UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ADALFREDO ROCHA LOBO JÚNIOR

Melanina na pele e metabólitos da vitamina D₃ no plasma associados com polimorfismos nos genes *MC1R* (loco *Extension*) e *DBP* influenciam maciez e cor de carne de bovinos Nelore sem efeito sobre cálcio plasmático e muscular

Pirassununga

2013

ADALFREDO ROCHA LOBO JÚNIOR

Melanina na pele e metabólitos da vitamina D₃ no plasma associados com polimorfismos nos genes *MC1R* (loco *Extension*) e *DBP* influenciam maciez e cor de carne de bovinos Nelore sem efeito sobre cálcio plasmático e muscular

VERSÃO CORRIGIDA

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Zootecnia.

Área de Concentração: **Qualidade e Produtividade Animal**

Orientador: **Prof. Dr. Júlio Cesar de Carvalho Balieiro**

Pirassununga

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

L799m

Lobo Júnior, Adalfredo Rocha

Melanina na pele e metabólitos da vitamina D₃ no plasma associados com polimorfismos nos genes *MC1R* (*loco Extension*) e *DBP* influenciam maciez e cor de carne de bovinos Nelore sem efeito sobre cálcio plasmático e muscular / Adalfredo Rocha Lobo Júnior. -- Pirassununga, 2013.

104 f.

Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo. Departamento de Ciências Básicas.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.

Orientador: Prof. Dr. Júlio Cesar de Carvalho Balieiro.

1. CAST 2. Força de cisalhamento 3. Proteólise miofibrilar 4. Qualidade de carne 5. Radiação ultravioleta 6. SNP. I. Título.

Dedico

À DEUS

e

À minha esposa, Alessandra Aparecida Silva, por estar do meu lado nos momentos bons e ruins da minha vida

Aos meus preciosos filhos, Maria Eduarda e Victor Hugo, por serem minha inspiração

Aos meus pais, Adalfredo Rocha Lobo e Maria Elise da Silva Lobo, pelo amor incondicional

À minha irmã, Carol da Silva Lobo, pela amizade e companheirismo

À minha tia, Eunice Rocha Lobo, pelo coração bondoso e generoso

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, meu ponto de apoio, que sempre me levantou nos momentos de fraqueza, rendição, medo e desânimo. Somente **Ele** sabe das batalhas que enfrentei para concluir este trabalho.

À **Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA)**, pertencente à **Universidade de São Paulo (USP)**, pela oportunidade concedida de obter um Título de Doutor em uma das universidades mais renomadas do Brasil.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, por financiar este trabalho e conceder minha bolsa de estudo durante o Doutorado.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Júlio Cesar de Carvalho Balieiro**, pelos seus ensinamentos, orientações, amizade e descontração na hora do cafezinho, momento o qual eu mais aprendia com ele. Em todos os momentos, um grande incentivador!

Ao **Prof. Dr. Joanir Pereira Eler**, uma pessoa simples e humilde, que acreditou e confiou no meu trabalho, intermediando minha bolsa de estudo, mesmo me conhecendo pouco.

Ao **Prof. Dr. Saulo da Luz e Silva**, por permitir a coleta de amostras de seus animais para a realização deste experimento.

Ao **Prof. Dr. Heidge Fukumasu**, por ajudar com a parte do sequenciamento de DNA e determinação dos genótipos dos animais usando a tecnologia de PCR em Tempo Real. Ao **Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles**, por autorizar a realização das análises de Biologia Molecular no seu laboratório.

Ao **Prof. Dr. Eduardo Francisquine Delgado**, pelas diversas ajudas e explicações concedidas à distância por telefone nas horas de dúvida durante as análises laboratoriais, além de sua amizade. Às suas alunas, **Daiane** e **Patrícia**, pela ajuda na análise de Índice de Fragmentação Miofibrilar e nos testes para a análise de calpastatina.

À **Prof^a. Dr^a. Mariza Pires de Melo** e à técnica **Silvana Marina Piccoli Pugine**, por permitirem e ensinarem a usar os equipamentos de seu laboratório para a realização da análise de melanina.

Ao **Prof. Dr. José Bento Stermann Ferraz**, ao **Prof. Dr. César Gonçalves de Lima**, à **Prof^a. Dr^a. Rachel Santos Bueno** e à técnica **Elisângela Chicaroni de Mattos Oliveira**, pelas conversas e apoio nos corredores.

Às e aos colegas de trabalho, **Mirele, Vanessa, Cristina, Bárbara, Fábio, Davi, Valéria, Marina, Priscila, Fernanda, Jane, Gerson, Miguel, Victor (Preto), Diego (Cucco), Mário (Santana), Roulber, Fernando (Manicardi), Minos, Isabela e Pâmela**, pela convivência e paciência durante esses anos.

Às **zeladoras** do GMAB, em especial à **Vera (Tico)**, pelos cafezinhos e brincadeiras. Ah, e por sempre manterem o ambiente limpo e cheiroso.

Espero não ter esquecido ninguém. Mas, se isto aconteceu, segue aqui o meu agradecimento pela **Sua** participação e colaboração na realização deste trabalho.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Adalfredo Rocha Lobo Júnior, filho de Adalfredo Rocha Lobo e Maria Elice da Silva Lobo, nasceu em Apucarana (PR) no dia 16 de Junho de 1982. Ao longo de sua juventude, a afinidade com a disciplina de Biologia no Ensino Médio e o interesse em lidar com animais lhe encorajou a cursar Graduação em Zootecnia, pela Universidade Estadual de Maringá (UEM, Maringá – PR). O curso iniciou-se em Março de 2001 e seu título de Zootecnista foi obtido em Fevereiro de 2006.

Naquele mesmo mês e ano, ingressou no Mestrado em Agronomia, no Programa de Ciência Animal e Pastagens, em uma das melhores instituições da América Latina, conhecida como Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz” (ESALQ/USP, Piracicaba – SP). Desenvolveu seu curso sob a orientação do Prof. Dr. Eduardo Francisquine Delgado, trabalhando com Fisiologia Animal e Qualidade de Carne. Em Outubro de 2008, foi aprovado pela Comissão Julgadora na Defesa de Dissertação, intitulada em “Suplementação de vitamina D₃ na dieta e exposição à luz solar alteram cor e fragmentação miofibrilar de carne de *Bos indicus* sem causar impacto no desempenho e maciez”.

Em Janeiro de 2009, ingressou no Doutorado em Zootecnia, no Programa de Qualidade e Produtividade Animal, na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP, Pirassununga – SP). Daquele tempo até o presente, desenvolveu seu curso sob a orientação do Prof. Dr. Júlio Cesar de Carvalho Balieiro, trabalhando com Biologia Molecular e Qualidade de Carne. Durante o Doutorado, não se limitou somente a aprender sobre Biologia Molecular, em que estava inserido seu projeto de pesquisa. Preocupou-se também em aprender sobre outra linha de pesquisa na área de Melhoramento Genético Animal, a Genética Quantitativa. Teve um grande aprendizado na área de Estatística, com boas noções na modelagem de dados usando modelos mistos. Durante esses anos, também participou por três vezes do estágio PAE nas disciplinas “Probabilidade e Estatística”, “Estatística II” e “Melhoramento Genético Animal” e cursou disciplinas na FZEA e ESALQ, totalizando 56 dos 30 créditos requeridos. No dia 08 de Março de 2013, submete-se a avaliação da Comissão Julgadora para a Defesa de Tese, a qual foi projetada a partir dos resultados obtidos no trabalho realizado no Mestrado.

Parábola dos dois filhos

“Que vos parece? Um homem tinha dois filhos.

Dirigindo-se ao primeiro, disse-lhe: ‘Meu filho, vai trabalhar hoje na vinha.’

Respondeu ele: ‘Não quero.’ Mas, em seguida, tocado de arrependimento, foi.

Dirigindo-se depois ao outro, disse-lhe a mesma coisa. O filho respondeu: ‘Sim, pai!’ Mas não foi.

Qual dos dois fez a vontade do pai?” – “O primeiro”, responderam-lhe.

E Jesus disse-lhes: “Em verdade vos digo: os publicanos e as meretrizes vos precedem no Reino de Deus!

João veio a vós no caminho da justiça e não crestes nele. Os publicanos, porém, e as prostitutas creram nele.

E vós, vendo isto, nem fostes tocados de arrependimento para crerdes nele.”

