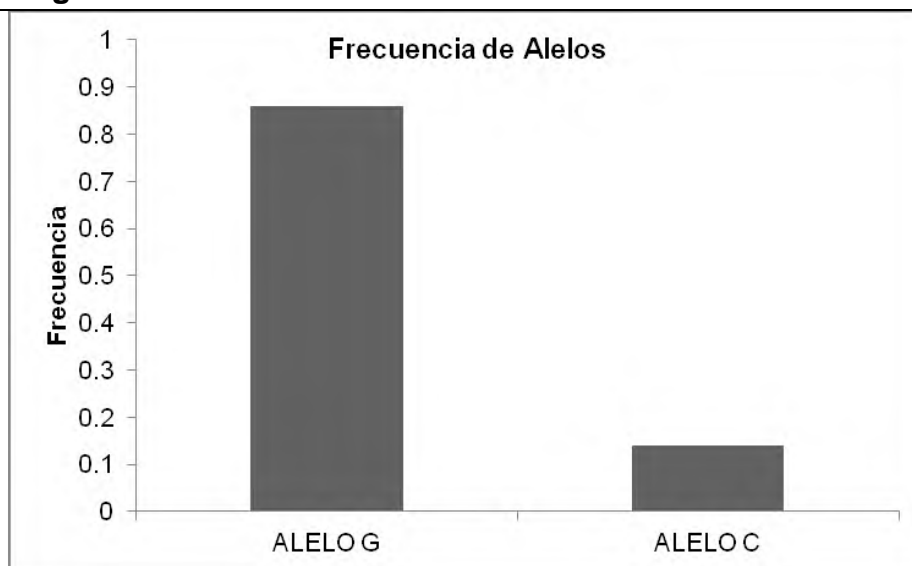


Figura 4. Frecuencia alélica global para el SNP *CAPN1*-316 (n=105).

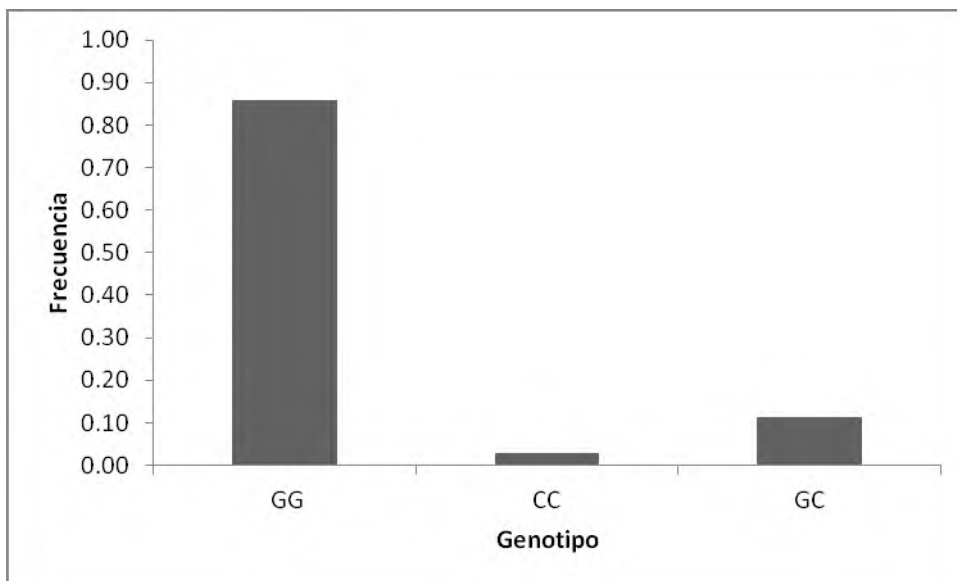


Figura 5. Frecuencia genotípica global para el SNP *CAPN1*-316 (n=105).

El producto de PCR del marcador *CAPN1*-530 se amplificó a partir de ADN genómico, obteniéndose un producto de 460 pb. El producto se digirió con la enzima *Ava II* (figura 6), observándose los patrones de restricción: 44, 182 y 234 pb en los individuos que presentan el genotipo AA, fragmentos de 44, 122 y 294 pb en los individuos GG (carriles 2, 4, 5, 6, 9, 10, 12, 13 y 15) y fragmentos de 294, 182, 122 y 44 pb aproximadamente en los individuos GA (carriles 3, 11 y 14). En el análisis de *CAPN1*-530 se observó que la frecuencia genotípica para AA, GG y AG fue 2, 85 y 13 %, respectivamente de la población global (Tabla 5 y Figura 7).

El alelo A constituyó el 15 % del total, mientras que el G formó 85 % (Figura 8). Asimismo, se observa la heterocigosidad media es de 0.156 de los mismos. La población en estudio no se encuentra en equilibrio de Hardy Weinberg con un valor de $\chi^2 = 1.527$ con dos grados de libertad (P=0.985).

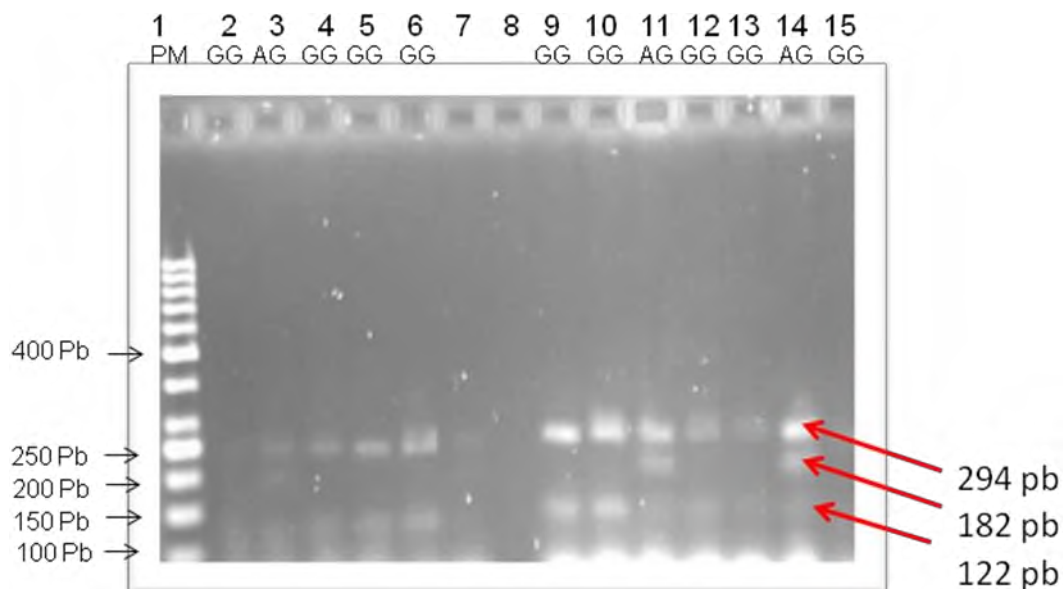


Figura 6. Genotipificación del gen *CAPN1-530* en bovinos de doble propósito con electroforesis en un gel de agarosa al 3 %.

Tabla 4. Frecuencias genotípicas y alélicas de *CAPN1-530* observadas y esperadas en bovinos de doble propósito.

Observado		Esperado (p^2 $2pq$ q^2)			
Genotipo	Número de individuos	Frecuencias Genotípicas	Frecuencias Genotípicas	Alelos	Frecuencias Alélicas
CC	1	0.02	0.01	G	0.85
GG	40	0.85	0.84	C	0.15
GC	6	0.13	0.15		
Heterocigosidad 0.156					

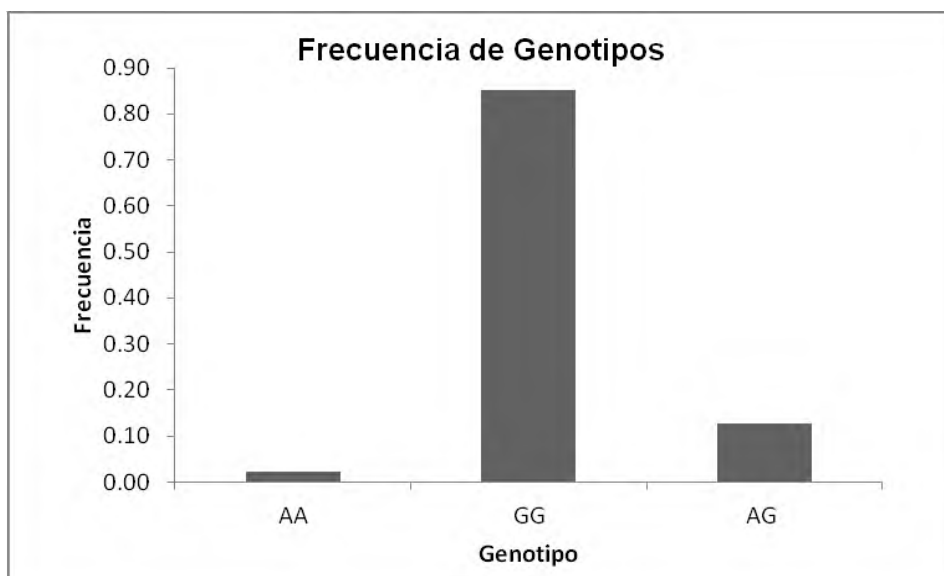


Figura 7. Frecuencia genotípica global para el SNP *CAPN1*-530 (n=45).

