



Revista de la Facultad de Medicina
Veterinaria y de Zootecnia

ISSN: 0120-2952

rev_fmvzbog@unal.edu.co

Universidad Nacional de Colombia Sede
Bogotá
Colombia

Leal-Gutiérrez, J. D.; Jiménez-Robayo, L. M.

ANÁLISIS COMPUTACIONAL DEL EFECTO DE POLIMORFISMOS DE GENES DEL
SISTEMA m-CALPAÍNA/CALPASTATINA SOBRE LA CALIDAD DE LA CARNE BOVINA

Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, vol. 62, núm. 1, enero-junio, 2015, pp. 50-66

Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá
Bogotá, Colombia

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=407640815005>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

ANÁLISIS COMPUTACIONAL DEL EFECTO DE POLIMORFISMOS DE GENES DEL SISTEMA μ -CALPAÍNA/CALPASTATINA SOBRE LA CALIDAD DE LA CARNE BOVINA

J. D. Leal-Gutiérrez¹, L. M. Jiménez-Robayo¹

Artículo recibido: 2 de mayo de 2014 • Aprobado: 6 de noviembre de 2014

RESUMEN

Los genes del sistema de enzimas μ -Calpaína/Calpastatina han sido ampliamente evaluados en estudios de asociación respecto de parámetros de calidad cárnica como la terneza; previamente se han identificado varios polimorfismos asociados con la variación fenotípica en poblaciones no relacionadas de bovinos. Usando herramientas computacionales se logró postular la asociación de cuatro polimorfismos encontrados en μ -Calpaína y 11 en Calpastatina que producen una alteración de los parámetros físico-químicos, tanto del ARNm (estabilidad y polimorfismo conformacional), como de la proteína (punto isoeléctrico, potencial electrostático y superficie molecular). Es importante poder establecer el soporte biológico de polimorfismos genéticos asociados con parámetros fenotípicos que mejoren la productividad animal, lo que hace que la aproximación *in silico* se convierta en una herramienta útil para tal fin.

Palabras clave: asociación fenotipo-genotipo, *in silico*, polimorfismos y tenderización.

COMPUTATIONAL ANALYSIS OF POLYMORPHISMS IN GENES OF THE μ -CALPAIN/CALPASTATIN SYSTEM IN BOVINE MEAT QUALITY

ABSTRACT

μ -Calpain/Calpastatin enzymatic system are extensively evaluated in tenderness association studies of beef quality and several polymorphisms of these same genes have been reported previously associated with phenotypic variation in non-related bovine populations. Computational tools were used to screen four polymorphisms in μ -Calpain gene and 11 in Calpastatin gene that can alter the physical and mRNA chemical properties (stability and conformational polymorphism) and its respective proteins (isoelectric point, electrostatic potential and molecular surface) of polymorphisms previously reported in public databases. *In silico* aproximation is a useful tool in phenotype-genotype association studies because can provide a biological support to this type of animal production traits.

Keywords: phenotype-genotype association, *in-silico*, polymorphism and tenderization.

¹ Departamento de Ciencias de la Producción Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Cra. 30 nro. 45-03, Bogotá. Colombia.

* Autor para correspondencia: dlealg@unal.edu.co

INTRODUCCIÓN

Una vez ocurre la exanguinación de los animales, las células musculares ingresan en el proceso de muerte celular programada (Ouali *et al.* 2006) dando lugar inicialmente a la etapa de *rigor mortis* y después a la fase de tenderización. Durante esta última fase ocurre la maduración *post-mortem* que permitirá el paso del músculo a carne, mediada por los procesos proteolíticos que inducen cambios en la microestructura de la carne, permite su ablandamiento e induce la movilización del agua que contiene (Straadt *et al.* 2007). Este proceso de ablandamiento o tenderización de la carne se da mediante la disrupción de conexiones costaméricas e inter-miofibrilares (Bee *et al.* 2007), siendo susceptibles algunas proteínas como Desmina, Actina, Miosina de cadena pesada, Miosina de cadena ligera I, Troponina T, Tropomiosina a1, Tropomiosina a4, Tioredoxina, CapZ (Lametsch *et al.* 2004) y Talina (Bee *et al.* 2007). La tenderización es dependiente de la arquitectura y la integridad de la célula muscular, la cual es modificada por la actividad de proteasas endógenas (Huff-Lonergan y Lonergan 2005; Koo-hmaraie y Geesink 2006) que son muy susceptibles a factores microambientales de la célula muscular como el pH y su descenso durante la fase *post-mortem* (Bee *et al.* 2007; Silva *et al.* 1999), así como a la tasa de oxidación.

A lo anterior se suma el efecto de factores ambientales y genéticos que pueden modificar la tenderización final del producto. Entre los primeros, se pueden citar factores de manejo del animal a nivel de granja como la dieta, el tiempo de ayuno a nivel *peri-mortem* y el proceso de enfriamiento de las canales y de las piezas cárnicas a nivel *post-mortem*. Entre los factores genéticos, se ha reportado la existencia del

efecto racial y de composición genética de los individuos (Chambaz *et al.* 2003; Monsón *et al.* 2004, 2005; Sañudo *et al.* 2004; Strydom *et al.* 2000) que puede ser explicada por el efecto de polimorfismos en genes con influencia sobre el fenotipo (Casas *et al.* 2006; Chung y Davis 2011; Ciobanu *et al.* 2004; Iwanowska *et al.* 2011; Page *et al.* 2002; Pinto *et al.* 2010). A lo anterior se añade la existencia de una posible interacción entre los factores ambientales y los factores genéticos que puede llegar a modular la tasa de degradación proteolítica y, por lo tanto, el grado de tenderización de la carne.

La tasa de tenderización en el *post-mortem* de la carne tiene un período neurológico durante la primera semana de maduración, tal como fue reportado por Campo *et al.* (2000), quienes indicaron que el grado de tenderización ocurrido en las piezas cárnicas durante este período es superior al 88% del total y corresponde al momento en que las enzimas encargadas de la proteólisis juegan un papel relevante. El sistema proteolítico endógeno más destacado en la evaluación de parámetros de asociación con calidad cárnea, corresponde al sistema conformado por los genes de μ -Calpaína (CAPN1) y Calpastatina (CAST). El primero corresponde a la proteína encargada de realizar la lisis enzimática de varias proteínas sustrato (Casas *et al.* 2006), que junto con la μ -Calpaína (CAPN2), poseen expresión ubicua (Hanna *et al.* 2008) y actividad enzimática dependiente de calcio (Kapprell *et al.* 1989). La CAST corresponde al inhibidor específico de la CAPN1 y es codificada a partir de un gen de copia única que posee como característica estructural cuatro promotores (Motter *et al.* 2009) los cuales permiten la producción de las variantes I, II, III y IV. Las tres primeras

corresponden a variantes existentes en el músculo esquelético y la variante IV ha sido reportada como específica del testículo (Raynaud *et al.* 2005). Un tercer componente del sistema es la subunidad pequeña de la Calpaína (CAPNS) la cual se puede unir a cualquiera de las dos enzimas, μ ó m-Calpaína (Hanna *et al.* 2008), siendo la enzima activa a nivel cuaternario un heterodímero (Moldoveanu *et al.* 2008).