Mateus 21, 28-32

RESUMO

LOBO-JR., A. R. **Melanina na pele e metabólitos da vitamina D₃ no plasma associados com polimorfismos nos genes *MC1R* (loco *Extension*) e *DBP* influenciam maciez e cor de carne de bovinos Nelore sem efeito sobre cálcio plasmático e muscular.** 2013. 104 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

Amaciamento natural devido proteólise miofibrilar pelas enzimas calpaínas (cálcio-dependentes) e descoloração devido oxidação do pigmento mioglobina podem ocorrer em carne maturada. Em bovinos, o tipo biológico *Bos indicus* apresenta maior atividade de calpastatina (*CAST*, inibidora das calpaínas) no músculo e concentração de melanina (modulador de vitamina D₃) na pele do que *Bos taurus*. Maior concentração de melanina na pele reduz fotossíntese de vitamina D₃ e, subsequentemente, poderia reduzir as concentrações de seus metabólitos 25-hidróxi-vitamina D₃ (25-D) e 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ (1,25-D; modulador de cálcio) no plasma de *Bos indicus*. Nos casos de maiores concentrações de 1,25-D plasmático, uma melhor absorção de cálcio da dieta com aumento de suas concentrações no plasma e músculo poderia resultar em atividade melhorada das calpaínas. Além disso, maiores concentrações de 1,25-D plasmático poderiam colaborar para minimizar oxidação de carne devido sua propriedade antioxidante. Então, além da maior atividade de *CAST* no músculo, os *Bos indicus* poderiam ter mais duas desvantagens para produzir carne mais macia e menos oxidada: concentrações maiores de melanina na pele e menores de 1,25-D no plasma. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi estudar as relações entre as concentrações de melanina total (MEL_T) e suas frações [faeumelanina (FAE) e eumelanina (EUM)] na pele, metabólitos da vitamina D₃ (25-D e 1,25-D) no plasma, cálcio plasmático e muscular e maciez [Índice de Fragmentação Miofibrilar (MFI) e força de cisalhamento (FC)] e cor (valores de *L*^{*}, *a*^{*} e *b*^{*}) em carne maturada (1, 7 e 14 dias) e suas associações com polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) nos genes candidatos receptor da melanocortina-1 [*MC1R*; rs109688013 (C/T) e rs110710422 (G/-)], proteína ligante à vitamina D₃ [*DBP*; rs136359868 (T/C) e rs135330728 (T/C)] e *CAST* [rs109384915 (T/C)]. Bovinos Nelore (n=86), abatidos com 516 ± 39 kg aos 24 ± 1 meses, foram usados para determinação dos genótipos e mensuração das características. Na pele, a fração EUM foi

positivamente correlacionada com MEL_T, mais do que a fração FAE. As frações de melanina na pele foram correlacionadas negativamente. A fração FAE foi correlacionada negativamente com 1,25-D plasmático, mas não foi correlacionada com 25-D plasmático. Melanina e suas frações na pele e metabólitos da vitamina D₃ no plasma não foram correlacionadas com cálcio plasmático e muscular. Todavia, cálcio no plasma e músculo foram correlacionados positivamente com MFI e valores de L^* e b^* e negativamente com FC e valores de a^* . A EUM e MEL_T na pele foram correlacionadas negativamente com FC e valores de a^* e b^* e positivamente com valores de L^* , enquanto que 25-D no plasma foi correlacionada positivamente com MFI e valores de a^* e b^* e negativamente com valores de L^* . A FAE foi correlacionada positivamente com MFI e negativamente com os valores de L^* , a^* e b^* . No gene *MC1R*, o alelo T do SNP rs109688013 apresentou-se fixado (100%) na população, enquanto que o alelo G e sua deleção (–) do SNP rs110710422 tiveram frequência de 97,7 e 2,3%, respectivamente. SNPs do gene *MC1R* resultaram nos genótipos do loco *Extension* ($E/E = T/T + G/G$ e $E/e = T/T + G/-$), que foi associado com 1,25-D plasmático e valores de b^* no dia 1. No gene *DBP*, o alelo C do SNP rs136359868 foi menos frequente (3,5%) do que o alelo T, enquanto que os alelos C e T do SNP rs135330728 tiveram uma frequência de 73,8 e 26,2%, respectivamente. SNPs do gene *DBP* foram associados com MEL_T na pele e valores de L^* e a^* em diferentes dias. No gene *CAST*, os alelos C e T do SNP rs109384915 tiveram a mesma frequência. O SNP rs109384915 foi associado com MFI ao dia 7 e a substituição do alelo T por C reduziu os valores de MFI e a^* no dia 7 e os valores de b^* no dia 1. Ao final, maiores concentrações de FAE na pele e 25-D no plasma melhoraram proteólise miofibrilar e cor de carne, enquanto as maiores concentrações de EUM e MEL_T na pele resultaram em uma carne mais macia com uma pior cor. Associações do loco *Extension* e dos SNPs no gene *DBP* com cor de carne parecem consequência das diferenças em 1,25-D no plasma e melanina na pele. SNP do *CAST* associou-se com proteólise miofibrilar e cor de carne maturada, mas não com FC.

Palavras-chave: *CAST*, força de cisalhamento, proteólise miofibrilar, qualidade de carne, radiação ultravioleta, SNP

ABSTRACT

LOBO-JR., A. R. **Skin melanin and plasma vitamin D₃ metabolites associated with polymorphisms in the *MC1R* (*Extension* locus) and *DBP* genes influence meat tenderness and color of the Nellore cattle without effect on plasma and muscle calcium.** 2013. 104 f. Ph.D. Thesis – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

Natural tenderization by myofibrillar proteolysis through the calpains enzymes (calcium-dependent) and discoloration by oxidation of myoglobin pigment may occur in aged meat. In cattle, the *Bos indicus* biological type has higher calpastatin activity (*CAST*, inhibitor of calpains) in muscle and melanin concentration (modulator of vitamin D₃) in skin than *Bos taurus*. Higher melanin concentration in skin reduces photosynthesis of vitamin D₃ and, subsequently, could reduce the concentrations of its metabolites 25-hydroxy-vitamin D₃ (25-D) and 1,25-di-hydroxy-vitamin D₃ (1,25-D; modulator of calcium) in plasma from *Bos indicus* cattle. In cases of higher plasma 1,25-D concentrations, an improved absorption of calcium from the diet followed by increased plasma calcium concentrations could result in enhanced activity of calpains. Furthermore, higher plasma 1,25-D concentrations could collaborate to minimize meat oxidation due to its antioxidant propriety. Then, in addition to higher *CAST* activity in muscle, the *Bos indicus* cattle could have two more disadvantages to produce tender and less oxidized meat: higher melanin concentrations in skin and lower 1,25-D concentrations in plasma. Hence, the objective of this work was to study the relationships between the concentrations of total melanin (MEL_T) and its fractions [pheomelanin (PHEO) and eumelanin (EUM)] in skin, vitamin D₃ metabolites (25-D and 1,25-D) in plasma, plasma and muscle calcium, and tenderness [Myofibrillar Fragmentation Index (MFI) and shear force (SF)] and color (*L*^{*}, *a*^{*}, and *b*^{*} values) in aged meat (1, 7, and 14 days) and their associations with single nucleotide polymorphisms (SNPs) in candidate genes as melanocortin-1 receptor [*MC1R*; rs109688013 (C/T) and rs110710422 (G/-)], vitamin D₃-binding protein [*DBP*; rs136359868 (T/C) and rs135330728 (T/C)], and *CAST* [rs109384915 (T/C)]. Nellore cattle (n=86), slaughtered with 516 ± 39 kg at 24 ± 1 months, were used for genotyping and traits measurements. In skin, the EUM fraction was positively correlated with MEL_T than the PHEO fraction. The melanin fractions in skin were negatively correlated. The

PHEO fraction was negatively correlated with plasma 1,25-D, but not with plasma 25-D. Melanin and its fractions in skin and vitamin D₃ metabolites in plasma were not correlated with plasma and muscle calcium. Nevertheless, plasma and muscle calcium were positively correlated with MFI, and L^* and b^* values and negatively correlated with SF and a^* values. The EUM and MEL_T in skin were negatively correlated with SF, and a^* and b^* values and positively correlated with L^* values, while 25-D in plasma was positively correlated with MFI, and a^* and b^* values and negatively correlated with L^* values. The PHEO was positively correlated with MFI and negatively correlated with L^* , a^* , and b^* values. In *MC1R* gene, the rs109688013 SNP allele T was fixed (100%) in the population, while the rs110710422 SNP allele G and its deletion (-) had a frequency of 97.7 and 2.3%, respectively. *MC1R* SNPs resulted in genotypes of the *Extension* locus ($E/E = T/T + G/G$ and $E/e = T/T + G/-$), which was associated with plasma 1,25-D and b^* values at the day 1. In *DBP* gene, the rs136359868 SNP allele C was less frequent (3.5%) than allele T, while rs135330728 SNP alleles C and T had a frequency of 73.8 and 26.2%, respectively. *DBP* SNPs were associated with MEL_T in skin, and L^* and a^* values at different days. In *CAST* gene, the rs109384915 SNP alleles C and T had a similar frequency. The rs109384915 SNP was associated with MFI at the day 7 and the substitution from allele T to C reduced the MFI and a^* values at the day 7 and the b^* values at the day 1. At last, higher skin PHEO and plasma 25-D concentrations improved the myofibrillar proteolysis and meat color, while higher skin EUM and MEL_T concentrations resulted in a meat with improved tenderness and worsened color. Associations of the *Extension* locus and polymorphisms in *DBP* gene with the meat color seem to be a consequence of the differences in plasma 1,25-D and skin melanin. *CAST* SNP is associated with myofibrillar proteolysis and meat color, but not with SF.