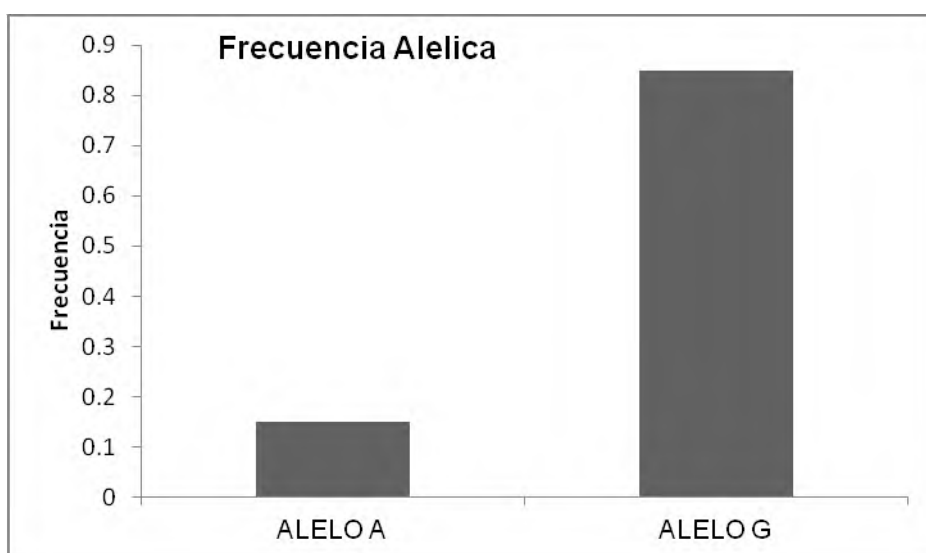


Figura 8. Frecuencia alélica global para el SNP *CAPN1*-530 (n=45).

6.2. Polimorfismos de CAST

El producto de PCR del marcador CAST se amplificó obteniéndose un producto de 434 pb. El producto se digirió con la enzima *Rsa I* (figura 9), observándose los patrones de restricción: 434 pb en los individuos que presentan el genotipo CC (carriles 2 y 6), fragmentos de 168 y 255 pb en los individuos GG

(carriles 7 y 8) y tres fragmentos de 434, 255 y 168 pb aproximadamente en los individuos GC (carriles 3 y 4).

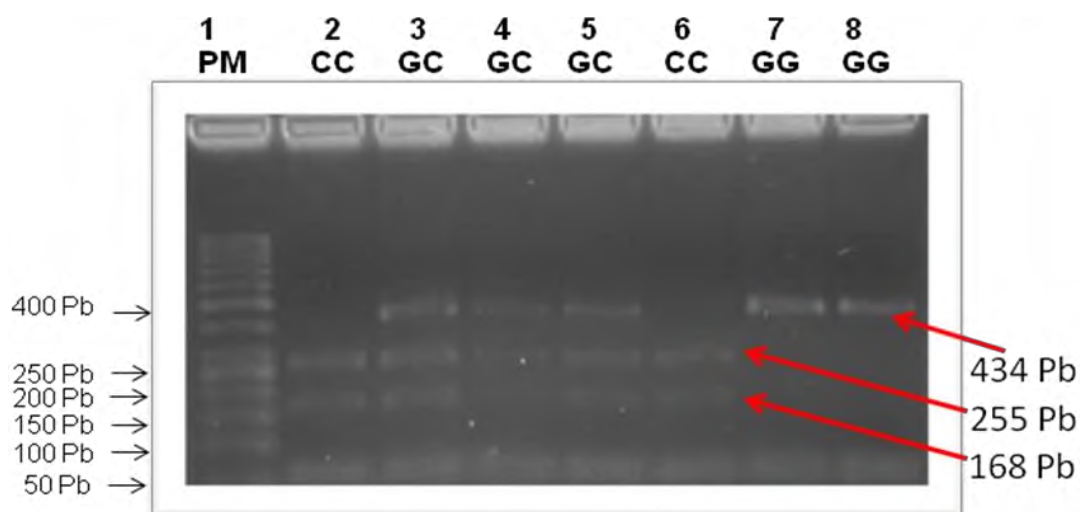


Figura 9. Genotipificación del gen *CAST* en bovinos de doble propósito con electroforesis en un gel de agarosa al 3 %.

Para *CAST* se observó una frecuencia genotípica global para CC de 31.67 %, CG de 40 % y CG 28.33 % (n=120; figura 9 y 10). La figura 11 muestra la frecuencia de los alelos C que constó del 32 % y el alelo G constó del 68 %. Asimismo, se observa la heterocigosidad media es de 0.499 de los mismos. La población en estudio no se encuentra en equilibrio de Hardy Weinberg con un valor de $\chi^2 = 4.757$ con dos grados de libertad (P=0.9803).

Tabla 5. Frecuencias genotípicas y alélicas de *CAST* observadas y esperadas en bovinos de doble propósito

Observado			Esperado (p^2 $2pq$ q^2)		
Genotipo	Número de individuos	Frecuencias Genotípicas	Frecuencias Genotípicas	Alelos	Frecuencias Alélicas
CC	38	0.32	0.27	G	0.68
GG	34	0.28	0.23	C	0.32
GC	48	0.4	0.5		
Heterocigosidad 0.4					

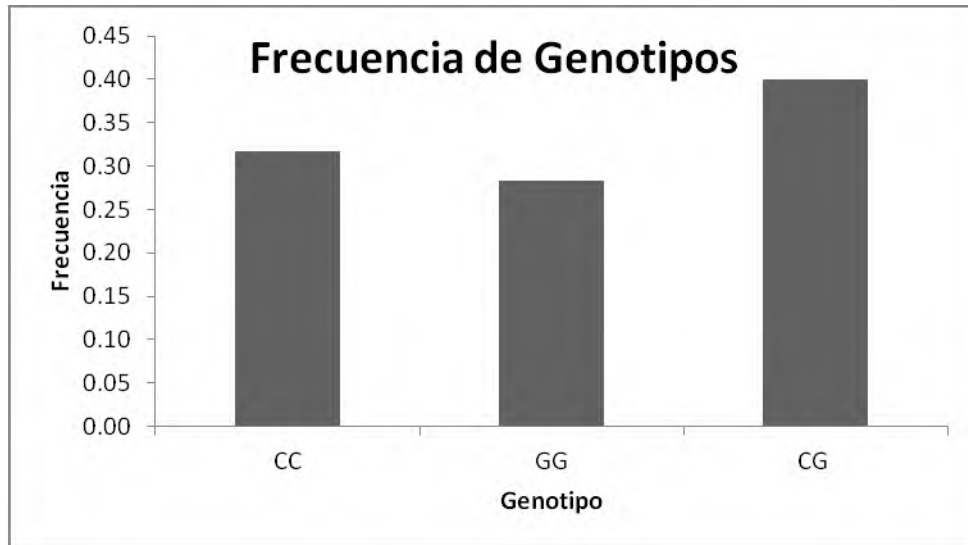


Figura 10. Frecuencia genotípica global para el SNP *CAST* (n=120).

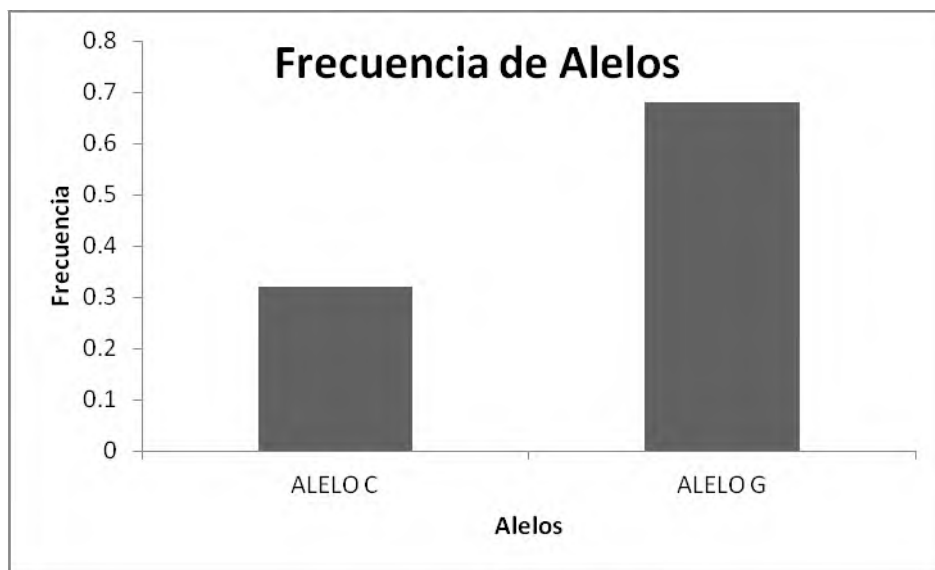


Figura 11. Frecuencia alélica global para el SNP *CAST* (n=120).