Varios polimorfismos de los genes que conforman este sistema se reportan asociados con parámetros de terneza de la carne, pero no se conoce el mecanismo de acción bajo el cual estos marcadores moleculares logran modificar la actividad enzimática causando una calidad variable del producto final. Entre los marcadores de los genes CAPN1 y CAST que se han reportado asociados con terneza en la carne bovina se encuentran, tanto marcadores ubicados en regiones intrónicas como CAPN4751, CAPN4753, UOGCAST1 (Curi *et al.* 2010; Pinto *et al.* 2010) y CAST1 (Casas *et al.* 2006), como en regiones exónicas entre los que se citan CAPN316 y CAPN530 (Pinto *et al.* 2010). Para el caso del polimorfismo CAPN4751, Pinto *et al.* (2010) reportaron una disminución en el valor de *Slice Shear Force* en 0.27, 0.30 y 0.34 kg para los días 7, 14 y 21 de maduración cuando se compararon los genotipos CC-TT, de modo similar a lo reportado por Papaleo *et al.* (2010) quienes también hallaron una reducción en 0.17, 0.21 y 0.25 kg al comparar los genotipos CC-GG, utilizando el marcador UOGCAST1 y evaluando los mismos períodos de maduración en el *Longissimus dorsi* de animales Nelore. Por lo anterior, se considera importante que en los estudios de asociación con SNPs (Polimorfismos de Nucleótido Simple) u

otros tipos de marcadores moleculares, se pueda establecer un soporte biológico del efecto que tienen estos polimorfismos sobre la regulación transcripcional del gen, la estabilidad e información análoga y digital que contiene el ARNm (Andrade 2011) y/o alteraciones de los parámetros físico-químicos de la proteína. Lo anterior tiene como objetivo principal reducir los “falsos positivos” (Hoggart *et al.* 2008), dadas las consecuencias que esto acarrearía si estos polimorfismos se incluyen en programas de selección animal. Por lo anterior, el objetivo de este documento fue determinar el efecto *in silico* de polimorfismos previamente reportados, ubicados en las regiones transcritas de los genes bovinos de la μ -Calpaína y la Calpastatina, con el fin de evaluar su efecto sobre algunos parámetros físico-químicos del ARNm y de la proteína.

METODOLOGÍA

Secuencias y SNPs empleados

Para la Calpaína (CAPN1) fueron empleadas las secuencias bovinas NM_174259.2 (ARNm) y NP_776684.1 (proteína) mientras que para la Calpastatina (CAST) se usaron las secuencias NM_174003.2 (ARNm) y AAA19643.1 (proteína), las cuales en este artículo se consideran alelos silvestres. Es necesario aclarar que para este análisis se seleccionó la variante II de CAST debido a que Raynaud *et al.* (2005) la reportaron previamente como la más abundante en el músculo esquelético bovino. Los polimorfismos tipo SNP empleados fueron aquellos ubicados en la región transcrita de los genes CAPN1 y CAST y se listan en la Tabla 1. Estos polimorfismos fueron ubicados manualmente en cada secuencia.

Modelamiento del ARNm

Para la determinación de la estructura secundaria más probablemente adoptada, así como para calcular el valor de Energía Mínima Libre (ΔG) de las secuencias silvestres del ARNm de CAPN1 y CAST bovinas, se empleó el software MFold (Zuker 2003) realizando el análisis bajo la programación de temperatura fisiológica. El mismo procedimiento fue llevado a cabo en cada uno de los polimorfismos evaluados en ambos genes.

Modelamiento proteico

Los dominios constituyentes de las proteínas fueron determinados mediante el servidor CD-Search (Marchler y Bryant 2004) del NCBI. El modelamiento por homología fue empleado para la determinación de la estructura terciaria y cuaternaria (CAPN1-CAPNS-Ca²⁺) de CAPN1 usando el servidor SwissModel (Arnold *et al.* 2006; Xiang 2006) y el software Deep Viewer (Guex y Peitsch 1997, www.expasy.org). El servidor I-Tasser (Roy *et al.* 2010; Zhang 2008) fue empleado para el modelamiento de la proteína CAST. La minimización energética de cada proteína fue realizada mediante Gromos96 (Arnold *et al.* 2006; Xiang 2006). Adicionalmente el modelamiento del complejo CAPN1-CAPNS-Ca²⁺-CAST se hizo con el servidor SwissModel (Arnold *et al.* 2006; Xiang 2006).

El valor de punto isoeléctrico (PI) fue obtenido mediante el servidor Protparam (www.expasy.org) y el potencial electroestático y la estructura superficial con el software Deep Viewer (Guex y Peitsch 1997; www.expasy.org) empleando la secuencia silvestre de las proteínas CAPN1 y CAST bovinas. El mismo procedimiento fue realizado con cada uno de los polimorfismos

missense evaluados en ambos genes en el presente estudio.

RESULTADOS

En las Figuras 1 y 2 se presenta la estructura de los genes bovinos CAPN1 y CAST, respectivamente. De los polimorfismos reportados previamente en NCBI, se emplearon 12 SNPs localizados en el gen CAPN1, tres de los cuales eran de tipo *missense* y, por consiguiente, modifican un aminoácido en la secuencia proteica, mientras que para el gen CAST fueron empleados 29 SNPs de los cuales cinco eran tipo *missense* (Tabla 1).

SNPs y estabilidad del ARNm

El valor de Energía Mínima Libre (ΔG) calculado para el ARNm silvestre de la Calpaína fue de -1154.77 kcal/mol. Las secuencias CN2, CN5, CN12 y CN11 de este mismo gen presentaron un incremento en su estabilidad, ya que mostraron valores de -1159.73, -1159.17, -1158.59 y -1157.45 kcal/mol, respectivamente. Por su parte, en la secuencia CN6 se pudo observar que la presencia del SNP produce desestabilización de la molécula que se explica por el incremento en su valor de ΔG a -1150.82 kcal/mol.

En el caso del gen CAST, se obtuvo un valor de -1084.57 kcal/mol para la secuencia silvestre mientras que las secuencias CS5 (-1097.57), CS17 (-1091.6) y CS29 (-1090.7) mostraron un incremento en la estabilidad. Las secuencias CS28 (-1079.12 kcal/mol) y CS9, CS12, CS13, CS22, CS23 y CS26 (con el mismo valor: -1079.42 kcal/mol) muestran una pérdida en su estabilidad *in silico*. En la Figura 3 se presenta el plegamiento bidimensional de las secuencias silvestres de ambos genes y de aquellos polimorfismos que mostraron modificación de este parámetro.

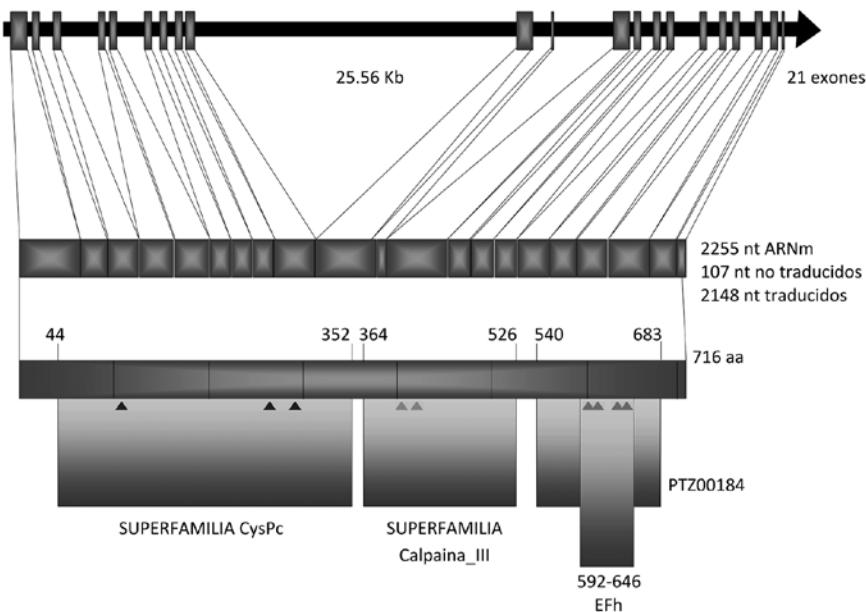


FIGURA 1. Estructura del gen de la μ -Calpaína bovina (CAPN1). Los dominios predichos en la proteína lineal son presentados. Los aminoácidos constituyentes de los sitios activos de la molécula son destacados así: primeros 3 triángulos (izq.): el sitio catalítico; triángulos centrales (2): formación de un loop ácido involucrado en la activación de la molécula durante su unión al Ca²⁺; últimos 4 triángulos (der.): sitio de unión al Ca²⁺.