Keywords: *CAST*, meat quality, myofibrillar proteolysis, shear force, ultraviolet radiation, SNP

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1. Aspectos gerais relacionados com maciez de carne	14
2.2. Aspectos gerais relacionados com cor de carne	15
2.3. Melanina	16
2.3.1. Fatores que regulam melanina na pele	16
2.3.2. Gene <i>MC1R</i>	19
2.4. Vitamina D ₃ e seus metabólitos	21
2.4.1. Fatores que regulam vitamina D ₃ e seus metabólitos no organismo	21
2.4.2. Gene <i>DBP</i>	24
2.5. Calpastatina.....	25
2.5.1. Fatores que regulam calpastatina no músculo	25
2.5.2. Gene <i>CAST</i>	27
3. HIPÓTESES	29
4. TESTE DAS HIPÓTESES	29
5. OBJETIVO	30
6. MELANINA NA PELE E 25-HIDRÓXI-VITAMINA D₃ NO PLASMA INFLUENCIAM MACIEZ E COR DE CARNE EM BOVINOS NELORE.....	31
Resumo	31
Abstract	32
6.1. Introdução.....	33
6.2. Material e Métodos	34
6.3. Resultados e Discussão	40
6.4. Conclusão.....	61
7. ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES <i>MC1R</i> (LOCO <i>EXTENSION</i>), <i>DPB</i> E <i>CAST</i> COM MELANINA NA PELE, 1,25-DI-HIDRÓXI-VITAMINA D₃ PLASMÁTICO E MACIEZ E COR DE CARNE EM BOVINOS NELORE.....	62
Resumo	62
Abstract	63
7.1. Introdução.....	64
7.2. Material e Métodos	65
7.3. Resultados e Discussão	73
7.4. Conclusão.....	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

1. INTRODUÇÃO

Dentre as características de qualidade de carne, maciez e cor são consideradas as mais importantes pelos consumidores (MORGAN et al., 1991a; ROBBINS et al., 2003a). O amaciamento natural de carne ao longo do tempo de maturação é dado pela proteólise miofibrilar devido à ação das enzimas calpaínas (KOOHMARAIE, 1992, 1994), enquanto que a coloração de carne é um reflexo do estado oxidativo do pigmento mioglobina (LI; LIU, 2012).

Carne de bovinos *Bos indicus* são menos macias do que carne de bovinos *Bos taurus*, devido à maior atividade de calpastatina (inibidora das calpaínas) no músculo daqueles animais tanto após o abate, quanto após o *rigor-mortis* (SHACKELFORD et al., 1991, 1994; WHEELER et al., 1990, 1994; WHIPPLE et al., 1990). Um outro fator limitante para o amaciamento da carne de bovinos *Bos indicus* poderia estar relacionado às maiores concentrações de melanina na pele (AMAKIRI, 1979; HAFEZ et al., 1955; SILVA et al., 2001; YANG, 1952), uma vez que melanina poderia influenciar as concentrações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ plasmático (NORMAN, 1998).

Melanina em altas concentrações na pele causa maior absorção dos raios ultravioletas e menor conversão do composto 7-di-hidro-colesterol (sob a pele) em vitamina D₃ (ENGELMAN et al., 2008; HARRIS; DAWSON-HUGHES, 1998; SILVA et al., 2001). Menor fotossíntese de vitamina D₃ sob a pele de *Bos indicus* poderia resultar em menores concentrações dos seus metabólitos 25-hidróxi-vitamina D₃ e 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma (ENGELMAN et al., 2008; MONTGOMERY et al., 2004b). Nos casos em que as maiores concentrações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ plasmático são observadas, uma melhora na absorção de cálcio da dieta e aumento nas concentrações de cálcio plasmático e muscular também são notados (FERNANDEZ et al., 1990; LITTLEDIKE; GOFF, 1987).

Uma maior concentração de cálcio no plasma e músculo tornariam as calpaínas mais ativas (KOOHMARAIE, 1994). Maior atividade de calpaínas tem sido mais observada em bovinos *Bos taurus* do que *Bos indicus* (PRINGLE et al., 1997; WHEELER et al., 1990). Algum efeito poderia também ser verificado sobre a cor de carne, pois uma propriedade antioxidante tem sido atribuída à vitamina D₃ e seus metabólitos (HANSEN et al., 2012; LAHUCKY et al., 2007). Mudanças nas concentrações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ e cálcio no plasma e músculo já

influenciaram maciez e cor de carne em outros trabalhos (HANSEN et al., 2012; LAWRENCE et al., 2003; LOBO-JR. et al., 2012; MONTGOMERY et al., 2000).

Poder-se-ia considerar então, que os animais *Bos indicus* (com maior atividade de calpastatina, maiores concentrações de melanina e menores concentrações dos metabólitos da vitamina D₃) teriam menor potencial em relação à *Bos taurus* (com menor atividade de calpastatina, menores concentrações de melanina e maiores concentrações dos metabólitos da vitamina D₃) para produzir carne mais macia e menos oxidada durante a maturação. Neste aspecto, os marcadores moleculares de DNA poderiam auxiliar à identificação e seleção dos genótipos (ou combinações genotípicas) desejáveis para maciez e cor de carne.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos gerais relacionados com maciez de carne

Nos Estados Unidos, os consumidores são capazes de diferenciar níveis de maciez e desejariam pagar mais por carnes mais macias (BOLEMAN et al., 1997). Na tentativa de melhorar a maciez de carne, técnicas *post-mortem* como resfriamento retardado, manejo de câmara fria, suspensão pélvica, estimulação elétrica, maturação e aplicação de cloreto e propionato de cálcio têm sido usadas (CROUSE et al., 1987; HUFF; PARRISH, 1993; JEREMIAH et al., 1984; MORGAN et al., 1991b), mas não estão relacionadas com melhoras no potencial genético dos animais.

Nos programas de melhoramento genético animal, além da definição dos objetivos há também outro aspecto de importância, que seria a variabilidade da característica a ser melhorada. Quando a característica em questão é a maciez de carne, verifica-se a existência de uma grande variação (valores de força de cisalhamento de 2,37 kg a 12,50 kg) em diferentes raças bovinas (Angus, Tuli, Hereford, Belgian Blue, Boran e Brahman, n=767) (KOOHMARAIE, 1996).

Diferenças na maciez de carne entre animais *Bos indicus* e *Bos taurus* tem sido bem documentada e estabelecida (CROUSE et al., 1989; JOHNSON et al., 1990; RUBENSAM et al., 1998; SHACKELFORD et al., 1991, 1994; WHEELER et al., 1990, 1994; WHIPPLE et al., 1990). A limitação genética do *Bos indicus* é notória quando se trata de produzir carne mais macia de forma consistente. Como observado na revisão feita por Koohmaraie (1996), o valor médio de força de cisalhamento é de 5,1 kg para carne maturada por 7 dias de animais da raça Angus com 22% dos animais

apresentando carne acima de 6 kg. Entretanto, o autor relata valores de força de cisalhamento de 7,3 kg para carne maturada por 7 dias de animais da raça Brahman com 63% dos animais apresentando carne acima de 6 kg.

Embora todas as raças já tenham sido caracterizadas fenotipicamente no Brasil, a caracterização genética teve início mais recentemente com o uso de marcadores moleculares (MARIANTE; MCMANUS, 2004). Ganhos genéticos maiores para maciez de carne podem ocorrer por meio da Seleção Assistida por Marcadores (MAS), a qual permite uma seleção mais eficiente comparada à seleção tradicional, baseada apenas no fenótipo. As principais vantagens da estratégia de MAS é que ela não é afetada pelos efeitos do ambiente, não é limitada pelo sexo e não requer testes caros ou que requerem o abate do indivíduo (MARTINEZ et al., 2004).

2.2. Aspectos gerais relacionados com cor de carne

A cor de carne é um aspecto visual importante que influencia na aceitabilidade e na decisão de compra dos consumidores (MANCINI; HUNT, 2005; RISVIK, 1994). Os consumidores geralmente usam a cor como um indicador de frescor e a associam com sabor, maciez e segurança alimentar (CARPENTER et al., 2001; GIROLAMI et al., 2013; GLITSCH, 2000; ROBBINS et al., 2003a). Vários fatores tais como pH, composição de ácidos graxos, gordura intramuscular e subcutânea e teores de antioxidantes e de enzimas antioxidantes na carne podem afetar a estabilidade de cor (GARCIA et al., 2005; MERCIER et al., 2004; WOOD et al., 2008; WULF; WISE, 1999).

Devido suas propriedades antioxidantes, vitamina E, vitamina D₃ e seus metabólitos e selênio podem ser incorporados na dieta dos animais para estabilizar a oxidação da carne, melhorando capacidade de retenção de água e minimizando a descoloração (DESCALZO et al., 2005; HANSEN et al., 2012; LAHUCKY et al., 2007; ZHAN et al., 2007; YANG et al., 2002). De acordo com estudos mais específicos, antioxidantes incorporados naturalmente pela ingestão de dietas são mais eficientes para preservar a estabilidade oxidativa da carne do que os antioxidantes adicionados diretamente na carne (KERRY et al., 1998). Efeitos desfavoráveis sobre a cor da carne foram verificados quando sais de fosfato e cálcio foram adicionados na carne de animais após o abate (LAWRENCE et al., 2003, 2004; ROBBINS et al., 2003b).

As medidas objetivas mais usadas para se relacionar com cor visual de carne são os valores de L^* , a^* e b^* desenvolvidos pela *Commission Internationale de l'Eclairage* em 1976 (CIE, 1976). Valores de L^* refletem o brilho da carne [de mais

escuro (-100) a mais claro (+100)] e, por isso, são indicadores indiretos da capacidade de retenção de água da carne (JOO et al., 1995). Quanto mais água exsudada na superfície da carne, mais pálida é a carne e maior valor de L^* é obtido (LEDWARD et al., 1992; PAGE et al., 2001). Já, os valores de a^* [cor de verde (-60) a vermelha (+60)] e b^* [cor de azul (-60) a amarela (+60)] estão relacionados à coloração do pigmento mioglobina presente na carne (MANCINI; HUNT, 2005). Quanto maior o valor da razão entre aqueles valores (a^*/b^*), mais vermelha e menos descolorida (menos oxidada) é a carne (AMSA, 2012).