7. DISCUSIÓN

Las calpainas (CAPN) son proteasas de cisteína las cuales han sido implicadas en el proceso de maduración y enternecimiento de la carne (Koochmarie *et al.*, 1994; Goll *et al.*, 2003). En el músculo esquelético existen dos isoformas principales: μ -CAPN y m-CAPN. Estas enzimas proteolíticas junto con su inhibidor calpastatina (CAST) han sido implicadas a su vez en el desarrollo del músculo, comunicación entre células y otros procesos esenciales los cuales podrían delinear el índice de producción de carne en el animal adulto (Franco *et al.*, 2005; Casas *et al.*, 2006). Diversos estudios han demostrado que variaciones en estas proteasas están involucradas en ciertas diferencias encontradas en características de importancia económica (Koochmarie *et al.*, 1994; Barendse *et al.*, 2002; Morris *et al.*, 2006).

Los objetivos del presente estudio fueron determinar las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos *CAPN1-316*, *CAPN1-530* y *CAST* en ganado de doble propósito en la región cuenca del Papaloapan en el estado de Oaxaca. El sistema calpaína/calpastatina juega un papel importante a nivel molecular en la diferenciación celular y en la degradación de proteínas musculares (Van den Maagdenberg *et al.*, 2007). Estas proteínas están envueltas en la regulación de la miogénesis y se ha propuesto que la relación μ -*CAPN1/CAST* se halla en estrecha relación con la degradación de proteínas de la membrana celular durante la fusión de los mioblastos al formarse el miotubo y de células satélites de acuerdo a lo reportado por Moye *et al.*, 2004. Los polimorfismos estudiados en el presente trabajo fueron previamente asociados con diferencias en terneza de la carne, y propuestos como indicadores exclusivos de dicha característica (Casas *et al.*, 2006). Sin embargo, el sistema *CAPN1/CAST* está ligado a diversos factores los

cuales regulan el crecimiento y desarrollo celular en etapas pre- y post-natales (Casas *et al.*, 2006; Chung *et al.*, 2007; Van den Maagdenberg *et al.*, 2007). En un estudio realizado en Argentina por Miquel *et al.* (2007) se encontró que el SNP *CAPN1*-316 estuvo relacionado con variaciones en las características de ganancia en peso vivo y peso a la matanza en animales de las razas Angus y Brangus criados a pastoreo y sacrificados a un espesor de grasa dorsal promedio de 6.0 mm.

En los estudios realizados por Page *et al.* (2002 y 2004), White *et al.* (2005) y Casas *et al.* (2005 y 2006) se identificaron SNP que afectan la morfología de la proteína de *CAPN1* de tal modo que su acción podría variar a medida que cambia la base nitrogenada. Page *et al.* (2004) describieron dos SNP responsables de variación del gen de μ -calpaina. El primero se denominó *CAPN1*-316 debido a que provoca un cambio en el aminoácido 316 de la cadena polipeptídica de *CAPN1*. Esta transversión consta de la sustitución de bases C/G, que a su vez se traduce en un cambio de glicina por alanina. El segundo SNP de importancia se denominó *CAPN1*-530 puesto que afecta la identidad del aminoácido 530 de la cadena polipeptídica de *CAPN1*. Esta transición de A/G se traduce en un cambio de valina por isoleucina (White *et al.*, 2005). Ambos polimorfismos han sido intensamente estudiados en varias poblaciones y subespecies bovinas (White *et al.*, 2005). El resultado de estas investigaciones demuestra que *CAPN1*-316 se relaciona con variaciones en terneza de la carne de todas las subespecies bovinas, mientras que *CAPN1*-530 ejerce un efecto similar solamente en el ganado *Bos taurus*.

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que para el marcador *CAPN1*-316 abunda principalmente el genotipo GG con un 90 %, mientras que el genotipo CC es de menos del 3 %. La frecuencia alélica de G de igual forma fue mayor que el alelo C con 86 y 14 % respectivamente. Estos

resultados muestran frecuencias muy similares a lo reportado por Corva *et al.*, 2007; White *et al.*, 2005; Page *et al.* (2004); Casas *et al.*, 2006; Chung *et al.*, 2007; Van den Magdenberg *et al.*, 2007. El genotipo CC está asociado directamente a la suavidad de la carne, lo cual indica que de los animales usados en esta investigación la minoría tiene este gen y posiblemente la carne no tendría la suavidad esperada por el consumidor.

Page *et al.*, (2004), reportaron que el marcador CAPN1-316 tiene más capacidad de predicción en la población de sementales americanos, sin embargo el marcador CAPN1-530 puede ser más común en otras poblaciones de animales.

El uso de los marcadores CAPN1-316 y CAPN1-530 en este estudio, fue porque no existe un reporte de cual marcador es más frecuente en animales de doble propósito y aunque no existe una relación directa entre ambos marcadores, se encontró que el marcador más abundante es el CAPN1-316 como lo reportado por Page *et al.* (2004) como un mejor marcador de predicción para animales como mayor ternera. Mientras que el CAPN1-530 es más abundante en ganado *Bos taurus*, esto indica que en las poblaciones de ganado bovino de doble propósito de la región del Papaloapan predomina el ganado *Bos indicus*.

Mientras que en el inhibidor de CAPN, *CAST* predominó una frecuencia alélica en C del 32 % y el alelo G del 68 %, esto se significa que el alelo C a pesar de tener una mejor frecuencia, resulta en una menor fuerza de corte así como lo demuestran Motter *et al.* (2013), donde reportan valores de corte en *CAST* de $6,73 \pm 0,15$ kg, $6,99 \pm 0,13$ kg y $7,04 \pm 0,22$ kg para los genotipos CC, CG y GG, respectivamente, y la diferencia entre CC y CG (-0,26 kg) presentó un valor cercano

a la significancia estadística ($p=0,06$), lo que se traduce en que la carne más suave es la del alelo C.

El bovino cultor necesita herramientas efectivas para la selección genética a nivel de campo que le permita, entre otras características de importancia económica (QTL's), poder predecir el grado de ternura de la carne. Esto permitirá ofrecer al consumidor un producto de mejor calidad a un precio razonable y con una producción eficiente se podría garantizar el éxito de cualquier empresa pecuaria, aunado, la aplicación de técnicas moleculares como la PCR y la utilización de enzimas de restricción se brinda una forma rápida de diagnóstico sobre los QTL's en la industria pecuaria, resultando en una rápida y eficiente técnica para identificar y utilizar animales genéticamente superiores y acelerar el mejoramiento genético animal, ya que con métodos tradicionales de selección y cruzamiento se lleva mucho tiempo en realizar dicho mejoramiento genético, que al final se traduce en un mejor retorno económico al productor pecuario, y un mejor estatus actual de la industria del ganado para carne en México.

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- ✓ Se determinaron las variantes genéticas CC y GG de los genes *CAPN1* y *CAST* de 331 animales de doble propósito, donde el genotipo CC de ambos SNP en *CAPN1*, que ha sido asociado a mayor terneza de la carne, resultando ser el de menor frecuencia.
- ✓ La población no se encuentra en equilibrio Hardy Weinberg.
- ✓ La alta frecuencia de heterocigotos (GC) en contraste con la casi nula frecuencia de *homocigotos* CC en el SNP *CAPN1*, se debe a las cruzas indiscriminadas y a la poca orientación hacia un objetivo de producción.
- ✓ A partir de estos datos se sugiere hacer pruebas correspondientes de correlación de genotipo e indicadores fenotípicos, con la finalidad de seleccionar a aquellos individuos genéticamente superiores. para el alelo C, realizar cruzas dirigidas para mejorar y perpetuar la estirpe con la finalidad de aumentar la calidad de la terneza en carne.

9. LITERATURA CITADA

- Álvarez-Romero, J. y Medellín R. A. Vertebrados superiores exóticos en México: diversidad, distribución y efectos potenciales. Instituto de Ecología, UNAM. 2005. Consulta electrónica. Junio 2013: <http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/exoticas/fichaexoticas/Bostaurus00.pdf>
- ASERCA. 1995. Mexico - Agricultural Trading Companies. México.
- Atencio, I.A., M. Ramachandra, P. Shabram, y G.W. Demers. 2000. Calpain inhibitor 1 activates p53-dependent apoptosis in tumor cell lines. *Cell Growth Differ.* 11:247.
- Baki, A., P. Tompa, A. Alexa, O. Molnar, y P. Friedrich. 1996. Autolysis parallels activation of mu-calpain. *Biochem. J.* 318: 897.
- Barendse, W.J. 2002. DNA markers for meat tenderness. International patent application PCT/AU02/00122. International patent publication WO 02/064820 A1.
- Barendse, W.J. 2002. DNA markers for meat tenderness. International patent application PCT/AU02/00122. International patent publication WO 02/064820 A1.
- Barnoy, S., M. Maki, y N.S. Kosower. 2005. Overexpression of calpastatin inhibits L8 myoblast fusion. *Biochem. and Biophys. Res.* 332: 697.
- Barnoy, S., T. Glaser y N.S. Kosower. 1996. The role of calpastatin (the specific calpain inhibitor) in myoblast differentiation and fusion. *Biochem. Biophys. Res.*
- Blanchard, H., P. Grochulski, Y. Li, J.S. Arthur, P.L. Davies, J.S. Elce y M. Cygler. 1997. Structure of a calpain Ca(2+)-binding domain reveals a novel EF-hand and Ca(2+)-induced conformational changes. *Nat. Struct. Biol.* 4: 532.
- Brooks, J.C., J.B. Belew, D.B. Griffin, B.L. Gwartney, D.S. Hale, W.R. Henning, D.D. Johnson, J.B. Morgan, F.C. Parrish Jr, J.O. Reagan, y J.W. Savell. 2000.
- Camou, J.P., S.W. Mares, J.A. Marchello, R. Vazquez, M. Taylor, V.F. Thompson, y D.E. Goll. 2007. Isolation and characterization of μ -calpain, m-calpain, and calpastatin from postmortem muscle. I. Initial steps. *J. Anim. Sci.* 85: 3400.
- Carragher, N.O., y M.C. Frame. 2002. Calpain: A role in cell transformation and migration. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34: 1539.
- Casas, A., D. Cianzio, y A. Rivera 1997. Comparison of Holstein, Charbray and Zebu Bulls for Beef Production under Rotational Grazing. II. Offal Components in Carcass Composition. Manuscript Submitted to the editorial board February 24, 1997.
- Casas, E., S.N. White, T.L. Wheeler, S.D. Shackelford, M. Koohmaraie, D.G. Riley, C.C. Chase Jr., D.D. Johnson y T.P.L. Smith. 2006. Effects of calpastatin and μ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *J. Anim. Sci.* 84: 520.
- Chung H.Y., M.E. Davis, y H.C. Hines. 1999. A DNA polymorphism of the bovine calpastatin gene detected by SSCP analysis. *Anim Genet.* 30: 80.
- Cong, J., D.E. Goll, A.M. Peterson, H.P. Kapprell. 1989. The role of autolysis in activity of the Ca²⁺-dependent proteinases (mu-calpain and m-calpain). *J. Biol. Chem.* 264: 10096.