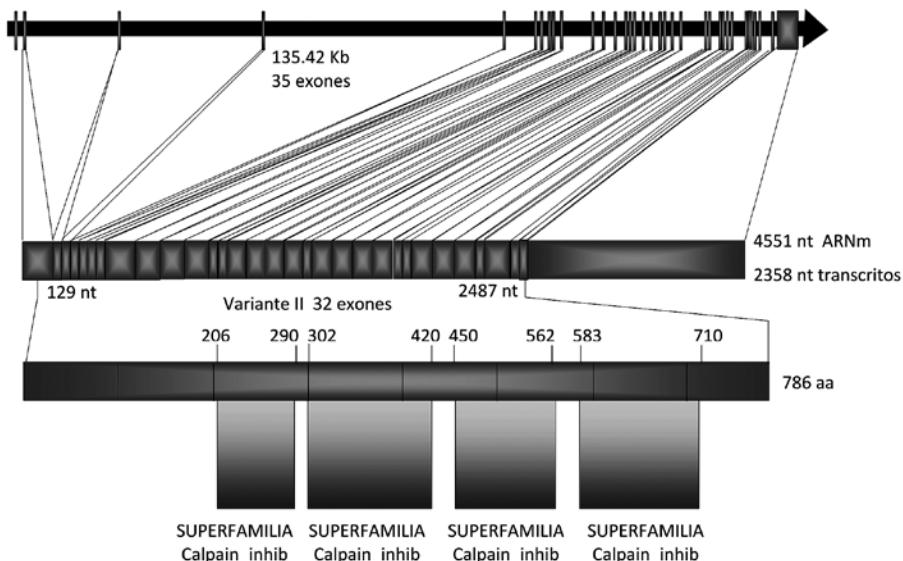


FIGURA 2. Organización del gen de la Calpastatina bovina (CAST). Los dominios predichos en la proteína lineal producto de la variante II de la CAST bovina son presentados.

TABLA 1. SNPs empleados y cambios producidos en ARNm y proteína.

Secuencia	Número de acceso	ARNm				Proteína	
		Posición	Silvestre	Cambio	Posición	Silvestre	Cambio
CN1	ss269202866	543	T	G	156	F	V
CN2	ss28452420	656	A	G	193	K	K
CN3	ss28451369	665	C	T	196	A	A
CN4	ss86317594	707	A	G	210	T	T
CN5	ss28452434	734	C	T	219	G	G
CN6	ss28450971	917	A	G	280	K	K
CN7	ss28452341	1024	G	C	316	G	A
CN8	ss77832255	1088	A	C	337	S	S
CN9	ss269202884	1190	T	C	371	Y	Y
CN10	ss28451391	1661	C	T	528	D	D
CN11	ss28451392	1665	G	A	530	V	I
CN12	ss269202966	2225	G	A	716	A	A
CS1	ss140795116	271	G	A	48	D	G
CS2	ss265255855	283	C	T	52	L	P
CS3	ss117962530	596	T	C	156	S	S
CS4	ss423036926	672	A	G	182	T	A
CS5	ss77832279	872	C	T	248	T	T
CS6	ss77832274	878	G	A	250	P	P
CS7	ss140795256	1448	C	T	440	I	I
CS8	ss115456737	1529	A	G	467	P	P
CS9	ss115456738	1544	G	A	472	V	V
CS10	ss115456739	1574	T	C	482	S	S
CS11	ss115456740	1615	C	T	496	V	A
CS12	ss115456748	1643	C	T	505	E	E
CS13	ss115456750	1721	G	A	531	E	E
CS14	ss115456769	2074	G	C	649	S	T
CS15	ss46527044	2870	A	G	NA	NA	NA
CS16	ss77831764	2959	A	G	NA	NA	NA
CS17	ss430490950	2987	T	C	NA	NA	NA
CS18	ss77832273	3016	A	T	NA	NA	NA
CS19	ss430490951	3138	G	A	NA	NA	NA
CS20	ss140795309	3148	C	T	NA	NA	NA
CS21	ss140795310	3160	C	G	NA	NA	NA
CS22	ss430490954	3254	C	A	NA	NA	NA
CS23	ss430490955	3272	G	A	NA	NA	NA

Tabla 1 (cont.)

Secuencia	Número de acceso	ARNm			Proteína		
		Posición	Silvestre	Cambio	Posición	Silvestre	Cambio
CS24	ss265256266	3320	G	C	NA	NA	NA
CS25	ss423036988	3350	C	T	NA	NA	NA
CS26	ss430490956	3351	G	T	NA	NA	NA
CS27	ss423036989	3697	C	A	NA	NA	NA
CS28	ss423036990	3698	G	A	NA	NA	NA
CS29	ss77831765	4333	G	A	NA	NA	NA

CN: polimorfismos evaluados del gen CAPN1; CS: polimorfismos evaluados del gen CAST. La codificación de cada uno de los polimorfismos empleados en el análisis es presentada. NA: no aplica.