Diferenças na cor de carne de *Bos indicus* e *Bos taurus* foram relatadas anteriormente. Carnes de animais *Bos indicus* foram mais escuras e vermelhas ($L^* = 36,3$ e $a^* = 23,7$) do que carnes de animais *Bos taurus* ($L^* = 37,5$ e $a^* = 23,0$), mas nenhuma diferença foi detectada para a cor amarela (b^*) (11,1 vs 11,2, respectivamente) (WULF et al., 1997). Entretanto, outros trabalhos apresentaram diferenças maiores para cor de carne entre bovinos *Bos indicus* e *Bos taurus*. Os valores de L^* , a^* e b^* variaram respectivamente de 42,7 a 56,2; 30,5 a 38,4 e 22,8 a 32,1 nas carnes de 257 machos castrados *Bos taurus* com idade média de 15 meses (KING et al., 2011), enquanto variaram respectivamente de 33,4 a 44,7; 12,2 a 17,1 e 8,8 a 15,8 nas carnes de 40 machos castrados *Bos indicus* com idade média de 18 meses (RIBEIRO et al., 2012).

Embora os mecanismos responsáveis pela variação em estabilidade de cor sejam pouco conhecidos, King et al. (2010) demonstraram que parte desta variação poderia ser regulada geneticamente. Em geral, cor de carne não é levada em conta nos programas de melhoramento genético relacionados à qualidade de carne bovina, mas a maioria dos pesquisadores de carne têm medido as variáveis de cor e, em alguns estudos, associações com marcadores moleculares têm sido testadas (LI et al., 2013; MELUCCI et al., 2012; PINTO et al., 2011; REARDON et al., 2010; RIBECA et al., 2012).

2.3. Melanina

2.3.1. Fatores que regulam melanina na pele

Nos melanócitos, dois tipos de melanina são sintetizados: eumelanina e faeumelanina. A síntese de eumelanina, pigmento de cor tendendo ao preto, é

estimulada pela ligação do hormônio estimulante α -melanócito (α -MSH) ao receptor melanocortina-1 (*MC1R*) (HUNT et al., 1994; KLUNGLAND et al., 1995). Já, a síntese de feomelanina, pigmento de cor tendendo ao vermelho, é estimulada quando a proteína sinalizadora agouti (*ASIP*) antagoniza a ação de α -MSH (LU et al., 1994). Maior ação de α -MSH aumenta expressão da tirosinase (*TYR*), enzima que hidroxila tirosinas para sintetizar eumelanina (HUNT et al., 1994). Posteriormente a síntese, grânulos contendo melanina (melanossomos) são exportados dos melanócitos para os queratinócitos adjacentes, onde mais melaninas são encontradas (LIN; FISHER, 2007; SLOMINSKI et al., 2004).

A radiação ultravioleta vinda dos raios solares influencia de diferentes formas a síntese de melanina. Em humanos, a radiação ultravioleta induz o aumento no número de melanócitos e na expressão de *TYR* (ALALUF et al., 2003). Também, o aumento de queimadura de pele induzido por radiação ultravioleta potencializa a atividade de *TYR*, a síntese de melanina e o tamanho dos melanócitos (GILCHREST et al., 1993).

Por outro lado, diferenças nos padrões de pigmentação de pele em humanos poderiam advir das mutações causadas em genes devido à adaptação de etnias em uma determinada localização e intensidade de radiação ultravioleta (JABLONSKI; CHAPLIN, 2000). Pessoas de pele negra e origem africana apresentam mais eumelanina, maior atividade de *TYR*, maior tamanho de melanossomos e potencial reduzido do antagonista *ASIP* quando comparadas com pessoas de pele clara e origem europeia (ALALUF et al., 2002, 2003; BONILLA et al., 2005).

Em bovinos, a pigmentação de pele pode influenciar crescimento animal e características de carcaça (FINCH et al., 1984; HELGESON; SCHMUTZ, 2008; SUMIDA et al., 2004). Entretanto, poucos trabalhos têm mensurado o efeito de ambiente e/ou genes na regulação da pigmentação de pele nesta espécie (ADALSTEINSSON et al., 1995; GAN et al., 2007; GIRARDOT et al., 2005; KLUNGLAND et al., 1995; NICOLOSO et al., 2008; SASAZAKI et al., 2005; SCHMUTZ et al., 2004). De modo geral, bovinos *Bos indicus* tendem apresentar pele mais escura do que *Bos taurus*, devido às maiores concentrações de melanina (AMAKIRI, 1979; HAFEZ et al., 1955; SILVA et al., 2001; YANG, 1952).

Nos climas tropicais, a combinação pelame e pele negra são consideradas a ideal para proteção contra radiação ultravioleta. Entretanto, animais com estas características absorvem mais radiação ultravioleta e armazenam maior quantidade de

energia térmica, causando estresse calórico no animal (SILVA et al., 2001). Por isso, alguns pesquisadores têm sugerido a combinação pelame branco, com baixa absorção de radiação, e pele negra, que seria compatível com a combinação encontrada em *Bos indicus* e, dificilmente, compatível com a encontrada em *Bos taurus* (CENA; MONTEITH, 1975; FINCH; WESTERN, 1977; FINCH et al., 1984; HUTCHINSON; BROWN, 1969).

Mutações em genes que regulam melanina tiveram início possivelmente para evitar toxicidade de vitamina D₃ em regiões com altas taxas de radiação ultravioleta (JABLONSKI; CHAPLIN, 2000). Pessoas ou animais de pele escura concentram-se em regiões com altas taxas de radiação ultravioleta, enquanto que os de pele clara são observados em regiões de baixas a moderadas taxas (PARRA et al., 2004). Pelo fato de melanina absorver radiação ultravioleta reduzindo produção de vitamina D₃, peles de cores diferentes regulariam metabolismo de vitamina D₃ diferentemente. Prova disto tem sido que pessoas negras, com maiores concentrações de melanina, necessitam dez (10) vezes mais radiação ultravioleta para atingir a mesma concentração de 25-hidróxi-vitamina D₃ plasmática das pessoas brancas (HOLLIS, 2005).

Baseado em trabalhos com marcadores moleculares em humanos, ratos e bovinos, os genes candidatos *MC1R*, *ASIP* e *TYR* parecem ser os principais reguladores da pigmentação de pele. O gene *MC1R* e/ou *ASIP* e/ou *TYR* tem explicado variações na pigmentação de pele em humanos (BONILLA et al., 2005; HARDING et al., 2000; RANA et al., 1999; ZEIGLER-JOHNSON et al., 2004), ratos (SUZUKI et al., 1997) e bovinos (ADALSTEINSSON et al., 1995; KLUNGLAND et al., 1995; ROUZAUD et al., 2000; SCHMUTZ et al., 2004). Entretanto, falhas para explicar a variação na pigmentação de pele entre bovinos das raças Charolês, Limousine, Salers, Blonde d'Aquitaine, Monbéliarde, Gasconne, Normande e Prim'Holstein para o gene *ASIP* (GIRARDOT et al., 2005) e entre bovinos nativos da China para o gene *TYR* (GAN et al., 2007) têm sido verificadas.

Em ratos, o gene *ASIP* tem reduzido a expressão de *TYR* (VOISEY et al., 2003). Em humanos, o polimorfismo G>A no gene *ASIP* exibe efeito dominante levando à cor de pele mais clara (BONILLA et al., 2005; ZEIGLER-JOHNSON et al., 2004). Já, o gene *MC1R* tem sido sugerido ser o candidato ideal para explicar a variação na pigmentação de pele por apresentar associação com doenças em populações europeias e apresentar-se altamente polimórfico nas diferentes intensidades de seleção entre populações humanas (RANA et al., 1999; HARDING et al., 2001).

2.3.2. Gene *MC1R*

O gene candidato *MC1R* (AC_000175.1, *Bos_taurus_UMD_3.1*), parece ser o mais relevante para a regulação de melanina na pele. Está localizado no cromossomo 18 e tem 1.751 pares de base (pb) (14.757.332 – 14.759.082 pb) em somente um (1) éxon. É um gene considerado de tamanho pequeno, onde a região responsável por codificar 317 aminoácidos apresenta 954 pb (14.757.615 – 14.758.568 pb). O gene *MC1R* é conservado entre bovinos, humanos, chimpanzés, cães, camundongos, galinhas e peixes-zebra.

Na região do gene que codifica proteína, existem três (3) polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) que causam a troca de aminoácidos da proteína (conhecida como mutação *missense*, do tipo não-sinônimo), alterando sua funcionalidade. Além disso, há também uma (1) deleção e uma (1) inserção de nucleotídeo (conhecidos como *indel*) que podem antecipar ou retardar o aparecimento do códon de parada (*stop codon*), resultando em uma proteína com diferente tamanho e forma (conhecida como mutação *frameshift*, do tipo não-sinônimo) e sem funcionalidade (Figura 1).

Figura 1. Substituição (quadros de cor laranja), inserção e deleção (quadros de cor rosa) de nucleotídeos do tipo não-sinônimo na região codificadora de proteínas do gene receptor melanocortina-1 (*MC1R*) em bovinos. Fonte: site *Ensembl*.

A combinação dos nucleotídeos na posição 14.757.910 (T/C, RefSNP: rs109688013) e 14.757.924 (G/–, RefSNP: rs110710422) pb, no gene *MC1R* e na mesma fita de DNA, definem os alelos do loco *Extension* (Figura 2), o qual é o responsável pela maioria da variação em cor de pele bovina (OLSON, 1999). Quando os nucleotídeos C e G são encontrados, respectivamente, nas posições 14.757.910 e 14.757.924 pb, o alelo é identificado como E^D . Quando os nucleotídeos T e G são encontrados, respectivamente, nas posições 14.757.910 e 14.757.924 pb, o alelo é identificado como E . Já, quando o nucleotídeo T e a deleção do nucleotídeo G são encontrados, respectivamente, nas posições 14.757.910 e 14.757.924 pb, o alelo é identificado como e . A relação de dominância observada é: $E^D > E > e$ (OLSON, 1999).