- Cong, M., V.F. Thompson, D.E. Goll y P.B. Antin. 1998. The bovine calpastatin gene promoter and a new N-terminal region of the protein are targets for cAMPdependent protein kinase activity. *J. Biochem.* 273: 660.
- Conway, K., C. Pin, J.A. Kiernan y P. Merrifield. 2004. The E protein HEB is preferentially expressed in developing muscle. *Differentiation* 72: 327.
- Corva P. M., Soria L., Villarreal E. L., Schor A., Perez Cenci M., Motter M, Mezzadra C., Melucci L. M., Paván E., Depetris G., Miquel M. C., Santini F. J. and Grigera Naón JJ. (2007). Association of polymorphisms on the CAPN1 and CAST genes with meat tenderness in beef cattle of Argentina. *Genet Mol Biol.* 30 (4):1064-1069.
- Crawford C. 1990. Protein and peptide inhibitors of calpains. In: *Intracellular Calcium-Dependent Proteolysis*. Boca Raton, FL: CRC, p. 75.
- Dedieu S., G. Mazeres, S. Poussard, J.J. Brustis, y P. Cottin. 2003. Myoblast migration is prevented by a calpain-dependent accumulation of MARCKS. *Biol Cell.* 95:615.
- Dedieu, S., S. Poussard, G. Maz`eres, F. Grise, E. Dargelos, P. Cottin, y J-J. Brustis, 2004. Myoblast migration is regulated by calpain through its involvement in cell attachment and cytoskeletal organisation. *Exp. Cell Res.* 292: 187.
- DeLuca, C.I., P.L. Davies, J.A. Samis, y J.S. Elce. 1993. Molecular cloning and bacterial expression of cDNA for rat calpain II 80-kDa subunit. *Biochim. Biophys. Acta.* 1216: 81.
- Eimori Y, Kawasaki H, Imajoh S, Minami Y and Kuzuki. (1988). All four repeating domains of the endogenous inhibitor for calciumdependent protease independently retain inhibitory activity. Expression of the cDNA fragments in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 263:2364-2370.
- Elce, J. S., C. Hegadorn, y J.S. Arthur. 1997. Autolysis, Ca²⁺ requirement, and heterodimer stability in m-calpain. *J. Biol. Chem.* 272: 11268.
- Fadiel, A., Anidi I. y K.D. Eichenbaum. 2005. Farm animal genomics and informatics: an update. *Nuc. Acids Res.* 33: 6308.
- FAO. 2003. Ordenación de los recursos zoogenéticos mundiales. http://www.fao.org/spanish/newsroom/field/2003/0303_saudihorses.htm. Acceso, agosto 2011.
- Fernández M. 2005. Marcadores moleculares, su relación con la carne. *Rev. Angus, Bs.As.*, 229:20-26. disonible en: www.produccion-animal.com.ar.
- Financiera Rural 2012. Monografía de Carne de Bovino. Disponible en: [http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/Monograf%C3%ADaCarneBovino\(feb2012\).pdf](http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/Monograf%C3%ADaCarneBovino(feb2012).pdf). Consultado: septiembre del 2014.
- Franco S.J., y A. Huttenlocher. 2005. Regulating cell migration: calpains make the cut. *J. Cell Sci.* 118: 17.
- Geesink G.H. y M. Koohmaraie. 2000. Ionic strength-induced inactivation of μ -calpain in postmortem muscle. *J. Anim. Sci.* 78: 2336.

- Geesink, G. H., y M. Koohmaraie. 1999. Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by μ -calpain under postmortem conditions. *J. Anim. Sci.* 77:2685.
- Geesink, G.H., S. Kuchay, A.H. Chishti, y M. Koohmaraie. 2006. A-Calpain is essential for postmortem proteolysis of muscle proteins. *J. Anim. Sci.* 84: 2834.
- Goll D.E., V.F. Thompson H. Li, W. Wei, y J. Cong. 2003. The calpain system. *Physiol. Rev.* 83: 731.
- Goll, D. E., Thompson, V. F., Taylor, R. G., y Zalewska, T. 1992. Is calpain activity regulated by membranes and autolysis or by calcium and calpastatin? *Bioessays*, 14: 549.
- Guin, C., Skaggs, R. 2005. North American beef and cattle trade: A current perspective. Cooperative Extension Service, Technical Report 40. New Mexico State University. 12 p.
- Guroff, G. 1964. A neutral, calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. *J. Biol. Chem.* 239: 149.
- Guttmann, R. P., J.S. Elce, P.D. Bell, J.C. Isbell, y G.V. Johnson. 1997. Oxidation inhibits substrate proteolysis by calpain I but not autolysis. *J. Biol. Chem.* 272:2005.
- Hosfield, C. M., J. S. Elce, P. L. Davies, y Z. Jia. 1999. Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca^{2+} -dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation. *EMBO. J.* 18: 6880.
- Imajoh, S., H. Kawasaki, y K. Suzuki. 1986. Limited autolysis of calcium-activated neutral protease (CANP): reduction of the Ca^{2+} requirement is due to the NH_2 -terminal processing of the large subunit. *J. Biochem. (Tokyo)* 100: 633.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2008. Sistema para la consulta del anuario estadístico de Oaxaca. Ganadería. www.inegi.org.mx. Consultado en mayo de 2010
- Jacquemond V. 1997. Indo-1 fluorescence signals elicited by membrane depolarization in enzymatically isolated mouse skeletal muscle fibers. *Biophys. J.* 73:920.
- Juszczuk-Kubiak E., J. Wyszyn´ska-Koko, K. Wicin´ska, y S. Rosochacki. 2007. A novel polymorphisms in intron 12 of the bovine calpastatin gene. *Mol. Biol. Rep.* 10:11033.
- Kameyama M., A. Kameyama, E. Takano, y M. Maki. 1998. Run-down of the cardiac L-type Ca^{2+} channel: partial restoration of channel activity in the cell-free patches by calpastatin. *Pflugers Arch.* 435. 344.
- Kaprel H.P., y D.E. Goll. 1989. Effect of Ca^{2+} on binding of the calpains to calpastatin. *J. Biol. Chem.* 264: 17,888.
- Kent, M.P., M.J. Spencer, y M. Koohmaraie. 2004. Postmortem proteolysis is reduced in transgenic mice overexpressing calpastatin. *J. Anim. Sci.* 82: 794.
- Killefer, J and Koohmaraie M. 1994. Bovine skeletal muscle calpastatin: cloning, sequence analysis, and steady-state mRNA expression. *J. Anim. Sci.* 72:606-614.