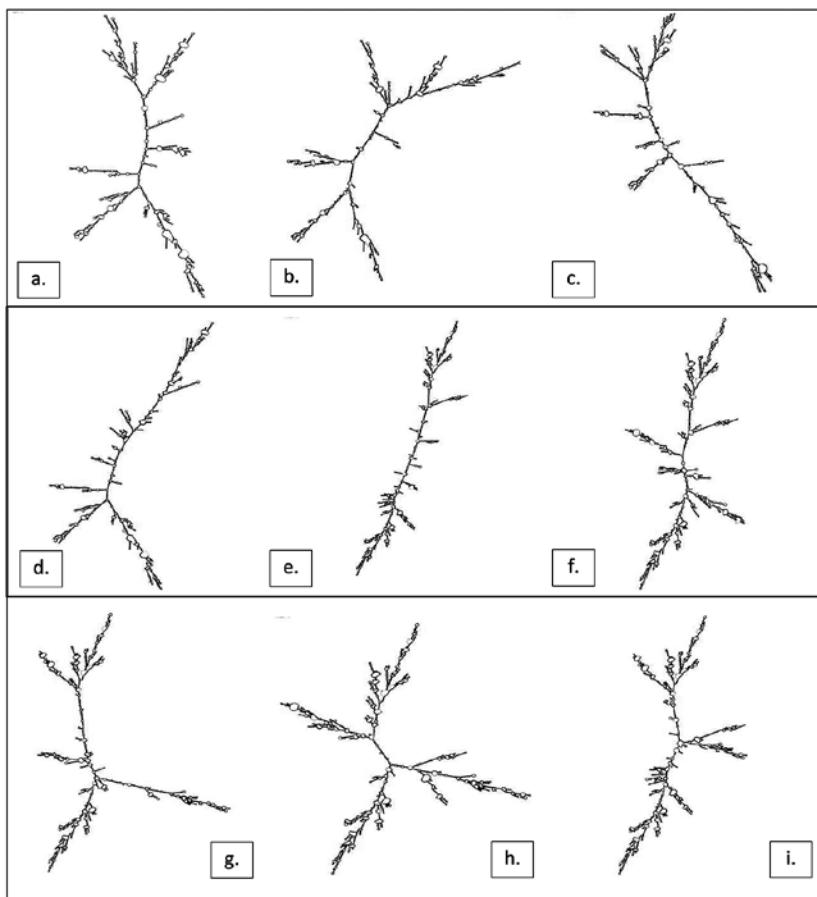


FIGURA 3. Polimorfismo conformacional del ARNm en CAPN1 y CAST: a. silvestre de CAPN1, b. CN2 (más estable), c. CN6 (menos estable), d. CN9 con una estructura alterna; e. silvestre CAST, f. CS5 y g. CS17, incrementan su estabilidad; h. CS28 e i. CS9, más inestables. CS9 presentó el mismo valor de ΔG que CS12, CS13, CS22, CS23 y CS26.

Efecto sobre las proteínas CAPN1 y CAST

En las Figuras 1 y 2 se presentó la ubicación lineal de los dominios establecidos en los genes bovinos CAPN1 y CAST, en la Figura 4 se observa su ubicación tridimensional en CAPN1 (templete 1qxpB, con una identidad del 75.81% y una cobertura entre los residuos 13 y 715) y en CAST; se representa el proceso de activación de la proteína terciaria CAPN1 bovina (unión a CAPNS y 10 átomos de calcio) y luego se presenta su inactivación mediante la unión de uno de los cuatro dominios de CAST. Para realizar este modelo (Figura 4d), se empleó el templete 3bow de PDB modelando el complejo de la enzima Calpaína activa (con la respectiva proteína CAPN1 bovina) unida al segmento D502-T591

(tercer dominio y ocho residuos del cuarto) de la proteína CAST bovina.

En la Figura 5 se muestran las superficies de contacto entre las tres proteínas y en la Figura 6 se detallan los sitios activos de los tres dominios de CAPN1 detectados. El potencial electroestático fue uno de los parámetros evaluados que no fue afectado por ninguno de los tres polimorfismos de tipo *missense* evaluados. En el caso de la CAST se observó una alteración en la superficie proteica cuando se encontraban presentes los SNPs CS4, CS11 y CS14 (Figura 7). En la Tabla 2 se presenta el parámetro PI en las secuencias silvestres y sus polimorfismos. El único SNP que logra modificar este parámetro en los genes del sistema fue CS1, pasando de 5.42 a 5.45.

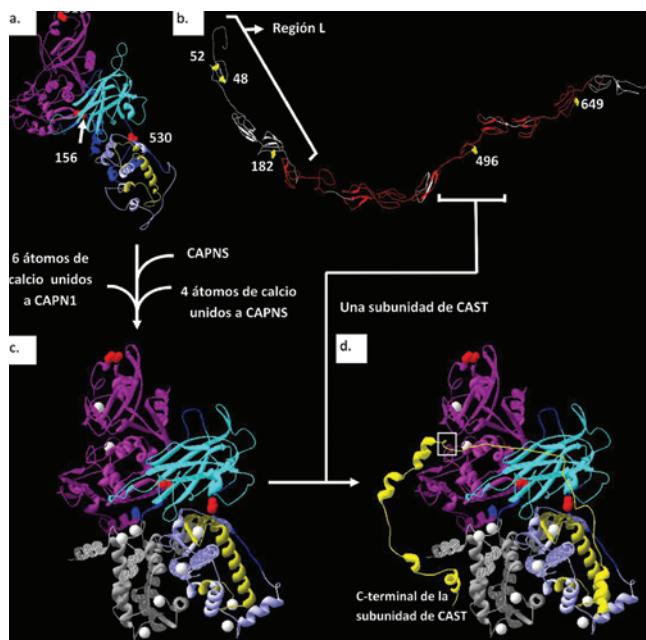


FIGURA 4. Estructura tridimensional de la CAPN1 y CAST bovinas y de sus polimorfismos. La ubicación tridimensional de los motivos predichos es presentada así: a. En morado: superfamilia CysPc; en azul claro va la superfamilia CalpaínaII; en lila: PTZ00184; en amarillo: EFh. b. Ubicación de las cuatro superfamilias Calpain_inhib de la CAST bovina. c. proceso de activación de la CAPN1 mediante su unión a la CAPNS y un total de 10 átomos de Ca²⁺ (esferas blancas). d. Proceso de inactivación de la CAPN1-CAPNs-Ca²⁺ mediante su unión a uno de los cuatro dominios de CAST (cinta amarilla); el recuadro blanco se presenta un loop de CAST involucrado en la inactivación del sitio catalítico de la Calpaína.

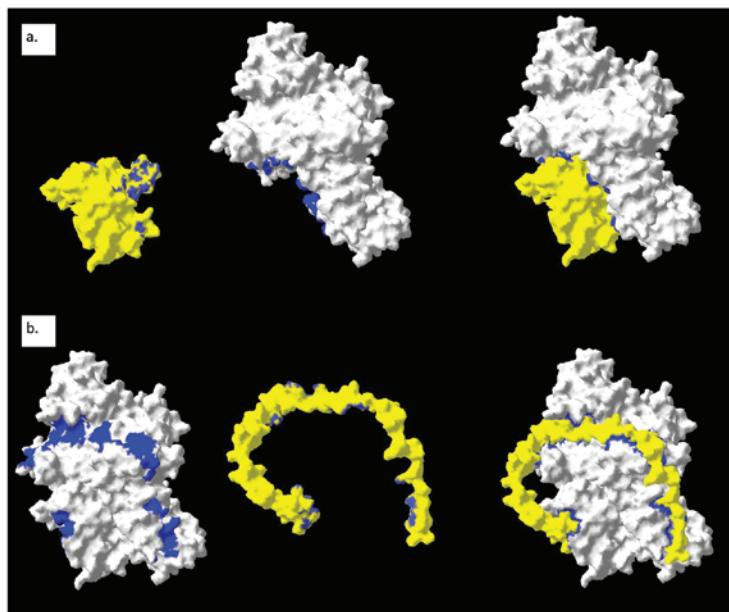


FIGURA 5. Superficies de contacto (azul) entre las moléculas del sistema: **a.** Entre CAPN1 (gris) y CAPNS (amarillo). **b.** Entre CAPN1-CAPNs (gris) y un dominio de CAST (amarillo).



FIGURA 6. Sitios activos de CAPNS-CAPNS-Ca²⁺: en CAPN1, en rojo: el sitio catalítico; en verde: formación de un loop ácido involucrado en la activación de la molécula durante su unión al Ca²⁺; en morado: sitio de unión al Ca²⁺ y en CAST se detalla en naranja el segmento TIPPEYR reportado por Hanna *et al.* (2008) y Moldoveanu *et al.* (2008).