				14.757.910 pb					14.757.924 pb				
				↓					↓				
Proteína	(E)	GCA	GTC	ATG	CTG	CTG	CTG	GAG	GCC	GGT	GTC	CTG	
	→	ALA	VAL	MET	LEU	LEU	LEU	GLU	ALA	GLI	VAL	LEU	
Proteína	(E^D)	GCA	GTC	ATG	CCG	CTG	CTG	GAG	GCC	GGT	GTC	CTG	
	→	ALA	VAL	MET	PRO	LEU	LEU	GLU	ALA	GLI	VAL	LEU	
Proteína	(e)	GCA	GTC	ATG	CTG	CTG	CTG	GAG	GCC	-GT	GTC	CTG	
	→	ALA	VAL	MET	LEU	LEU	LEU	GLU	ALA	<u>GTG</u>	<u>TCC</u>	<u>TGG</u>	
										VAL	SER	TRP	

Figura 2. Definição de alelos (E^D , E e e) do loco *Extension* através das combinações dos nucleotídeos na posição 14.757.910 (T/C) e 14.757.924 (G/–) pb do gene receptor melanocortina-1 (*MC1R*) bovino e alterações de aminoácidos da proteína. Fonte: adaptado de Rouzaud et al. (2000).

Os genótipos formados pelos alelos do loco *Extension* resultam em indivíduos com diferentes pigmentações de pele (Tabela 1). Animais com a combinação de alelos $E^D E^D$, $E^D E$ e $E^D e$ apresentam uma pele de cor preta, pois a substituição do nucleotídeo T por C na posição 14.757.910 pb resulta em maior expressão do gene *MC1R*, bem como, em maior atividade do AMP cíclico e tirosinase, aumentando assim a síntese da eumelanina (ROBBINS et al., 1993). Animais com a combinação de alelos EE e Ee apresentam uma pele com cores balanceadas entre preto e vermelho, pois estas combinações resultam em expressão normal do gene *MC1R*, bem como, em atividade

normal do AMP cíclico e tirosinase, sintetizando eumelanina e faeumelanina em quantidades semelhantes (OLSON, 1999). Por sua vez, os animais com a combinação de alelos *ee* apresentam uma pele de cor vermelha, pois a deleção do nucleotídeo G na posição 14.757.924 pb resulta em expressão normal do gene *MC1R*, proteína não funcional e menor atividade do AMP cíclico e tirosinase, aumentando assim a síntese da faeumelanina (KLUNGLAND et al., 1995).

Tabela 1. Efeitos dos genótipos no loco *Extension*, localizado no gene receptor melanocortina-1 (*MC1R*), sobre a regulação de melanina na pele de bovinos

Característica	Genótipo		
	<i>E^DE^D, E^DE e E^De</i>	<i>EE e Ee</i>	<i>ee</i>
Expressão de <i>MC1R</i>	Alta	Normal	Normal
Concentração de <i>MC1R</i>	Alta	Normal	Normal
Funcionalidade de <i>MC1R</i>	Funcional	Funcional	Não funcional
Atividade de AMPc	Alta	Normal	Baixa
Atividade de tirosinase	Alta	Normal	Baixa
Tipo de melanina	Eumelanina	Balanceado	Faeumelanina
Cor de pele	Preto	Preto-vermelho	Vermelho

Fonte: adaptado de Klungland et al. (1995)

É importante ressaltar que a pigmentação da pele dos animais com a combinação de alelos *EE* e *Ee* no loco *Extension* (no gene *MC1R*) pode ser influenciada pela combinação de alelos no loco *Agouti* (no gene *ASIP*), havendo assim um efeito epistático, que pode levar a pele do animal tender a uma cor mais próxima do preto ou mais próxima do vermelho (ADALSTEINSSON et al., 1995; OLSON, 1999).

2.4. Vitamina D₃ e seus metabólitos

2.4.1. Fatores que regulam vitamina D₃ e seus metabólitos no organismo

A vitamina D₃ pode ser ingerida em alimentos e/ou fotossintetizada na pele por meio da radiação ultravioleta vinda dos raios solares. Em ambos os casos, a vitamina D₃ é transportada na corrente sanguínea por proteínas ligantes de vitamina D₃ (*DBP*) até o fígado, onde é hidroxilada na posição 25 pela enzima vitamina D₃-25 α hidroxilase e convertida a 25-hidróxi-vitamina D₃ (ELLIS et al., 2000). Posteriormente, *DBP* transporta 25-hidróxi-vitamina D₃ até ossos, placenta e, principalmente, túbulos renais,

onde ocorre a hidroxilação na posição 1, pela enzima 25-hidróxi-vitamina D₃-1 α hidroxilase (*CYP27B1*), dando origem à vitamina biologicamente ativa 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ (ROBERT et al., 2002). Basicamente, a função principal de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no corpo quando ligada ao seu receptor (*VDR*) é manter a homeostase no metabolismo de cálcio por promover sua absorção no intestino (ELLISON et al., 2005; SUTTON; MACDONALD, 2003).

Níveis suprafisiológicos de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ circulante tem elevado também as concentrações de cálcio no plasma e músculo (FERNANDEZ et al., 1990; LITTLEDIKE; GOFF, 1987). Tais efeitos de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ levaram pesquisadores a suplementarem dietas de animais com vitamina D₃ e seus metabólitos na tentativa de melhorar a maciez da carne por aumentar concentrações de cálcio (CARNAGEY et al., 2008ab; CHO et al., 2006; FOOTE et al., 2004; KARGES et al., 2001; MONTGOMERY et al., 2000, 2002, 2004b; LOBO-JR. et al., 2012; PEDREIRA et al., 2003; REILING; JOHNSON, 2003; SELL et al., 2004; SWANEK et al., 1999; TIPTON et al., 2007). Alguns destes trabalhos aproveitaram também para checar efeito do aumento nas concentrações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma e músculo sobre variáveis de cor, já que vitamina D₃ e seus metabólitos são relatadas por apresentar propriedade antioxidante.

Respostas inconsistentes para maciez de carne parecem indicar possíveis interações entre genótipo e ambiente, que não foram consideradas nos trabalhos citados acima. Em bovinos, a maciez melhorada e a elevação de cálcio devido à suplementação de vitamina D₃ na dieta ocorreram em *Bos taurus* (KARGES et al., 2001; MONTGOMERY et al., 2000; SWANEK et al., 1999), mas não em *Bos indicus* (LAWRENCE et al., 2006; LOBO-JR. et al., 2012; PEDREIRA et al., 2003; TIPTON et al., 2007). Maior concentração de 25-hidróxi-vitamina D₃ no plasma de bovinos *Bos taurus* do que no plasma de *Bos indicus*, após suplementação de mesma dosagem de vitamina D₃ na dieta (MONTGOMERY et al., 2004b), parece sugerir que *Bos indicus* produziram menores concentrações de vitamina D₃ sob a pele através de radiação ultravioleta devido à maior concentração de melanina na pele.

Por outro lado, concentrações basais de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma, fígado, rins e músculo foram maiores ou semelhantes em bovinos *Bos indicus* do que *Bos taurus* sob as mesmas condições climáticas, sem a suplementação de vitamina D₃ na dieta (MONTGOMERY et al., 2004a). Os valores encontrados de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma, fígado, rins e músculo em *Bos indicus* foram de 146,3 pg/mL,

226,0 pg/g, 69,7 pg/g e 166,3 pg/g e em *Bos taurus* (Continental e Britânicos agrupados) foram de 88,8 pg/mL, 151,2 pg/g, 66,6 pg/g e 145,0 pg/g, respectivamente.

Em humanos, o mesmo comportamento para as concentrações de 25-hidróxi-vitamina D₃ e 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ são observadas entre pessoas com concentrações diferentes de melanina na pele (HARRIS; DAWSON-HUGHES, 1998; ZADSHIR et al., 2005). Nestes trabalhos, pessoas negras com mais melanina na pele têm apresentado concentrações menores de 25-hidróxi-vitamina D₃ e semelhantes de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ circulantes comparado à pessoas de pele clara com menos melanina na pele.

Diferenças nas concentrações dos metabólitos da vitamina D₃ no plasma entre etnias humanas têm sido atribuídas às mutações em genes relacionados àqueles circulantes, possivelmente para compensar diferenças nas concentrações de melanina encontrada na pele (HAGENAU et al., 2009). Os genes candidatos *VDR*, *DBP* e *CYP27B1* poderiam ter então sofrido mutações que explicassem as diferentes concentrações de 25-hidróxi-vitamina D₃ e 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma entre bovinos *Bos indicus* e *Bos taurus*.

Trabalhos com marcadores moleculares nestes genes tentando explicar variações nas concentrações de 25-hidróxi-vitamina D₃ e 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ têm se concentrado em humanos. Em pessoas asiáticas (pele mais escura), nenhum dos quatro (4) polimorfismos testados no gene *VDR* tiveram associação com as concentrações de 25-hidróxi-vitamina D₃ e 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ (OGUNKOLADE et al., 2002). Entretanto, um (1) dos 11 polimorfismos testados para *VDR* em pacientes alemães (pele mais clara) com diabetes tipo-I apresentou associação com as concentrações de 25-hidróxi-vitamina D₃, mas nenhum deles associou-se com as de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ (RAMOS-LOPEZ et al., 2006). Também, somente um (1) dos 14 polimorfismos foi relacionado com as concentrações de 25-hidróxi-vitamina D₃ em americanos de origem europeia (ENGELMAN et al., 2008).