- Kiss R, Bozoky Z, Kovács D, Róna G, Friedrich P, Dvortsák P, Weisemann R, Tompa P, Perczel A. (2008). Calcium-induced tripartite binding of intrinsically disordered calpastatin to its cognate enzyme, calpain. *FEBS Lett.* 582(15):2149-2154.
- Konno T., N. Tanaka, M. Kataoka, E. Takano, y M. Maki. 1997. A circular dichroism study of preferential hydration and alcohol effects on a denatured protein, pig calpastatin domain I. *Biochim. Biophys. Acta.* 1342: 73.
- Koohmaraie, M. 1994. Muscle proteinases and meat aging. *Meat Sci.* 36:93.
- Koohmaraie, M. 1996. Biochemical factors regulating the toughening and tenderization process of meat. *Meat Sci.*43:193-201.
- Koohmarie, M., D.J. Nonneman, y G.H. Geesink. 1999. Possible role of the calpain proteolytic system in muscle growth and development. *J. Anim. Sci.* 77:120.
- Kosower, N.S., y T. Glaser. 1990. The calpain–calpastatin system and membrane fusion, in: R.L. Mellgren, T. Murachi (Eds.), *Intracellular Ca²⁺-dependent Proteolysis.* CRC Press, Boca Raton, FL. 163.
- Leloup L., G. Mazères, L. Daury, P. Cottin, y J-J. Brustis. 2006. Involvement of calpains in growth factor-mediated migration. *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* 38:2049
- Lin, G.D., D. Chattopadhyay, M. Maki, K.K. Wang, M. Carson, L. Jin, P.W. Yuen, E. Takano, M. Hatanaka, y L.J. DeLucas. 1997. Crystal structure of calcium bound domain VI of calpain at 1.9 Å resolution and its role in enzyme assembly, regulation, and inhibitor binding. *Nat. Struct. Biol.* 4: 539.
- Lonergan, S.M. 1999. Molecular features of striated muscle calpastatin. *J. Anim. Sci.* 77: 120.
- Maekawa, A., J.K. Lee, T. Nagaya, K. Kamiya, K. Yasui, M. Horiba, K. Miwa, M. Uzzaman, M. Maki, Y. Ueda, y I. Kodama. 2003. Overexpression of calpastatin by gene transfer prevents troponin I degradation and ameliorates contractile dysfunction in rat hearts subjected to ischemia/reperfusion, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35: 1277.
- Maravall M., Z.F. Mainen, B.L. Sabatini, y K. Svoboda. 2000. Estimating intracellular calcium concentrations and buffering without wavelength ratioing. *Biophys. J.* 78:2655.
- Marshall, D.M. 1999. The genetics of meat quality. In: R. Fries and A. Rubinsky eds. *The Genetics of Cattle.* CABI Publishing. pp.605-635
- Marshall, T.C., J. Slate, L. Kruuk, and J.M. Pemberton. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.*7:639-655.
- Melloni, E., M. Michetti, F. Salamino, R. Minafra, y S. Pontremoli. 1996. Modulation of the calpain autoproteolysis by calpastatin and phospholipids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229: 193.
- Molinari, M., J. Anagli, y E. Carafoli. 1994. Ca(2+)-activated neutral protease is active in the erythrocyte membrane in its nonautolyzed 80-kDa form. *J. Biol. Chem.* 269:27992.

- Moyen C., S. Goudenege, S. Poussard, A.H. Sassi, J.J. Brustis, y P. Cottin. 2004. Involvement of micro-calpain (CAPN 1) in muscle cell differentiation. *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* 36: 728.
- Motter, M.M., P.M. Corva, G. Marrube, M.C. Miquel, J. Papaleo Mazzuco, E.L. Villarreal, M.L. Melucci, C.A. Mezzadra, A. Schor y L.A. Soria. 2013. Asociación de dos marcadores del gen de la calpastatina con variables productivas de novillos Brangus engordados en pasturas. *Revista Argentina de Producción Animal Vol 33 (1): 21-29.*
- Murachi, T. 1984. Calcium-dependent proteinases and specific inhibitors: calpain and calpastatin. *Biochem. Soc. Symposium.* 49: 149.
- Olson, E.N., y J.D. Molkenkin. 1996. Defining the regulatory networks for muscle development. *Curr. Opin. Genet.* 6: 445.
- Ortega, L. y R. Ward. 2005. El sistema de Ganadería de Doble Propósito: Un sistema eficiente. Facultad de Agronomía. Universidad de Zulia. Maracaibo-Venezuela, 22-26.
- Otsuka Y., y D.E. Goll. 1987. Purification of the Ca²⁺-dependent proteinase inhibitor from bovine cardiac muscle and its interaction with the millimolar Ca²⁺-dependent proteinase. *J. Biol. Chem.* 262: 5839.
- Page, B. T., E. Casas, M.P. Heaton, N.G. Cullen, D.L. Hyndman, C.A. Morris, A.M. Crawford, T.L. Wheeler, M. Koohmaraie, J.W. Keele and T.P. Smith. 2002. Evaluation of singlenucleotide polymorphisms in *CAPN1* for association with meat tenderness in cattle. *J. Anim. Sci.* 80:3077–3085.
- Page, B.T., E. Casas, R.L. Quaas, R.M. Thallman, T.L. Wheeler, S.D. Shackelford, M. Koohmaraie, S.N. White, G.L. Bennett, J.W. Keele, M.E. Dikeman and T.P. Smith. 2004. Association of markers in the bovine *CAPN1* gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. *J. Anim. Sci.* 82:3474–3481.
- Pal, G.P., T. De Veyra, J.S. Elce, y Z. Jia. 2003. Crystal structure of a micro-like calpain reveals a partially activated conformation with low Ca²⁺ requirement. *Structure (Camb.)* 11: 1521.
- Parra-Bracamonte, G.M., A.M. Sifuentes-Rincón, E.G. Cienfuegos-Rivas, A. Tewolde- Medhin, J.C. Martínez-González. 2007. Polimorfismo en el gen de la μ -calpaína en ganado Brahmán de registro de México. *ALPA.* Vol 15, número 1:32-37. ISSN 1022-1301.
- Parra-Bracamonte, G.M., A. M. Sifuentes Rincón, X. F. De la Rosa Reyna, W. Arellano Vera. 2011. Avances y perspectivas de la biotecnología genómica aplicada a la ganadería en México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems,* 14:1025-1037
- Pfizer J, Assfalg-Machleidt I, Machleidt W, Schaschke N. (2008). Inhibition of human mucalpain by conformationally constrained calpastatina peptides. *Biol Chem.* 389(1):83-90.
- Phillips C. J. C. 2003. Principios de Producción Bovina. Edit. Acribia, Zaragoza España.

- Potter, A.P., J.S. Tirnauer, R. Janssen, D.E. Croall, C.N. Hughes, K.A. Fiacco, J.W. Mier, M. Maki, y I.M. Herman. 1998. Calpain regulates actin remodeling during cell spreading. *J. Cell Biol.* 141: 647.
- Potter, D.A., A. Srirangam, K.A. Fiacco, D. Brocks, J. Hawes, C. Herndon, M. Maki, D. Acheson, y I.M. Herman. 2003. Calpain regulates enterocyte brush border actin assembly and pathogenic *E. coli*-mediated effacement. *J. Biol. Chem.* 278:30403.
- Pringle, T.D., S.E. Williams, B.S. Lamb, D.D. Johnson and R.L. West. 1997. Carcass characteristics, the calpain proteinase system, and aged tenderness of Angus and Brahman crossbred steers. *J. Anim. Sci.* 75:2955–296.
- Rickner, C.B., N.A. Pyatt, L.L. Berger, y D.B. Faulkner. 2006. Relationship among GeneSTAR marbling marker, intramuscular fat deposition, and expected progeny difference in early weaned Simmental steers *J. Anim. Sci.* 84: 686.
- Riley, D.G., C.C. Chase Jr., T.D. Pringle, R.L. West, D.D. Johnson, T.A. Olson, A.C. Hammond and S.W. Coleman. 2003. Effect of sire on μ and m-calpain activity and rate of tenderization as indicated by myofibril fragmentation indices of steaks from Brahman cattle. *J. Anim. Sci.* 81:2440–2447
- SAGARPA, 2011. http://www.campomexicano.gob.mx/portal_siap/Integracion/EstadisticaBasica/Pecuario/PoblacionGanadera/ProductoEspecie/bovino.pdf. Consultado en Junio 2013.
- Saido, T.C., M. Shibata, T. Takenawa, H. Murofushi, y K. Suzuki. 1992. Positive regulation of mu-calpain action by polyphosphoinositides. *J. Biol. Chem.* 267:24585.
- SAS Institute. 2002. SAS User's Guide: Statistics. Version 9.0. Statistic Analysis System Institute. Cary, North Carolina, USA. 132p.
- Schenkel F.S., S.P. Miller, Z. Jiang, I.B. Mandell, X. Ye, H. Li, y J. W. Wilton. 2006. Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *J. Anim. Sci.* 84: 291.
- Schenkel F.S., S.P. Miller, Z. Jiang, I.B. Mandell, X. Ye, H. Li, y J. W. Wilton. 2006. Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *J. Anim. Sci.* 84: 291.
- Smith T.P.L., F.A. Simmen, G. Zhao, y J.L. Vallet. 2001. Rapid communication: nucleotide sequences of two isoforms of porcine micromolar calcium-activated neutral protease 1 cDNA. *J. Anim. Sci.* 79: 552.
- Smith, T. P. L., E. Casas, C. E. Rexroad III, S. M. Kappes and J. W. Keele. 2000. Bovine CAPN1 maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat tenderness. *J. Anim. Sci.* 78:2589–2594.
- Soria L. A., Corva P. M., Huguet, M. J., Miño S. and Miquel, M. C. 2010. Bovine μ -calpain (*capn1*) gene polymorphisms in Brangus and Brahman bulls. *Journal of Basic & Applied Genetics*, 21 (1): 61-69
- Sorimachi, H., y K. Suzuki. 2001. The structure of calpain. *J. Biochem. (Tokyo)* 129:653.