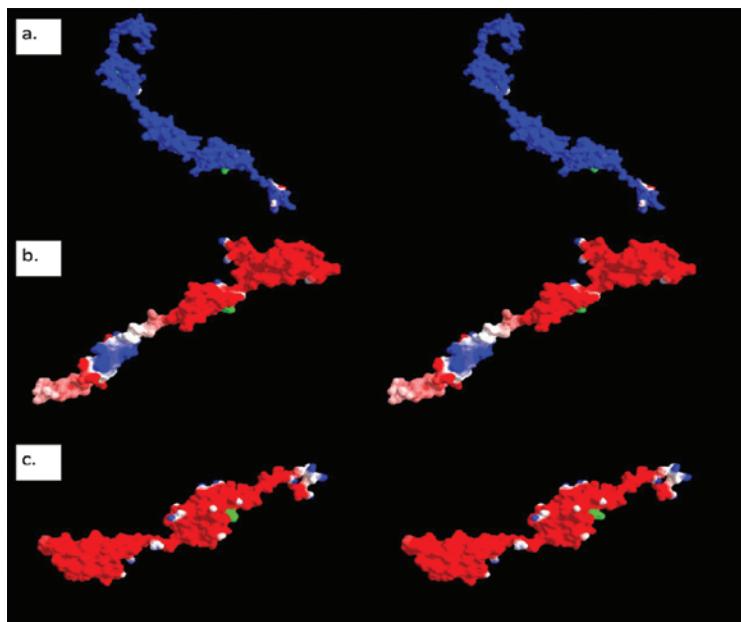


FIGURA 7. Alteraciones producto de los polimorfismos puntuales en la proteína CAST bovina. Las superficies moleculares del alelo silvestre y su correspondiente polimorfismo son comparados así: **a.** 182A, **b.** 496A, **c.** 649T de la CAST bovina en un segmento contenido de la proteína. El aminoácido sustituido se presenta en verde. El color rojo representa aminoácidos con potencial electrostático negativo y en azul aquellos de potencial positivo.

TABLA 2. Parámetros de la proteína alterados por la presencia de los SNPs evaluados.

Secuencia	Parámetro	
	Peso molecular	Punto isoelectrónico
Silvestre	82207.3	5.42
CN1	82159.3	5.42
CN6	82221.3	5.42
CN9	82221.3	5.42
Silvestre	84220.4	5.42
CS1	84162.4	5.45
CS2	84204.4	5.42
CS4	84190.4	5.42
CS13	84192.4	5.42
CS16	84234.5	5.42

DISCUSIÓN

El papel de la μ -Calpaína como enzima proteolítica en el proceso de formación de la carne fue esclarecido a través del estudio realizado por Geesink *et al.* (2006) quienes, empleando ratones *knock-out* para el gen CAPN1, pudieron determinar una inhibición de la degradación de proteínas sustrato como Nebulina, Metavinculina, Vinculina, Desmina y Troponina T hasta el día 3 *post-mortem*. Lo anterior confirma que la μ -Calpaína está realmente involucrada en el proceso de tenderización dada su actividad *post-mortem* (Boehm *et al.* 1998; Pomponio *et al.* 2008; Gil *et al.* 2011; Kristensen *et al.* 2006).

Para el caso de CAPN2, Koohmaraie y Geesink (2006) establecieron la ausencia de autolisis (su presencia se considera un indicador del proceso de la activación de la Calpaína) de esta proteína en el músculo bovino, siendo una de las razones para determinar que no se encuentra involucrada en los procesos de tenderización. Algo similar ocurre con la CAPN3 (o p94), que aunque Geesink *et al.* (2005), utilizando ratones *knock-out*, concluyeron que no estaba involucrada en la proteólisis *post-mortem*, ha sido empleada en otros estudios de asociación con parámetros productivos de calidad de la carcasa y calidad cárnea (Café *et al.* 2010 a y b).

ARNm y la sustitución de bases

Los motivos producidos en las moléculas de ARNm están involucrados en la regulación post-transcripcional, tales como las secuencias Kozak (homólogas de las secuencias Shine-Dalgarno en procariotes) o las señales de poliadenilación. Este tipo de secuencias han sido establecidas como regiones que permiten la interacción del ARNm con estructuras adyacentes específicas (como lo establecen Shen *et al.* 1999 en su reporte).

Adicionalmente, las estructuras secundaria y terciaria adoptadas por esta molécula (definidas por Andrade 2011 como la información análoga del ARNm) son críticas para su función regulatoria, mediante su interacción con factores proteicos o con otros ARNs (Klaff *et al.* 1996), lo que va a mediar procesos de síntesis, maduración, transporte, traducción o degradación (Shen *et al.* 1999) del ARNm y, por lo tanto, tienen la capacidad de modificar la expresión.

Un ejemplo de efecto de este tipo de regulación de la expresión se reporta en el estudio de Johnson *et al.* (2011), quienes emplearon un total de 153.397 SNPs localizados en regiones exónicas del genoma humano y determinaron que 65.9% de éstos modificaron el valor de ΔG y el 93.6% lograron alterar las estructuras bidimensionales nativas, produciendo el denominado “polimorfismo conformacional del ARNm”. Se destaca la importancia de este tipo de polimorfismo conformacional, ya que puede ser una fuente de variación fenotípica importante al afectar la estabilidad de la molécula y producir ARNm alternativos (Johnson *et al.* 2011), lo que puede modificar el procesamiento proteico y la eficiencia transcripcional (Mansoori *et al.* 2012). Lo anterior ha sido confirmado en trabajos previos que emplearon para el análisis polimorfismos de regiones exónicas del gen del receptor D2 de la dopamina humana (Duan *et al.* 2003) que pudieron establecer por qué los polimorfismos de tipo sinónimo (Duan *et al.* 2003; Parmley y Hurst 2007) o aquellos presentes en las regiones UTR (Halvorsen *et al.* 2010) pueden estar asociados a un efecto fenotípico tan complejo como es el caso de muchas enfermedades del humano como la hipertensión (Halvorsen *et al.* 2010). Otros trabajos previos, como el de Leal y Jiménez (2013), muestran

cómo algunos polimorfismos de nucleótido simple, reportados previamente en el GenBank en las regiones exónicas del gen de la Desmina bovina, pueden generar polimorfismos conformacionales (*in silico*) en el ARNm y, por lo tanto, contribuir a la variación fenotípica al modificar el proceso de traducción de esta molécula. Por lo anterior, estas sustituciones nucleotídicas pueden tener mayores posibilidades de modificar la cantidad de proteína existente en el citoesqueleto del miocito, recordando que esta proteína es el principal sustrato de la μ -Calpaína en el proceso de tenderización de la carne. Algo similar es presentado en el reporte de Leal y Jiménez (2014) al evaluar *in silico* el gen PRKAG3 bovino.

En el presente trabajo se pudo confirmar la relación entre la presencia del SNP, la generación del polimorfismo conformacional del ARNm y la modificación de la estabilidad de la molécula. En el análisis realizado por Allais *et al.* (2011) se emplearon los polimorfismos designados en el presente documento como CS16 y CS29, los cuales se encuentran ubicados en la región 3'UTR de CAST (CAST-2 y CAST-3, respectivamente). Se encontró que CS16 (alelo G de CAST-2) está asociado a carnes más duras evaluadas mediante *Warner Bratzler Shear Force* (WBSF) y panel sensorial en la raza Charolais mientras que en la raza Blonde d'Aquitaine sólo se encontró asociación con el panel sensorial. El reporte anteriormente mencionado coincide con el realizado por Casas *et al.* (2006), quienes determinaron a CS16 (alelo G de CAST-2) como asociado a carnes más duras. El análisis *in silico* realizado en el presente trabajo permitió observar que CS16 puede causar un incremento en la estabilidad de la molécula de ARNm de CAST, (con -1088.08 kcal/mol), mientras

que para la secuencia silvestre de la CAST bovina (alelo A de CAST-2) se encontró un valor de -1084.57 kcal/mol, lo que podría ocasionar una mayor expresión de la proteína CAST y, por lo tanto, una mayor tasa de inhibición de la CAPN1, dando como resultado carnes más duras.