Por outro lado, marcadores relacionados ao gene *DBP* parecem ser mais eficientes para explicar variações nas concentrações de 25-hidróxi-vitamina D₃ e 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ entre pessoas negras e brancas. No gene *DBP* em pessoas de origem polonesa, três (3) polimorfismos apresentaram associação com as concentrações de 25-hidróxi-vitamina D₃ (KURYLOWICZ et al., 2006). Também, dois (2) e um (1) polimorfismos naquele mesmo gene foram associados respectivamente com concentrações de 25-hidróxi-vitamina D₃ e 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃, tanto em

pessoas brancas como negras (ENGELMAN et al., 2008). Os dois (2) polimorfismos no gene *DBP* associados com concentrações de 25-hidróxi-vitamina D₃ no trabalho de Engelman et al. (2008) apresentaram também associação com concentrações do mesmo circulante em mulheres de pele branca que se encontravam na pré-menopausa (SINOTTE et al., 2009).

Em contrapartida, polimorfismos no gene *CYP27B1* parecem ser os menos eficientes para explicar as mesmas variações explicadas pelos polimorfismos no gene *DBP*. Dos cinco (5) polimorfismos testados de *CYP27B1*, nenhum foi associado com as concentrações de 25-hidróxi-vitamina D₃ e 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ em ambas as cores de pele de humanos (ENGELMAN et al., 2008).

2.4.2. Gene *DBP*

O gene candidato *DBP* (AC_000163.1, Bos_taurus_UMD_3.1), que pode explicar parte da variação nas concentrações de 25-hidróxi-vitamina D₃ e 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma e tecidos, está localizado no cromossomo seis (6) e tem 43.242 pb (88.695.939 – 88.739.180 pb) distribuídos em 13 éxons e 12 íntrons. É um gene considerado de tamanho médio, onde a região responsável por codificar 455 aminoácidos apresenta 1.624 pb. Uma alta homologia do gene *DBP* é encontrada entre bovinos, humanos, chimpanzés, cães, camundongos, ratos, galinhas e peixes-zebra.

Existem oito (8) SNPs identificados na região codificadora do gene *DBP* em bovinos. Destes, três (3) são *missense* do tipo não-sinônimos, que causam trocas de aminoácidos da proteína e alteram sua função. Outros cinco (5) são do tipo sinônimo, que não alteram os aminoácidos da proteína e nem sua função e forma. A substituição de nucleotídeos do tipo não-sinônimo na posição 88.711.824 (C/G, RefSNP: rs135769061), 88.711.884 (C/T, RefSNP: rs136359868) e 88.739.073 (T/C, RefSNP: rs135330728) pb no gene *DBP* alteram os aminoácidos de cisteína para serina, de glutamina para arginina e de histidina para arginina, respectivamente (Figura 3).

Até o momento, nenhum desses SNPs citados foi avaliado em relação às concentrações de vitamina D₃, 25-hidróxi-vitamina D₃, 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ e cálcio no plasma e tecidos, bem como, quanto à maciez de carne em bovinos. Somente dois (2) SNPs (A/G, RefSNP: rs43338560 e C/T, RefSNP: rs43338565) localizados na região intrônica do gene *DBP* foram investigados em bovinos Holandês quanto às suas influências sobre as concentrações de vitamina D₃ no plasma, mas não foram investigados quanto às suas influências sobre as concentrações dos metabólitos 25-

hidróxi-vitamina D₃ e 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ (FERRERI et al., 2011). Nenhuma relação significativa entre aqueles SNPs e vitamina D₃ no plasma foi encontrada, possivelmente em razão dos SNPs estarem localizados na região intrônica ou em razão do número pequeno de animais avaliados (n=24).

Figura 3. Substituição de nucleotídeos do tipo sinônimo (quadros de cor verde) e não-sinônimo (quadros de cor laranja) na região codificadora de proteínas do gene da proteína ligante à vitamina D₃ (*DBP*) em bovinos. Fonte: site *Ensembl*.

2.5. Calpastatina

2.5.1. Fatores que regulam calpastatina no músculo

O amaciamento de carne maturada é controlado principalmente (68%) pelo sistema calpaína, composto pelas proteinases cisteínicas μ -calpaína e m-calpaína e pelo inibidor calpastatina (DRANSFIELD, 1992). Após o abate, as calpaínas (*CAPN*) agem degradando as proteínas miofibrilares presentes no músculo. As *CAPN* são dependentes de cálcio para ativação, além de serem inibidas pela proteína calpastatina (*CAST*) (KOOHMARAIE, 1992, 1994). Portanto, a taxa e extensão da proteólise miofibrilar depende da concentração de cálcio e *CAST* no músculo.

Menor maciez de carne bovina tem sido atribuída à maior proporção de alelos *Bos indicus*, o qual resulta em maior atividade de *CAST*, maiores valores de força de cisalhamento e menores pontuações de maciez em painel sensorial (SHACKELFORD

et al., 1991, 1994; WHEELER et al., 1990, 1994; WHIPPLE et al., 1990). No entanto, animais cruzados [3/8 Sahiwal (*Bos indicus*) × 5/8 Hereford (*Bos taurus*)] tiveram atividade de CAST e fragmentação miofibrilar semelhantes aos animais basicamente taurinos (Hereford × Angus), porém seus valores de força de cisalhamento foram maiores (WHIPPLE et al., 1990).

O conhecimento da importância do sistema calpaína sobre maciez de carne tem aumentado o interesse de pesquisadores em estudar os genes relacionados a este sistema. A identificação e seleção de alelos favoráveis para maciez de carne podem ocorrer graças aos estudos com marcadores moleculares relacionados ao gene da CAPN e CAST em ambos os tipos biológicos *Bos taurus* e *Bos indicus* (BISHOP et al., 1993; CAFE et al., 2010; CARVALHO, 2008; CASAS et al., 2006; CHUNG et al., 2001; CORVA et al., 2007; GILL et al., 2009; JUSZCZUK-KUBIAK et al., 2004; LONERGAN et al., 1995; PAGE et al., 2002, 2004; PINTO et al., 2010; SCHENKEL et al., 2006; SMITH et al., 2009).

Especificamente, no gene da CAST, nenhuma relação entre os polimorfismos *EcoRI* e *BamHI* (enzimas de restrição, marcadores do tipo RFLP) com atividade de CAST ou força de cisalhamento de carne maturada à 14 dias foi encontrada, em gado cruzados *Bos taurus* × *Bos indicus* (LONERGAN et al., 1995). Por outro lado, investigação em 47 touros Angus verificou associação de polimorfismo no íntron 6 da CAST com atividade de CAST, mas não com maciez (CHUNG et al., 2001).

Em *Bos taurus*, os polimorfismos *AluI* (RFLP) e SNP2870 no gene CAST não apresentaram efeito sobre força de cisalhamento (CORVA et al., 2007; JUSZCZUK-KUBIAK et al., 2004). Neste mesmo tipo biológico, associações não significativas (GILL et al., 2009) e significativas (SCHENKEL et al., 2006) para força de cisalhamento no polimorfismo UOGCAST1 foram observadas. Associações significativas têm sido verificadas somente para maciez sensorial no polimorfismo *AluI* (RFLP) (JUSZCZUK-KUBIAK et al., 2004).

Um outro estudo com marcadores moleculares (nº de patente WO/2002/064820, BARENDSE, 2002) relacionados ao gene CAST revelou efeito sobre força de cisalhamento e maciez sensorial aos 14 dias de maturação para populações compostas somente de animais *Bos taurus* e cruzados *Bos taurus* × *Bos indicus*, sem nenhum efeito para população composta somente de animais *Bos indicus* (CASAS et al., 2006). No Brasil, resultados significativos foram observados para o marcador UOGCAST1 em relação à atividade de calpastatina e força de cisalhamento para

animais *Bos indicus* (CARVALHO, 2008; PINTO et al., 2010; SMITH et al., 2009). Por fim, têm sido apresentadas evidências que seleção baseada nos marcadores no gene *CAST* melhora maciez de carne em animais *Bos indicus* sem afetar outras características de qualidade de carne (CAFE et al., 2010).

2.5.2. Gene *CAST*

O gene *CAST* (AC_000164.1, *Bos_taurus_UMD_3.1*), responsável por regular diretamente a atividade de *CAST* no músculo de bovinos, está localizado no cromossomo sete (7) e tem 136.275 pb (98.444.979 – 98.581.253 pb) em 32 éxons e 31 íntrons. É um gene considerado de tamanho grande, onde a região responsável por codificar aminoácidos pode variar de tamanho (1.317 a 4.550 pb). Isto ocorre porque quatro (4) isoformas (I, II, III e IV) da proteína *CAST* podem ser transcritas (RAYNAUD et al. 2005a). O gene *CAST* é conservado entre bovinos, humanos, chimpanzés, cães, camundongos, ratos, galinhas e peixes-zebra.

Na região do gene que codifica as proteínas *CAST* de diferentes isoformas, existe um total de 15 SNPs, dos quais cinco (5) são *missense* do tipo não-sinônimo e dez (10) são do tipo sinônimo. Há 15, 13, 11 e oito (8) SNPs que podem ser encontrados na *CAST* de isoformas I, II, III e IV, respectivamente. Todos os SNPs que podem ser observados na *CAST* de isoformas II (quatro SNPs do tipo *missense*), III (dois SNPs do tipo *missense*) e IV (dois SNPs do tipo *missense*) são comuns aos SNPs que podem ser observados na *CAST* de isoforma I (cinco SNPs do tipo *missense*).