- Spencer, M.J., y R.L. Mellgren. 2002. Overexpression of a calpastatin transgene in mdx muscle reduces dystrophic pathology. *Hum. Mol. Genet.* 11: 2645.
- Strobl, S., C. Fernandez-Catalan, M. Braun, R. Huber, H. Masumoto, K. Nakagawa, A. Irie, H. Sorimachi, G. Bourenkow, y H. Bartunik. 2000. The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 588.
- Suzuki A., K. Kim, y Y. Ikeuchi. 1996. Proteolytic cleavage of connectin/titin. *Adv. Biophys.* 33: 53.
- Suzuki, K., S. Tsuji, S. Ishiura, Y. Kimura, S. Kubota, y K. Imahori. 1981a. Autolysis of calcium-activated neutral protease of chicken skeletal muscle. *J. Biochem. (Tokyo)* 90: 1787.
- Suzuki, K., S. Tsuji, S. Ishiura, Y. Kimura, S. Kubota, y K. Imahori. 1981b. Limited autolysis of Ca²⁺-activated neutral protease (CANP) changes its sensitivity to Ca²⁺ ions. *J. Biochem. (Tokyo)* 90: 275.
- Suzuki, K., T.C. Saido, y S. Hirai. 1992. Modulation of cellular signals by calpain. *Ann. New York Acad. Sci.* 674: 218.
- Suzuki, K., y H. Sorimachi. 1998. A novel aspect of calpain activation. *FEBS. Lett.* 433:1.
- Tidball, J.G., y M.J. Spencer. 2002. Expression of a calpastatin transgene slows muscle wasting and obviates changes in myosin isoform expression during murine muscle disuse, *J. Physiol.* 545: 819.
- Todd B, Moore D, Deivanayagam CC, Lin GD, Chattopadhyay D, Maki M, Wang KK, Narayana SV. (2003). A structural model for the inhibition of calpain by calpastatin: crystal structures of the native domain VI of calpain and its complexes with calpastatin peptide and a small molecule inhibitor. *J Mol Biol.* 18;328 (1):131-146.
- Tompa, P., Y. Emori, H. Sorimachi, K. Suzuki, y P. Friedrich. 2001. Domain III of calpain is a Ca²⁺-regulated phospholipid-binding domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280: 1333.
- Van den Maagdenberg, K., E. Claeys, A. Stinckens, N. Buys, y S. De Smet. 2007. Effect of age, muscle and insulin-like growth factor-II genotype in pigs on muscle proteolytic and lipolytic enzyme activities. *J. Anim. Sci.* 10: 2527.
- White, S.N., E. Casas, T.L. Wheeler, S.D. Shakelford, M. Koohmaraie, D.G. Riley, C.C. Chase, Jr., D.D. Johnson, J.W. Keele and T.P.L. Smith. 2005. A new single nucleotide polymorphism in *CAPN1* extends the current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent. *J. Anim. Sci.*83:2001-2008.
- Xu, Y., y R.L. Mellgren. 2002. Calpain inhibition decreases the growth rate of mammalian cell colonies. *J. Biol. Chem.* 277: 21474.
- Yang HO, Ma H, Takano E, Hatanaka M, Maki M. (1994). Analysis of calcium-dependent interaction between Amino-Terminal conserved region of calpastatin functional domain and calmodulin-like domain of μ -calpaina large subunit. *J Biol Chem.* 269 (29): 18977-18984.

ANEXO 1. MANUAL DEL KIT DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

El **Kit de Extracción de ADN Sanguíneo GF-1** está diseñado para una rápida y eficiente purificación del ADN genómico por arriba de 1 ml del total de la sangre o 5×10^6 leucocitos. Este kit usa tubos especialmente tratados equipados con un filtro de membrana dentro de una columna para unir eficientemente el ADN en presencia de una alta concentración de sales. Este kit aplica el principio de la tecnología de giro de mini-columna y el uso de amortiguadores optimizados para asegurar que únicamente el ADN sea aislado mientras las proteínas celulares, metabolitos, sales y otras impurezas de bajo peso molecular son removidas durante los subsecuentes pasos de lavado.

El ADN genómico altamente purificado es diluido en agua o amortiguadores bajos en sales y tiene un radio A260/280 entre 1.7 y 1.9 aislándolo para usarse en muchas aplicaciones de biología molecular de rutina tales como enzimas de restricción que digieren, PCR, Southern blotting, huella genética de ADN y otras manipulaciones.

Componentes del kit:

Producto No. de catálogo	5 preparaciones MUESTRA	50 preparaciones GF-BD-050	100 preparaciones GF-BD-100
Componentes			
Columnas GF-1	5	50	100
Tubos de colección	5	50	100
Amortiguador para lisis de la sangre (Buffer BB)	1.5 ml	12 ml	24 ml
Wash Buffer 1 (concentrado)*	1.5 ml	15 ml	30 ml
Wash Buffer 2 (concentrado)*	1.8 ml	17 ml	34 ml
Elution Buffer	1 ml	10 ml	20 ml
Manual	1	1	1

* Por favor etiquetar para la **Reconstitución de Soluciones, Estabilidad y**

Almacenamiento antes de usar este kit.

El **Kit de Extracción de ADN sanguíneo GF-1** está disponible para 50 y 100 purificaciones por kit. Los reactivos y materiales provistos con el kit son únicamente para propósitos de investigación.

Materiales Adicionados por el Usuario

Etanol absoluto (>95%)

Proteinasa K (20 mg/ml)

ARNasa A (libre de ADNasa) (20 mg/ml)

Reconstitución de Soluciones

El frasco etiquetado como **Wash Buffer 1** y el **Wash Buffer 2** contienen buffer concentrado el cual debe ser diluido con etanol absoluto (>95%) antes de su uso.

Para la **MUESTRA (5 preparaciones)**

Adicionar **1.5 ml** de etanol absoluto en el frasco etiquetado como **Wash Buffer 1**.

Adicionar **4.2 ml** de etanol absoluto en el frasco etiquetado como **Wash Buffer 2**.

Para el **GF-BD-050 (50 preparaciones)**

Adicionar **15 ml** de etanol absoluto en el frasco etiquetado como **Wash Buffer 1**.

Adicionar **40 ml** de etanol absoluto en el frasco etiquetado como **Wash Buffer 2**.

Para el **GF-BD-100 (100 preparaciones)**

Adicionar **30 ml** de etanol absoluto en el frasco etiquetado como **Wash Buffer 1**.

Adicionar **80 ml** de etanol absoluto en el frasco etiquetado como **Wash Buffer 2**.

Almacenar el **Wash Buffer** a temperatura ambiente con el tapón del frasco cerrado herméticamente después de su uso.

Almacenamiento y Estabilidad

Almacenar todas las soluciones entre 20 y 30°C

Los componentes del kit están garantizados para ser estables por 12 meses después de la fecha de fabricación, el **Buffer BB** podría mostrar una precipitación de las sales debido a temperaturas frías. Si esto sucede, simplemente entibiar el frasco de 55 a 65°C ocasionalmente agitando hasta que el precipitado esté completamente disuelto.

Químicos Peligrosos

El **Buffer BB** y el **Wash Buffer 1** contienen sales de guanidina las cuales pueden ser dañinas cuando entran en contacto con la piel o son ingeridas. Siempre hay que usar guantes y medidas de seguridad estándar. NO desinfectar la guanidina o extracción de desechos en soluciones que contienen blanqueadores o cualquier otra forma de ácido. Para limpiar cualquier artículo contaminado con el reactivo, simplemente remojar el material en detergente y agua para remover todos los residuos de guanidina antes de limpiarlos con blanqueador o con soluciones ácidas.

Procedimientos

✓ **Recomendación**

- ✓ Todos los pasos deben de llevarse a cabo a temperatura ambiente.
- ✓ El **Wash Buffer 1** y el **Wash Buffer 2** (concentrado) deben ser diluidos con etanol absoluto antes de su uso. Por favor etiquetar para la **Reconstitución de Soluciones**.
- ✓ Si hay formas de precipitación en el **Buffer BB** incubar de 55 – 65°C con agitación ocasional hasta que el precipitado esté completamente disuelto.

Precalentar el baño maría a 65°C.

Precalentar el **Buffer de dilución** a 65°C

1. Lisis de la sangre

Adicionar 200µl de **Buffer BB** dentro del tubo de una muestra de sangre de 200 µl en un tubo de microcentrífuga. Mezclar uniformemente utilizando el vortex. Adicionar 20µl de proteinasa K (20 mg/ml) y mezclar inmediatamente. Incubar a 65°C por 10 minutos.

Asegurar que el Buffer BB esté mezclado homogéneamente con la muestra de sangre antes de la adición de la proteinasa K. Las muestras de sangre podrían variar en el número de leucocitos dependiendo del donador. También al procesar muchas células podrían permitir el sobrellenado de la columna. Por lo tanto, asegurarse que haya no más de 5×10^6 leucocitos en la muestra.

Opcional: Eliminación de ARN

Si se requiere ADN libre de ARN, adicionar 20 µl de ARNasa A (libre de ADNasa, 20 mg/ml). Mezclar e incubar a 37 °C por 10 minutos.

2. Adición de etanol

Adicionar 200 µl de etanol absoluto. Mezclar inmediatamente y completamente para obtener una solución homogénea.

Mezclar inmediatamente para prevenir cualquier precipitación indeseable de ácidos nucleicos debido a la alta concentración de etanol local.