Con base en lo anterior se puede concluir que el efecto *in silico* es consistente con el efecto fenotípico previamente reportado. De tal modo que los SNPs analizados *in silico* que modifican el valor de ΔG del ARNm, CN2, CN5, CN12 y CN11 (más estables de CAPN1) en conjunto con los SNPs *in silico* CS28, CS9, CS12, CS13, CS22, CS23 y CS26 (menos estables de CAST) conducirían a carnes más tiernas al existir una mayor actividad de CAPN1 y una tasa de inhibición menor por parte de CAST.

Estructuras proteicas tridimensionales de CAPN1 y CAST bovinas

La proteína CAPN1 bovina como se presenta en la figura 4 posee una disposición de dominios diferentes al heterodímero activo mediado por su unión a la proteína CAPNS y varios cationes de calcio que permiten la constitución de una molécula más compacta. Hanna *et al.* (2008) resaltan a los aminoácidos Cys105, His262 y Asn286 en la secuencia del humano como la triada de la catálisis, correspondientes en la estructura del bovino a los aminoácidos Cys115 His272 Asn296 (Figura 6), sitio ocupado por la CAST en su proceso inhibitorio (Figuras 4b y 5a). La proteína CAST no comparte homología con alguna proteína conocida hasta ahora (Todd *et al.* 2003) por lo que no fue posible hacer su modelamiento por homología; lo anterior es debido a que esta proteína no es estructurada tridimensionalmente (Figura 3), pero posee la capacidad de adquirir orden, al unirse a la Calpaína, aunque no es claro

cómo ocurre el proceso de inhibición sin que CAST sufra autólisis (Hanna *et al.* 2008). En lo referente al proceso de inhibición, Hanna *et al.* (2007) determinaron que una proteína CAST logra interactuar con cuatro moléculas de Calpaína, coincidiendo con la predicción de cuatro dominios en la secuencia del bovino (Figuras 2 y 4b), pero plantea la posibilidad de que cada dominio de CAST tenga una afinidad específica por la CAPN1 dependiendo del tejido en el que se encuentre. Como lo reportan Hanna *et al.* (2008), la CAST logra inhibir a la enzima ocupando el sitio activo de clivaje mediante un *loop* que ocupa la hendidura o sitio activo de CAPN1, ya que los dominios inhibidores de la CAST reconocen múltiples sitios de baja afinidad presentes en la forma asociada al calcio de la enzima, resultando en una interacción fuerte, específica y dependiente de este catión. Dos regiones de cada uno de los cuatro dominios inhibidores de CAST se involucran en el acople con una molécula de CAPN1-CAPNS, interactuando con los dominios contenedores de las cinco manos-EF (cuatro involucradas en la fijación del Ca⁺² y una relacionada con la formación del heterodímero CAPN1-CAPNS -Todd *et al.* 2003) y una tercera región de cada dominio de CAST que se relaciona con el sitio de clivaje (Moldoveanu *et al.* 2008). Todd *et al.* (2003) mencionan la posibilidad de que exista una sexta mano-EF, la cual fue predicha mediante el servidor CD-Search y es presentada en la Figura 4c y se encuentra próxima a la región de la triada de la catálisis. Hanna *et al.* (2008) y Moldoveanu *et al.* (2008) establecen la existencia de siete residuos altamente conservados en la proteína CAST humana que son cruciales para el contacto entre CAST y el sitio activo de CAPN1, los cuales corresponden a la secuencia TIPPEYR. En la proteína CAST del bovino se logró establecer la presencia

de tres regiones homólogas a la secuencia TIPPEYR, en tres de los cuatro dominios predichos, las cuales están conformadas así: T270LPPKYK276, T547IPPDYR553 (figura 6a) y T685IPPKYQ691.

SNPs y su efecto sobre las proteínas

El polimorfismo CN7 o CAPN316, en el trabajo de Pinto *et al.* (2010) fue establecido como causante de una reducción del parámetro de WBSF en 0.71, 1.1 y 0.69 kg cuando compararon los genotipos CG-GG a 7, 14 y 21 días de maduración en el músculo *Longissimus dorsi* de bovino, lo que coincide con lo descrito por Allais *et al.* (2011), Costello *et al.* (2007) y Papaleo *et al.* (2010). Allais *et al.* (2011) pudieron establecer que el alelo CN7 se encuentra asociado a una disminución en la dureza de la carne (medida por WBSF y en panel sensorial para la raza Charolais y con WBSF para la raza Limousin). En el presente análisis *in silico*, la presencia del alelo CN7 no produjo modificación alguna de los parámetros analizados del ARNm (estabilidad y polimorfismo conformacional) ni de la proteína (punto isoeléctrico, potencial electroestático y superficie molecular) respecto a la secuencia silvestre de CAPN1 bovina de estas moléculas. Una de las mayores problemáticas que posee el marcador CN7 es su utilización en estudios de asociación ya que presenta frecuencias alélicas muy bajas (0.08 en Pinto *et al.*, 2010 y 0.009 en Curi *et al.*, 2010). El hecho de que este tipo de polimorfismos presenten una frecuencia alélica muy baja en animales *indicus* revela dificultades al momento de poder emplearlo como un marcador asociado en programas de selección (Curi *et al.* 2010) en Colombia.

En relación con el marcador CN11 (alelo I de CAPN530) analizado en el presente estudio, el cual no está ubicado en

proximidades del sitio de unión de CAPN1 con CAPNS o con CAST, no produjo modificación alguna de los parámetros evaluados en la molécula de ARNm y en la proteína por lo que se asumiría que es menos probable que tenga un efecto en los parámetros fenotípicos asociados a la carne, lo que concuerda con los resultados del estudio de Allais *et al.* (2011), quienes no encontraron asociación de este marcador con los parámetros fenotípicos evaluados utilizando el músculo *Longissimus thoracis*. Sin embargo, Page *et al.* (2002) reportaron a CN11 como un alelo asociado al incremento en la dureza de la carne a los 14 días *post-mortem*, lo que evidencia una baja concordancia en los estudios de asociación en poblaciones no relacionadas de bovinos.

Cabe destacar que el análisis *in silico* de los polimorfismos CS11 y CS14 presentes en el gen de la CAST bovina lograron producir una modificación de la estructura superficial en dos de los cuatro dominios inhibidores de la proteína CAST bovina y debido a que la inhibición que media CAST es producida netamente por superficies de contacto, estos dos SNPs deben ser considerados como importantes en estudios de asociación fenotipo-genotipo de calidad cárnica. En contraste con lo anterior, aunque el polimorfismo CS2 ha sido considerado como importante por modificar parámetros moleculares *in silico* (hidrofobicidad) de la proteína CAST bovina y fenotípicos (terneza) por Barendse *et al.* (2007), en el presente trabajo este polimorfismo (CS2) no logró modificar ninguno de los parámetros evaluados *in silico*.

Otro polimorfismo analizado en este trabajo que debe ser destacado como de gran importancia es CS1, dado que es el único que logra producir una modificación del valor de PI de la proteína CAST bovina. El valor de PI de las proteínas es de gran im-

portancia en parámetros de calidad cárnica, dado que el pH del microambiente celular de la carne dictamina la actividad inhibitoria de enzimas como CAPN1 y CAST y estas enzimas poseen activación y actividad moduladas por el pH del microambiente celular en el músculo-carne durante el proceso de maduración *post-mortem*.