Os SNPs *missense* do gene *CAST* estão localizados na posição 98.445.037 (A/C, RefSNP: rs137423945), 98.485.261 (A/G, RefSNP: rs109727850), 98.485.273 (T/C, RefSNP: rs137601357), 98.554.459 (T/C, RefSNP: rs109384915) e 98.566.736 (G/C, RefSNP: rs110914810) pb (Figura 4). Destes, os dois (2) últimos SNPs *missense* podem influenciar todas as isoformas da proteína *CAST*.

As isoformas I e III de *CAST* são as mais expressas no músculo esquelético, enquanto que a isoforma II de *CAST* é mais expressa no músculo cardíaco de bovinos (PARR et al., 2004; RAYNAUD et al., 2005b). Por outro lado, a isoforma IV de *CAST* é expressa especificamente nos testículos (LI; GOLDBERG, 2000; RAYNAUD et al., 2005b). Também, tem sido observado que a isoforma I e III da *CAST* são menos expressas no músculo *Longissimus thoracis* do que nos músculos *Pectoralis*, *Psoas major*, *Semitendinosus*, *Semimembranosus* e *Biceps femoris* (MUROYA et al., 2012), o que poderia conferir uma carne mais macia para o músculo *Longissimus thoracis*.

Figura 4. Substituição de nucleotídeos do tipo sinônimo (quadros de cor verde) e não-sinônimo (quadros de cor laranja), além do tipo *splice site* (quadro de cor vermelha), na região codificadora de proteínas do gene da proteína calpastatina (CAST) em bovinos. Fonte: site *Ensembl*.

3. HIPÓTESES

- i) Maiores concentrações de melanina na pele resultam em menores concentrações dos metabólitos da vitamina D₃ no plasma e de cálcio plasmático e muscular, piorando maciez e cor de carne;
- ii) Marcadores nos genes *MC1R* e *DBP* estão associados com as concentrações de melanina na pele, metabólitos da vitamina D₃ no plasma e cálcio plasmático e muscular, além de maciez e cor de carne;
- iii) Marcador no gene *CAST* está associado com maciez e cor de carne.

4. TESTE DAS HIPÓTESES

- i) A primeira hipótese foi testada por meio de análises de correlação e regressão entre as características de interesse (Figura 5A);
- ii) A segunda hipótese foi testada por meio de análises de variância usando modelos lineares mistos, os quais contemplavam o efeito de genótipo dos animais nos marcadores *MC1R* e *DBP* para cada característica (Figura 5B);
- iii) A terceira hipótese foi testada por meio de análises de variância usando modelos lineares mistos, os quais contemplavam o efeito de genótipo dos animais no marcador *CAST* para cada característica (Figura 5B).

Figura 5. Esquema ilustrativo das análises que foram usadas para testar a primeira (A, análise de correlação e regressão), segunda e terceira (B, análise de associação) hipótese do trabalho. Legenda: 25-OH-D₃ = 25-hidróxi-vitamina D₃; 1,25-OH₂-D₃ = 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃; SNPs = polimorfismos de um único nucleotídeo; *MC1R* = receptor da melanocortina-1; *DBP* = proteína ligante à vitamina D₃; *CAST* = calpastatina.

5. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi investigar as relações entre as concentrações de melanina na pele, metabólitos da vitamina D₃ no plasma, cálcio plasmático e muscular e maciez e cor de carne em bovinos da raça Nelore. Além disso, foi verificado se a variação nas concentrações de melanina na pele, metabólitos da vitamina D₃ no plasma e cálcio plasmático e muscular estão associados com os polimorfismos nos genes *MC1R* e *DBP* e se a variação na maciez e cor de carne bovina estão associadas com os polimorfismos nos genes *MC1R*, *DBP* e *CAST*.

6. MELANINA NA PELE E 25-HIDRÓXI-VITAMINA D₃ NO PLASMA INFLUENCIAM MACIEZ E COR DE CARNE EM BOVINOS NELORE

Resumo

Vitamina D₃ é fotossintetizada sob a pele pela radiação ultravioleta da luz solar. Bovinos *Bos indicus* apresentam maiores concentrações de melanina na pele, que influenciam a fotossíntese de vitamina D₃. A vitamina D₃ é convertida em 25-hidróxi-vitamina D₃ (25-D) no fígado, a qual é convertida no metabólito ativo 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ (1,25-D) nos rins. Maiores concentrações dos metabólitos de vitamina D₃ não somente podem aumentar concentrações de cálcio no plasma e músculo e melhorar maciez de carne, como também melhorar a cor da carne devido sua capacidade anti-oxidativa. O objetivo deste trabalho foi investigar as relações entre as concentrações de melanina total (MEL_T) e suas frações [faeumelanina (FAE) e eumelanina (EUM)] na pele, metabólitos da vitamina D₃ (25-D e 1,25-D) no plasma, cálcio plasmático e muscular e maciez [Índice de Fragmentação Miofibrilar (MFI) e força de cisalhamento (FC)] e cor (L^* , a^* e b^*) em carne maturada (1, 7 e 14 dias). Bovinos Nelore (n=86), abatidos com 516 ± 39 kg aos 24 ± 1 meses, foram usados para mensuração das características. Na pele, a EUM foi positivamente correlacionada com MEL_T mais do que a FAE. As frações de melanina na pele foram correlacionadas negativamente. A FAE foi correlacionada negativamente com 1,25-D plasmático, mas não foi correlacionada com 25-D plasmático. Melanina e suas frações na pele e metabólitos da vitamina D₃ no plasma não foram correlacionadas com cálcio plasmático e muscular. Todavia, cálcio no plasma e músculo foram correlacionados positivamente com MFI e valores de L^* e b^* e negativamente com FC e valores de a^* . A EUM e MEL_T na pele foram correlacionadas negativamente com FC e valores de a^* e b^* e positivamente com valores de L^* , enquanto que 25-D no plasma foi correlacionado positivamente com MFI e valores de a^* e b^* e negativamente com valores de L^* . A FAE foi correlacionada positivamente com MFI e negativamente com os valores de L^* , a^* e b^* . Ao final, maiores concentrações de FAE na pele e 25-D no plasma melhoraram proteólise miofibrilar e cor de carne, enquanto as maiores concentrações de EUM e MEL_T na pele resultaram em uma carne mais macia com uma pior cor.

Palavras-chave: força de cisalhamento, MFI, proteólise miofibrilar, radiação ultravioleta

SKIN MELANIN AND PLASMA 25-HYDROXY-VITAMIN D₃ INFLUENCE MEAT TENDERNESS AND COLOR IN NELLORE CATTLE

Abstract

Vitamin D₃ is photosynthesized under skin by the ultraviolet radiation from sunlight. The *Bos indicus* cattle have higher melanin concentrations in skin, which influences the photosynthesis of vitamin D₃. The vitamin D₃ is converted to 25-hydroxy-vitamin D₃ (25-D) in liver, which is converted to active metabolite 1,25-di-hydroxy-vitamin D₃ in kidneys. Higher concentrations of vitamin D₃ metabolites cannot only increase concentrations of plasma and muscle calcium and improve meat tenderness, but also improve meat color due to their anti-oxidative capacities. The objective of this work was to investigate the relationships between the concentrations of total melanin (MEL_T) and its fractions [pheomelanin (PHEO) and eumelanin (EUM)] in skin, vitamin D₃ metabolites (25-D and 1,25-D) in plasma, plasma and muscle calcium, and tenderness [Myofibrillar Fragmentation Index (MFI) and shear force (SF)] and color (L^* , a^* , and b^*) in aged meat (1, 7, and 14 days). Nellore cattle (n=86), slaughtered with 516 ± 39 kg at 24 ± 1 months, were used for the traits measurements. In skin, the EUM fraction was positively correlated with MEL_T than the PHEO fraction. The melanin fractions in skin were negatively correlated. The PHEO fraction was negatively correlated with plasma 1,25-D, but not with plasma 25-D. Melanin and its fractions in skin and vitamin D₃ metabolites in plasma were not correlated with plasma and muscle calcium. Nevertheless, plasma and muscle calcium were positively correlated with MFI, and L^* and b^* values and negatively correlated with SF and a^* values. The EUM and MEL_T in skin were negatively correlated with SF, and a^* and b^* values and positively correlated with L^* values, while 25-D in plasma was positively correlated with MFI, and a^* and b^* values and negatively correlated with L^* values. The PHEO was positively correlated with MFI and negatively correlated with L^* , a^* , and b^* values. At last, higher skin PHEO and plasma 25-D concentrations improved the myofibrillar proteolysis and meat color, while higher skin EUM and MEL_T concentrations resulted in a meat with improved tenderness and worsened color.

Keywords: myofibrillar proteolysis, MFI, shear force, ultraviolet radiation

6.1. Introdução

Vitamina D₃ pode ser obtida pela ingestão de alimentos ou pela radiação ultravioleta da luz solar. Suplementação de vitamina D₃ e seus metabólitos na dieta melhoram maciez da carne de bovinos *Bos taurus* (KARGES et al., 2001; MONTGOMERY et al., 2000; SWANEK et al., 1999), mas não de bovinos *Bos indicus* (LAWRENCE et al., 2006; LOBO-JR. et al., 2012; PEDREIRA et al., 2003; TIPTON et al., 2007). Além disso, bovinos *Bos indicus* e *Bos taurus* apresentam diferenças nas concentrações de melanina na pele (AMAKIRI, 1979; HAFEZ et al., 1955; SILVA et al., 2001; YANG, 1952), que podem influenciar a fotossíntese de vitamina D₃ sob a pele (ENGELMAN et al., 2008; HARRIS; DAWSON-HUGHES, 1998; SILVA et al., 2001).