3. Llenado de la columna

Tips para un Máximo Rendimiento

Para obtener un máximo rendimiento recomendamos a nuestros usuarios fijar fuertemente la orientación de la columna durante la centrifugación a todos los tiempos. Recomendamos a los usuarios poner una marca en el borde de la columna

y así ubicar la columna con la marca a una posición fija durante la centrifugación. Transferir la muestra dentro de una columna ensamblada en un tubo de colección limpio (provisto). Centrifugar a 5,000 x g por 1 minuto. Desechar el sobrenadante.

4. Columna de lavado 1

Lavar la columna con 500 µl de **Wash Buffer 1** y centrifugar a 5,000 x g por 1 minuto. Desechar el sobrenadante.

Asegúrese que el etanol haya sido agregado dentro del Wash Buffer 1 antes de su uso (ir a Reconstitución de Soluciones).

5. Columna de lavado 2

Lavar la columna con 500 µl de **Wash Buffer 2** y centrifugar a 5,000 x g por 1 minuto. Desechar el sobrenadante. Lavar la columna de nuevo con 500 µl de **Wash Buffer 2** y centrifugar a la máxima velocidad por 3 minutos.

Asegúrese que el etanol haya sido agregado dentro del Wash Buffer 2 antes de su uso (ir a Reconstitución de Soluciones). Asegurar la centrifugación por 3 minutos para remover completamente el etanol.

6. Elución de ADN

Poner la columna dentro de un tubo de microcentrífuga limpio. Adicionar 100 µl de **Elution Buffer** precalentado, amortiguador TE o agua estéril directamente a la membrana de la columna y reposar por 2 minutos. Centrifugar a 5,000 x g por 1 minuto para eludir el ADN. Almacenar el ADN de 4°C a -20°C.

Asegúrese que el elution buffer esté directamente disperso en el centro de la membrana para completar la elución. El amortiguador TE también puede eludir el ADN aunque el EDTA podría inhibir una subsecuente reacción enzimática. Si el agua es utilizada para eludir el ADN la máxima elución eficiente es lograda entre un pH de 7.0 y 8.5. Almacenar el ADN a -20°C así el ADN podría degradarse en ausencia de un agente amortiguador.

ANEXO 2. SECUENCIA DEL GEN *CAPN1*

CCACCCGGCCCTGCAACTCGAGCTGCTGCCCTGGTTAAAAATACCCCCTGTCCCCTCCTCCCCCTCCGC
TCCCCCGCGCTGCCCTGGCGTCCGGGCCCCAGCCCTTCCCACCCAGATAGGCGCTGGCCCCCTCCCCGGG
ACTACTCTGCCTTTGACTAATTTGTCCTCTCGCGGAGTTGGCCAGCGTCTGCGGAGGAGGGCCGAGGAG
ATACCGTGAATTAGAGAGATCGTCGGAGAAGGTGCCCGGAGAGGAGGGCGGAGAGGAAGCGGGGTGAAG
CCCAGGAGAAGGAGGAGGAGAAGGGAGGGGCGGAGGAGGGCGGGGAGGAGCGCTCTTCCCTGGTTGGGC
CTGTCTCAGTTGCCACCCGGGAAGCCAGAGCAGGGACCGCAGCGACCCCCAACACTCCTCCCCAGGT
AAGGAGGGTGAGGCCGGCCGGCGTTCCCCAGCTTGGCCTGGATCCCGGATGTGGGGCTGCCTTCCCC
CGGGCTCTCAGAGTGCCTGCGACGGGGCGGGGGCTCGGGAACCGCAAGGCTCCGGAGCCCGCCCCAGGCT
GCGTTCCCTACGCTCCTCAGGGGGCTGGGCTGGGGGGCTGGCGGGAGGGGAAAGGACTGAGGCCGAGCCTCC
CTGATCCTTCAACCCGTCTCAGGAGCCTGGGGAGGGGAACCCCGGACTGCCTGGACTTATCAGCCCCAA
GCTGGCAAAGGGGCCAGTGCCTAGGAGCTTGGCTAGTCTGGGGAGAGAGGCATTCAAAGAGTACTTGCCT
CGGGGTCTCCACCTTCCCTCGTTCTTGTGCTATTATCTCGGACCCCGCCCTTCCCCACCTGACTGGCTG
ACCGCAGGCTGCAGACCCAGGACAATGGGAGCTGGGAACCGGAGAGGTGGTAGCATTGGGTGAGGCTAG
GGAGATGATGGCCAGCGCACCTAGGGGATGGGAAGCCCCCTCTGGTGGATTCTGGGAGCAGAGAGGTATG
GCTGCCCGCCCTAATTTAGTGAGGAGGTGGGGAACCCACAGGCTTGGGGAGAAAGGAGGGCAGCGGGCCA
GAGAGCAGTGTTAGCAGATAGGAGCCCCAGCTCTAGTCTGGGAAGGCCAGGGTTCTGAGCAGGGCCCT
CTGTCCACAGGATGGCCGAGGAGTTCATCACTCCGGTGTACTGCACCGGGGTGTCTGCACAAGTGCAGA
AGCAGCGGGCCAAGGAGCTGGGCCCTGGGCCGCCATGAAAATGCCATCAAGTACCTGGGCCAGGATTACGA
GCAGCTGCGGGTTCCTGCAAAAGAGGGGCCCTTTTCCGTGACGAGGCTTCCCCCAGTGCCCCAG
AGCTGGGGCTTCAAGGAGCTGGGCCCAACTCCTCCAAAACCTATGGCATCAAGTGAAGCGTCCCACGG
TGAGAGGGGCCACCCTGGATGGGACTCAGTTTACCTCCTTCTGAGTGAGGAGTGGGAATAGGACGCCAG
GTCCCTAGAGTGGGGTCTGGGATGGCTGGCTCCAGTTCTAGGAGGGCTGGCCAGAGACAGGACTCT
GGGTCTCTTGACAGGAGCTGTTCTCAAACCCCAAGTTCATCGTGGATGGAGCCACCCGCACGGACATCTGC
CAGGGCGCACTGGGTAGGCCCTGGGGGATCCCGAGTGTGTTTTGCGTAGTAGTTCCTGTGCCGTTCT
TCCTGCTCCGCTCAGCCTCTCCCTCCTGCAAGCCCCGAGCAGGCTCTGGCTCTCAGTGTGGGGCTGGTT
TGCCAGATTCTGGGTCTTTTCTGTAAGTTGAGGGGCACCCTGTCCGGGGAGTCCCAGGTTCTCCCCAG
TATGGCACTCACTGGGCAAAGATGGGTACAGTAGACCTGACGGGGATCCTTCCCATCCCAGGGGACTGTT
GGCTCCTGGCTGCCATCGCCTCCCTTACCCTCAATGACACCCTCCTGCACCGAGTAGTTCACATGGCCA
AAGCTCCAGGATGGCTACGCTGGCATCTTCCATTTCCAGGTGAGGAGCCCCACATGCACCTTGGACAAG
GAGTGGGGCGGTGAGGGAGAGAGGGGTAGCAGGCAACGGAGATGGGCGGGGGACCCCTGAAGTTAGGGTGG
CGCGGGGCCGACCTTGCAGGGCCAGCTCCCGCACCCCCCCCCACCCCCCAGAAAGTATGTGACCTCTT
GATTCCATCTCAGGTCTGTCTGTGAGAAATCTGTCTGTGAAACGGTTGGCAGGTATTTAGCTG
GCAGTTTTCTGGCTGGTTGTGCACACTGGAGAAAAGAAAGTCTTAGAGAAAATCTCTGGGTTATGTC
CTACGGGACAAATCCTTTTCTCCTCAGGGTCTCAGTTTCCCTGTCTGAGAAATAGTGTCTGCTGGGGA
AAATCGGCTGTCACTTGTGGTCTATACACCCTTGGCCTCAGTCTCCCCCGACCCCCCTACCCCCAACT
CCTCCTGCACTCTGTCACTCTCAGCCACTGAGAGCCCTGAGGAAAAGAAAGACTCTGGATAAAGTTTAT
TTAAACCAGCTTTTCTGATGCTCTTTGCGCACAGGGCCCACTTTTCAAATTACTGATGAATTTCTAG
TAGGCTCGTTTTGGGAAAGAGACATGCCAGCAACCCTGGATGAGAACCTTGGCGCCGGTGTCTCTCC
TACCTTCTGGTCAAGGAGCGCCTTGGCCTACTTATCCTCACCCGCTTGGCGCATTGGCTTCACTTGA
CGGGACCCACAGTGCAGGGGCGAACTACTGTGGCCAAGTGCAGCACCTGCCAGCGCTGGTCTGCAGGGGG
TGGCCTCGCTGTCTTTCCCCACCCTCCTCTTACTCCTCCAATCCGTTCTCCACGGCCTCTGATTGG
CCCGTTCACTTTCTCCATGGTGTGTGGGCGCACCTCCTCCCTTTTGGCCATTGTTTTGCACACTCAGG
GCCCCCAGTGCTGTAGCACAGAGTCACTTATGGCCTGGGATGGCGGGAAGTCTTCCCCACTGGGAAAC
TTGCCTTCAAGGCATCTTTGAAGCAAGCCCGTATTGTGGGAATCCTGTCCACCTTGTGGTTGAAGGAT
CTGGATCCTGCATCTTCAATCCACACCAATTTACCTAGGTATCCCCATCCCCCTACACACACACACACCC
GCATTTTCAATCCACATCAATTTACCTAGGTATCCCCACTCCCTACACACACACACACCCACACACACC
CTGGCCTAGAATGGTGGGGAGGGGAAAGTCTGGGCTGATGGTAGGGCCAGCAGAGCCAGGGTCCAAGG
GCTTTGCAACGTCTCTGTACCTGAAGAGGCAACTTGGTCTGTTTCAAAAATATGAACAATGCTGCCTTAC
AAGTGTTCCTGCCTAATCTTGTGTTTCCATTAGGAAGGCATTATTGTTCCCTTTTGTGGAGGGG
GAAACAGGCTCAGCGAGGACGACCTGCTCAGATCCTGTGTCTAGGATGCGTGGCCTAGAATCAGGTATCT
AGTGAGTGGCAGAGCTGCTGAGGCTGACCTCAGGCTGACCTCAGGCCCGAGGGATCTCAAAGCAGGGA
TTCAGTGTCCCTCCTCCCCAGCTGTGGCAGTTTGGTGTGAGTGGGTGGATGTGGTGGTGGATGACCTGC
TGCCACCAAGGACGGGAAGCTGGTGTGTTGTCACTTGGCCAAGGCAACGAGTTCTGGAGTGGCCCTGCT
GGAGAAGGCCTATGCCAAGTGTGAGTGGGGGCCACGGACAGCTCCAGGCCAGCCTGGTGGGGTCTCTG
CTTGTAGCAGATAAGTGTGACCTGGGCCGCCAGGGTGAACGGCAGCTACGAGGCCCTCTCAGAGGCCAG
CACATCTGAGGGCTTTGAGGACTTACCAGGCGGAGTACCGAGTGGTACGAGCTGCGCAAGGCCGCCAGC
GACCTCTACAACATCATCTCAAGGCCCTGGAGCGTGGCTCCCTGCTGGGCTGCTCCATCGATGTAAGTG
CCTCCCCATCCTGGGACCTGAGTCTCCTAGCGTTCTTCTCTACTCAGCCCAGCCTCAGACTTGGC
ACGGGCTTGGCTCCAGACCCTGTCTTTGCCTCACACCATCCCTGGATCCTCAGCCAGCCTGGCTCATCA
CCTCAGTCTGTCTCCACCTCCATGCCTGGCTTCTCCTGTTTCCAAAACCTCAGACTTACGATGTT
CTCCAATCTCTTTCTGTATCTGAGGCCATGCCTGTGCGCTGTCCAGTTCACAGCCTGGCCTCAGC
TCCTCCGAGTCCAGTTCTGTGGGCCCCAGACTCCCCATTTGTTCCCTTCAAGTGTCTCTGTTCC