Finalmente, es importante resaltar que no se debe desconocer la existencia de relaciones epistáticas entre algunos marcadores de los genes CAPN1 y CAST, la presencia de fenotipos asociados a haplotipos (Allais *et al.* 2011; Barendse *et al.* 2007) así como los polimorfismos propios de CAPNS que posiblemente modifican aún más esta actividad enzimática (Iwanowska *et al.* 2011). Así mismo, también se debe tener en cuenta la complejidad del gen de la CAST bovina, el cual presenta tres variantes (I, II y III) según su región 5'UTR, lo que ocasiona una expresión diferencial en los músculos bovinos y las tres terminaciones diferentes de la región 3'UTR de la variante III (Raynaud *et al.* 2005). Todo lo anterior deja al descubierto la existencia de mecanismos específicos de control y de variación de la expresión génica según el tipo de tejido y la especie animal evaluada (Parr *et al.* 2004), la dependencia del Ca²⁺ para la actividad de la proteína y el dinámico microambiente intracelular existente (Huff-Lonergan y Lonergan, 2005), entre otros factores. De esta forma, se destaca la importancia de continuar realizando estudios que permitan comprender las múltiples variaciones fenotípicas observadas como resultado de la existencia de polimorfismos y la variabilidad de los genes CAPN y CAST que hacen parte de este complejidad sistema proteolítico.

CONCLUSIONES

El análisis *in silico* de las secuencias evaluadas permitió determinar el efecto de los poli-

morfismos del gen de la CAPN y CAST bovina sobre la estabilidad o estructura del ARNm (CN2, CN5, CN12 CN11, CS28, CS9, CS12, CS13, CS22, CS23 y CS26), sobre la estructura superficial de la proteína (CS11, CS14) y sobre el parámetro PI de la proteína CAST (CS1). Se destaca que el polimorfismo CS16 analizado en el presente estudio es el único al que se le pudo demostrar un sustento biológico *in silico* que concuerda con un fenotípico previamente reportado. Se postula que el no haber encontrado un soporte *in silico* para los efectos fenotípicos previamente reportados para CAPN316 y CAPN530 pudo ser ocasionado por el número limitado de parámetros que pudieron ser evaluados en el presente análisis *in silico*, por lo que es necesario considerar estudios que involucren otro tipo de parámetros tanto computacionales como *in vitro* e *in vivo* que pueden ser inducidos por la presencia de estos polimorfismos dada la complejidad genética y fisiológica de este sistema proteolítico. Adicionalmente, es necesario destacar que estas postulaciones obedecen a resultados computacionales que deben ser probados *in-vitro* y obligatoriamente *in-vivo*.

REFERENCIAS

- Allais S, Journaux L, Levéziel H, Payet N, Raynaud P, Hocquette J, Lepetit J, Rousset S, Denoyelle C, Bernard C, Renand G. 2011. Effects of polymorphisms in the calpastatin and μ -calpain genes on meat tenderness in 3 French beef breeds. *J Anim Sci.* 89:1-11.
- Andrade E. 2011. La dualidad análogo digital de la información se ejemplifica en el estudio de las moléculas de RNA. *Acta Biol Colomb.* 16(3):15-42.
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. 2006. The Swiss-Model workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics.* 22(2):195-201.
- Barendse W, Harrison B, Hawken R, Ferguson D, Thompson J, Thomas M, Bunch R. 2007. Epistasis between Calpain 1 and its inhibitor Calpastatin within breeds of cattle. *Genetics/Society.* 176:2601-2610.
- Bee G, Anderson A, Lonergan S, Huff-Lonergan E. 2007. Rate and extent of pH decline and proteolysis of cytoskeletal proteins and water-holding capacity in pork. *Meat Sci.* 76:359-365.
- Bergh M, Erbjaerg P, Therkildsen M. 2008. In vitro study to evaluate the degradation of bovine muscle proteins *post-mortem* by proteasome and μ -calpain. *Meat Sci.* 79:77-85.
- Boehm M, Kendall T, Thompson V, Goll D. 1998. Changes in the calpains and calpastatin during postmortem storage of bovine muscle. *J Anim Sci.* 76:2415-2434.
- Café L, McIntyre B, Robinson D, Geesink G, Barendse W, Greenwood P. 2010a. Production and processing studies on calpain-system gene markers for tenderness in Brahman cattle: 1. Growth, efficiency, temperament, and carcass characteristics. *J Anim Sci.* 88:3047-3058.
- Café L, McIntyre B, Robinson D, Geesink G, Barendse W, Pethick D, Thompson J, Greenwood P. 2010b. Production and processing studies on calpain-system gene markers for tenderness in Brahman cattle: 2. Objective meat quality. *J Anim Sci.* 88:3059-3069.
- Campo M, Santolaria P, Sañudo C, Lepetit J, Olleta J, Panea B, Albertí P. 2000. Assessment of breed type and ageing time effects on beef meat quality using two different texture devices. *Meat Sci.* 55:371-378.
- Casas E, White S, Wheeler T, Shackelford S, Koohmaraie M, Riley D, Chase C, Johnson D, Smith T. 2006. Effects of calpastatin and μ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *J Anim Sci.* 84:520-525.
- Chambaz A, Scheeder M, Kreuzer M, Dufey P. 2003. Meat quality of Angus, Simmental, Charolais and Limousin steers compared at the same intramuscular fat content. *Meat Sci.* 63:491-500.
- Chung H, Davis M. 2011. Effects of calpain genotypes on meat tenderness and carcass traits of Angus bulls. *Mol Biol Rep.* 38:4575-4581.
- Ciobanu D, Bastiaansen J, Lonergan S, Thomsen H, Dekkers J, Plastow G, Rothschild M. 2004. New alleles in calpastatin gene are associated with meat quality traits in pigs. *J Anim Sci.* 82:2829-2839.

- Costello S, O'Doherty E, Troy D, Ernst C, Kim K, Stapleton P, Sweeney T, Mullen A. 2007. Association of polymorphisms in the calpain I, calpain II and growth hormone genes with tenderness in bovine *M. longissimus dorsi*. *Meat Sci.* 75:551-557.
- Curi R, Chardulo J, Giusti J, Silveira A, Martins C, de Oliveira H. 2010. Assessment of GH1, CAPN1 and CAST polymorphisms as markers of carcass and meat traits in Bos indicus and Bos taurus-Bos indicus cross beef cattle. *Meat Sci.* 86:915-920.
- Duan J, Wainwright M, Comerón J, Saitou N, Sanders A, Gelernter J, Gejman P. 2003. Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Hum Mol Genet.* 12(3):205-216.
- Geesink G, Kuchay S, Chishti A, Koohmariae M. 2006. μ -Calpain is essential for postmortem proteolysis of muscle proteins. *J Anim Sci.* 84:2834-2840.
- Geesink G, Taylor R, Koohmariae M. 2005. Calpain 3/p94 is not involved in postmortem proteolysis. *J Anim Sci.* 83:1646-1652.
- Gil M, Hortós M, Sárraga C. 1998. Calpain and cathepsin activities, and protein extractability during ageing of longissimus porcine muscle from normal and PSE meat. *Food Chem.* 63:385-390.
- Guex N, Peitsch M. 1997. Swiss-Model and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis.* 18:2714-2723.
- Halvorsen M, Martin J, Broadaway S, Laederach A. 2010. Disease-associated mutations that alter the RNA structural ensemble. *PLoS Genet.* 6(8).
- Hanna R, Garcia B, Davies P. 2007. Calpastatin simultaneously binds four calpains with different kinetic constants. *FEBS Letters.* 581:2894-2898.
- Hanna R, Campbell R, Davies P. 2008. Calcium-bound structure of calpain and its mechanism of inhibition by calpastatin. *Nature.* 456.
- Hoggart C, Whittaker J, De Iorio M, Balding D. 2008. Simultaneous Analysis of All SNPs in Genome-Wide and Re-Sequencing Association Studies. *PLoS Genet.* 4(7).
- Huff-Lonergan H, Lonergan S. 2005. Mechanisms of water-holding capacity of meat, The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Sci.* 71:194-204.
- Iwanowska A, Grzes B, Mikolajczak B, Iwanska E, Juszczuk E, Rosochacki S, Pospiech E. 2011. Impact of polymorphism of the regulatory subunit of the μ -calpain (CAPN1S) on the proteolysis process and meat tenderness of young cattle. *Mol Biol Rep.* 38:1295-1300.
- Johnson A, Trumbower H, Sadee W. 2011. RNA structures affected by single nucleotide polymorphisms in transcribed regions of the human genome. *Bioinformatics.* 2(2).
- Kapprell H, Darrel E. 1989. Effect of Ca^{2+} on Binding of the Calpains to Calpastatin. *J Biol Chem.* 264:17888-17896.
- Klaff P, Riesner D, Steger G. 1996. RNA structure and the regulation of gene expression. *Plant Mol Biol.* 32:89-106.
- Koohmariae M, Geesink G. 2006. Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat Sci.* 74:34-43.
- Kristensen L, Christensen M, Ertbjerg P. 2006. Activities of calpastatin, μ -calpain and m-calpain are stable during frozen storage of meat. *Meat Sci.* 72:116-120.
- Lametsch R, Roepstor P, Møller H, Bendixen E. 2004. Identification of myofibrillar substrates for μ -calpain. *Meat Sci.* 68:515-521.
- Leal J, Jiménez L. 2013. Aproximación a la estructura tridimensional de la desmina bovina y determinación del efecto de mutaciones puntuales *in-silico*. *Rev Med Vet Zoot.* 60(III):157-168.
- Leal J, Jiménez L. 2014. Análisis *in-silico* de mutaciones puntuales en el gen PRKAG3 bovino asociadas a calidad cárnea. *Arch Zootec.* 63(241):121-132.
- Mansoori M, Golalipour M, Alizadeh S, Jahangirrad A, Khanduzi S, Shahbazi M. 2012. RS28381943 SNP of ABCB1 gene may be the reason of mRNA stabilization which may lead to gene overexpression. 2012 International Conference on Bioinformatics and Computational Biology (ICBCB 2012). IPCSIT, 34.
- Marchler, Bryant. 2004. CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res.* 32:327-331.
- Moldoveanu T, Gehring K, Green D. 2008. Concerted multi-pronged attack by Calpastatin specifically occludes the catalytic cleft of heterodimeric Calpains. *Nature.* 456(7220):404-408.
- Monsón F, Sañudo C, Sierra I. 2004. Influence of cattle breed and ageing time on textural meat quality. *Meat Sci.* 68:595-602.
- Monsón F, Sañudo C, Sierra I. 2005. Influence of breed and ageing time on the sensory meat quality and consumer acceptability in intensively reared beef. *Meat Sci.* 71:471-479.
- Motter M, Corva P, Krause M, Pérez M, Soria L. 2009. Rol de la Calpastatina en la variabilidad

- de la Terneza de la Carne Bovina. *J Basic Appl Genet.* 20(1):15-24.
- Ouali A, Herrera C, Coulis G, Becila S, Boudjellal A, Aubry L, Sentandreu M. 2006. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Sci.* 74:44-58.
- Page B, Casas E, Heaton M, Cullen N, Hyndman D, Morris C, Crawford A, Wheeler T, Koohmaraie M, Keele J, Smith T. 2002. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. *J Anim Sci.* 80:3077-3085.
- Papaleo J, Melucci L, Villarreal E, Mezzadra C, Soria L, Corva P, Motter M, Schor A, Miquel M. 2010. Effect of ageing and μ -calpain markers on meat quality from Brangus steers finished on pasture. *Meat Sci.* 86:878-882.
- Parmley J, Hurst L. 2007. How do synonymous mutations affect fitness? *BioEssays*, 29:515-519.
- Parr T, Jewell K, Sensky P, Brameld J, Bardsley R, Butterly P. 2004. Expression of calpastatin isoforms in muscle and functionality of multiple calpastatin promoters. *Arch Biochem Biophys.* 427:8-15.
- Pinto L, Ferraz J, Meirelles F, Eler J, Rezende F, Carvalho M, Almeida H, Silva R. 2010. Association of SNPs on CAPN1 and CAST genes with tenderness in Nellore cattle. *Gen Mol Res.* 9(3):1431-1442.
- Pomponio L, Lametsch R, Karlsson A, Costa L, Grossi A, Ertbjerg P. 2008. Evidence for *post-mortem* m-calpain autolysis in porcine muscle. *Meat Sci.* 80:761-764.
- Raynaud P, Gillard M, Parr T, Bardsley R, Amarger V, Levéziel H. 2005. Correlation between bovine calpastatin mRNA transcripts and protein isoforms. *Arch Biochem Biophys.* 440:46-53.
- Roy A, Kucukural A, Zhang Y. 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc.* 5(4):725-738.
- Sañudo C, Macie E, Olleta J, Villaruel M, Panea B, Alberí P. 2004. The effects of slaughter weight, breed type and ageing time on beef meat quality using two different texture devices. *Meat Sci.* 66:925-932.
- Shen L, Basilion J, Stanton V. 1999. Single-nucleotide polymorphisms can cause different structural folds of mRNA. *PNAS.* 96:7871-7876.
- Silva J, Patarata L, Martins C. 1999. Influence of ultimate pH on bovine meat tenderness during ageing. *Meat Sci.* 52:453-459.
- Straadt I, Rasmussen M, Andersen H, Bertram H. 2007. Aging-induced changes in microstructure and water distribution in fresh and cooked pork in relation to water-holding capacity and cooking loss-A combined confocal laser scanning microscopy (CLSM) and low-field nuclear magnetic resonance relaxation study. *Meat Sci.* 75:687-695.
- Strydom P, Naude R, Smith M, Scholtz M, Van Wyk J. 2000. Characterisation of indigenous African cattle breeds in relation to meat quality traits. *Meat Sci.* 55:79-88.
- Todd B, Moore D, Deivanayagam C, Lin G, Chatterjee D, Maki M, Wang K, Narayana S. 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.* 328:131-146.
- Xiang Z. 2006. Advances in homology protein structure modeling. *Curr Protein Pept Sci.* 7(3):217-227.
- Zhang Y. 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9.
- Zuker M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31(133):3406-3415.

Article citation:

Leal-Gutiérrez JD, Jiménez-Robayo LM. 2015. Análisis computacional del efecto de polimorfismos de genes del sistema μ -calpaína/calpastatina sobre la calidad de la carne bovina [Computational analysis of polymorphisms in genes of the μ -calpain/calpastatin system in bovine meat quality]. *Rev Med Vet Zoot.* 62(1):50-66.
<http://dx.doi.org/10.15446/rfmvz.v62n1.49385>