ACTTATCTTCAGACCTCCCTCATCCTTGATCTCGGCCTCCACCGCCACCATCACTGCATTCTCCATTCTA
 ACCCCGCTGCCGCGCTCTTCCCCAGCCCTACCCGACTCTAGTCTCTGCTCACCCCTCTTCTCTGCCTCCC
 TGAGTCCCTCCACATGAGGTCCTCTGAGGACCTCGTGGCTCCTGGGTGAGGGGAGAGGCTTTGCATGGCT
 GTATGTTTGTGTTACGCATGTGTGCCAGGGTCTGGCCAGCTCTGGCCAGAAGCAGTGTCACTGGGGTG
 CACACCCCTCCACCAGCAGTATCATTGGTGGAGTAGCCAGCAGCTCCCCCTTCCAGGGACTGAGATGGG
 GTCAGGGGTCCTGCCATCACTCCAGTAACTGTGGGTGTATGCAAGGAAAGCCAGGACTCGGGGCTCA
 TCTCCTGAATGGGGTGGGGACAGCGCCGAGCCATGTGTCTTTCTGCAGATCTCCAGCATTCTGGAC
 ATGGAGGCTGTACCTTCAAGAAGCTGGTGAAGGGCCACGCTACTCTGTGACCGGGGCCAAACAGGTAC
 TGCCCCAGGTGGAGTCTTCCCCAAAGGGTGGTTCCAGCTCCTTGCCTCTCTGGCCTGTGGCCAAGGCT
 GTGGGAGAGGCCGACTCTCCCCGTGACCTTACGAGCACCTTCTATCTCCAGGGACTCTCGCCCAAAG
 ATGGTTATCTGTCCACCCTGATTTACTGTACTTTGTGTGTAGAGCTGCCTCTCTCAGCAGTTTATGCC
 CAGACAGGCTTCTCAGCTGTGCTTCCAAAGGTGGGTGCTGGGTGCTGAGCTGGGCTCTGTGAGGATGAGG
 TGGTGGGAAGGGTGTAAAATGTGTGCCAGAAGCAGGCGCTGACGTGAGCTCTGGGGAACAGGTGA
 ACTACAGGGCCAGGTGAACTGATCCGGATGCGGAACCCCTGGGGCGAGGTGGAGTGGACAGGAGCCTG
 GAGTGACGGGTGAGGGTCCATGGAGGCTGGCCGGGAGGCCTGGGAAGACTCTTCAGTGCCACTGGCATT
 TCTGCTGGGGTCTCTGCCATCCCACAGTGGACTCAGGCTTGAACAGAGGGGGCCATCTGCGTGTGACTGG
 GTCTGGGGACTGCCCTGGCAAAGCTCAGGCTGTGCGTGCAGGCGGCTGTGCCACCTACCAGCATCCTCG
 GGGCGTCTGAGCTGGCCCTCATAAGATAACCCCTGGGACTGGGGTCTCTGGACTTGCCCTTGTGGAGGCC
 TCCTGACCTGGGCCAGGGAAGGACAGGCCCCAGGGATAGAGGCTGGGCAGGTGAGTGGCCGCCAGCCCT
 GGCAGTGCCGTTTTCTACAGCTCCTCGGAGTGGAAAGCGCGTGGACTCCTTACATGCGGGAGCAGCTCCGG
 GTCAAGATGGAGGATGGGGAGTTCTGGTGAGCAGCCCCCTCCTCAGTCTGAGTGGGCACCCAGCTCCCA
 ACCCACCCTTGAACACAGCTGTGCCATGTCTTTGATGCCTCGACTGGGCATCCTGGTTCACTCTC
 ACCTCGACCCCCAGGATGTCTTCCGAGACTTCATGCGTGAATTCACCCGCTGGAGATCTGCAACCTG
 ACACCCGACGCGCTCAAGAGCCAGAGGTTCCGCAACTGGAACACCACCCTGTACGAGGGCACCTGGCGGC
 GGGGGAGCACCGTGGGGGGCTGCCGCAACTACCCAGGTGACCTGGGGAGTGGGGTCTGGGCCCTGCTGC
 CCTGGACAAGACGTATCTTCTCTCTGAGCCTGTTTCTCACCTGTAAGATAGGGGTAGTTGTACTTGT
 TGCAAAATTTGGTTTGGAGGATGAAAAAGTGTGAATTCACCAAGAGCCACCTTTGACTGCCTTGTGGAGCCT
 GAGCTCAGGGTGCAGGAGAGGAGACTTCTTGTGTCCAGCCACCTCCTGTCACTCCTCCTTCCGGGCC
 TTCTCCTGGCCCGCTGTCTCCCTCCTTGGTCCCTTGTGCGCTTCCCTGGGGTCCATGGGCATCCTT
 CTCTCCACCCTGCCTTCTCTTAAACAG

■ Marcador *CAPN1-316*

GAGCTGGCCCTCATAAGATAA CAPN1-316F

GGTCAAGATGGAGGATGGG CAPN1-316R

□ Sitio de restricción de la enzima *Btg I*

ANEXO 3.SECUENCIA DEL GEN CAST

ATGAGAAAAAACC~~CAAGAAGTAAAGCCAAAGGAACACACA~~GAGGTAAGTAATCATTATTAGG
ACTTGATATCATAAGATGAAGCCTTTTTTTTTTCCCTTATTTTTGTGAAGGATAAAATTTTGAAC
TCTCATCTTTCAACACTTAAGTCCTACCTAGAATGGCAGTTATTTGTTTTCTGTTAAACGGCA
CCTCTGTGTGGCATCAGCAGGTATTGCAATTTGCTTGTGTGATTCTTGCTGAATTTGGAAGGA
AGGAATTGCATTGTTTCAAATTTTCTACCCAAAGTAAAATTTGTCACATGTAAATCATACTAATT
TAAATTCTCACAATTGACTACATAAAACACAAGTGTTATGAATTGCTTTCTACTCCTCAGAGAAA
AGTAGCAATATGTGTCATATTATTAACCCCATGGGGTGTATGCGTGTTCAGCCAAAAAGCCT
ACCCAAGCACTCATCAGATACAGGAAGCAAGCATGCTCCTAAGGAAAAAGCCGTTTCCAATC
AAGTGAGCAGCCACCATCAGAGAAATCAACAAAACCAAAG

■ Marcador *CAST*

GAGCTGGCCCTCATAAGATAA CAST F

GGTCAAGATGGAGGATGGG CAST R