A vitamina D₃ é hidroxilada no fígado e convertida em 25-hidróxi-vitamina D₃ que é, posteriormente, transportada até os rins, onde é hidroxilada novamente e convertida no metabólito ativo 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ (OMDAHL et al., 2002). O 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ melhora a absorção de cálcio pelo intestino, aumentando suas concentrações no plasma e músculo (LITLEDIKE; GOFF, 1987; CAPIATI et al., 2000). A fragmentação de proteínas miofibrilares de carne maturada é atribuída à ação das enzimas calpaínas, que são proteases cálcio-dependentes (GEESINK et al., 1995; KOOHMARAIE, 1992, 1994). Variações nos valores de força de cisalhamento foram observadas em função das concentrações dos metabólitos da vitamina D₃ no plasma e de cálcio no plasma e músculo (MONTGOMERY et al., 2002; SWANEK et al., 1999).

Embora aumento nas concentrações de cálcio muscular possa melhorar maciez de carne, um efeito detrimental para a cor de carne poderia ocorrer (KUCHENMEISTER et al., 2000; LOBO-JR. et al., 2012). Maiores concentrações de cálcio no músculo foram relacionadas com oxidação de carne por aumentar radicais livres (LAWRENCE et al., 2003). Por outro lado, as maiores concentrações dos metabólitos da vitamina D₃ no plasma e músculo foram relacionadas com a melhora na cor de carne (HANSEN et al., 2012; WIEGAND et al., 2002; WILBORN et al., 2004), devido à capacidade anti-oxidativa relacionada com aumento nas concentrações das enzimas antioxidante (HAMDEN et al., 2009; LAHUCKY et al., 2007).

A hipótese deste trabalho é que animais com maiores concentrações de melanina na pele têm pior maciez e cor de carne devido as menores concentrações dos metabólitos da vitamina D₃ no plasma e de cálcio no plasma e músculo. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar as relações entre as concentrações de melanina

na pele, metabólitos da vitamina D₃ no plasma, cálcio plasmático e muscular e maciez e cor de carne em bovinos da raça Nelore.

6.2. Material e Métodos

6.2.1. Animais e dieta

Foram usados 86 animais da raça Nelore, sendo 43 machos castrados e 43 machos inteiros. Todos os animais tinham pais conhecidos e foram criados a pasto até o sobreano (18 a 20 meses). Após este período, os animais foram confinados por diferentes períodos (59, 80, 115 e 129 dias) no confinamento localizado na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) em Pirassununga (SP), campus pertencente à Universidade de São Paulo (USP). Uma dieta comum composta de 15% de volumoso (bagaço de cana de açúcar) e 85% de concentrado (milho, farelo de soja, casca de soja, glúten de milho, sal mineral e ureia), contendo 79,4% de matéria seca, 74,8% de nutriente digestível total, 14,4% de proteína bruta, 3,0% de extrato etéreo, 0,2% de cálcio e 0,5% de fósforo, foi oferecida aos animais durante o período de confinamento. Um total de oito aditivos foi testado na dieta dos animais. Os animais foram pesados em jejum antes e após serem confinados para o cálculo do ganho de peso diário.

6.2.2. Abate e avaliação de carcaça

Ao final de cada tempo de confinamento, um grupo de animais (n=20-24) foi abatido serialmente no Matadouro Escola da Prefeitura do Campus de Pirassununga. Todos os 86 animais foram abatidos com 516 ± 39 kg aos 24 ± 1 meses entre os meses de Setembro e Dezembro de 2011. Avaliação de carcaças e coleta de amostras foi realizada nos 86 animais. As carcaças foram pesadas e os rendimentos foram calculados para cada animal por dividir o peso da carcaça pelo respectivo peso vivo antes do abate, sendo o resultado multiplicado por 100. O declínio de pH e temperatura foram aferidos aos tempos 0, 3, 6 e 24 horas *post-mortem* no músculo *Longissimus thoracis* do lado direito das carcaças, na altura da 12^a-13^a vértebra torácica, utilizando-se um medidor de pH e temperatura portátil (pH 11 Economy Meter, Oakton instruments). A área de olho de lombo foi medida usando um *grid* quadriculado e a espessura de gordura foi medida com uma régua graduada às 24 horas *post-mortem*,

no mesmo local onde foram realizadas as medidas de pH e temperatura, quando o músculo *Longissimus thoracis et lumborum* foi removido das carcaças.

6.2.3. Coleta de amostras

6.2.3.1. Sangue

O sangue de cada animal foi coletado em tubo *vacutainer* com heparina de sódio durante a sangria, na linha de abate, para as mensurações de 25-hidróxi-vitamina D₃, 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ e cálcio plasmático. O sangue foi imediatamente submetido à centrifugação de $1.000 \times g$ por 15 minutos para a obtenção do plasma, que foi então congelado à -20°C até a realização das análises.

6.2.3.2. Pele

Um pedaço (225 mm^2) de couro de cada animal foi retirado na região dorsal próximo à cauda durante a esfolagem. Cada pedaço de couro foi seccionado em aproximadamente nove pedaços menores de 25 mm^2 , os quais foram congelados rapidamente em nitrogênio líquido (-196°C) e armazenados no freezer à -80°C para posterior quantificação de melanina.

6.2.3.3. Músculo

Todas as amostras do músculo *Longissimus thoracis* foram coletadas entre a 10^a e 13^a vértebra torácica da meia-carcaça direita de cada animal. Amostras foram coletadas imediatamente após o abate, congeladas rapidamente em nitrogênio líquido (-196°C) e armazenados no freezer à -80°C para posterior quantificação de cálcio muscular. Às 24 horas *post-mortem*, durante a desossa, foram coletados três bifos de 2,5 cm de espessura para análise de força de cisalhamento e três bifos de 1 cm de espessura para análise de Índice de Fragmentação Miofibrilar, bifos os quais foram embalados a vácuo e maturados à 2°C por 1, 7 e 14 dias. As medidas de cor foram realizadas nos mesmos bifos usados para análise de força de cisalhamento, antes do cozimento, em todos os tempos de maturação.

6.2.4. Concentração de faeumelanina, eumelanina e melanina total na pele

A quantificação das frações de melanina (faeumelanina e eumelanina) foi realizada nas secções (25 mm²) de couro seguindo a metodologia descrita em humanos por Alaluf et al. (2002). Cada secção de couro foi tratada com 2 M de brometo de sódio (NaBr) em tampão fosfato de sódio 1X (PBS 1X, 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 8 mM de Na₂HPO₄ e 1,5 mM de KH₂PO₄ a pH = 7,4) por 5 horas à temperatura ambiente para que a epiderme fosse separada da derme. A epiderme foi seca a vácuo e pesada. Em seguida, a epiderme seca foi macerada com uma pinça em um microtubo usando nitrogênio líquido. A pinça foi lavada com 500 µL de água destilada sobre o microtubo, o qual foi centrifugado à 15.000 rpm por 15 minutos (25°C).

A água foi então descartada e a epiderme macerada foi suspendida em uma solução contendo 1 M de hidróxido de sódio (NaOH) e 8 M de ureia. A epiderme suspendida foi incubada por 3 horas à 37°C sob agitação para que a fração alcalina solúvel (faeumelanina) fosse obtida. Foi realizada uma centrifugação nas mesmas condições anteriores e os sobrenadantes obtidos foram transferidos para um novo microtubo, enquanto os precipitados foram retidos para posterior determinação da fração alcalina insolúvel (eumelanina). Clorofórmio foi então adicionado nos sobrenadantes e agitado para separar lipídio (parte inferior) de proteína (parte superior). Uma nova centrifugação foi realizada nas mesmas condições e os sobrenadantes obtidos foram transferidos à uma microplaca para que a leitura de absorbância à 405 nm fosse realizada. Os precipitados retidos foram então ressuspensos em uma solução contendo somente 1 M de NaOH e, depois, incubados por 72 horas à 60°C sob agitação para que a fração alcalina insolúvel fosse obtida. A partir desta etapa, todo o procedimento realizado para a fração alcalina solúvel foi repetido.

As concentrações de faeumelanina foram obtidas usando como padrão a melanina sintética solubilizada à 37°C por 3 horas, enquanto as concentrações de eumelanina foram obtidas usando como padrão a melanina sintética solubilizada à 60°C por 72 horas. Os dados foram normalizados para o peso das epidermes secas. Por fim, a concentração de melanina total foi obtida somando as concentrações das duas frações. Os resultados foram expressos em µg/mg de epiderme.

6.2.5. Concentração dos metabólitos da vitamina D₃ no plasma

As determinações de 25-hidróxi-vitamina D₃ e 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ foram realizadas no plasma de 30 animais. As concentrações de 25-hidróxi-vitamina D₃ foram determinadas por Imunoensaio de Eletroquimioluminescência (ECLIA) através do *Kit Elecsys Vitamin D total* (REF 05894913, Cobas®, Roche Diagnostics GmbH), usado em humanos (LEINO et al., 2008; ONG et al., 2012). O princípio do teste se baseia na competição da 25-hidróxi-vitamina D₃ presente na amostra para se ligar à proteína ligante à vitamina D₃ (*DBP*). O ensaio consistiu das seguintes etapas: i) primeira incubação – incubação da amostra com ditiotreitol e NaOH para que a 25-hidróxi-vitamina D₃ ligada se desprenda da *DBP*; ii) segunda incubação – incubação da amostra pré-tratada com a *DBP* marcada com rutênio para que um complexo entre a 25-hidróxi-vitamina D₃ livre e a *DBP* marcada com rutênio seja formado; iii) terceira incubação – adição de micropartículas revestidas com estreptavidina e 25-hidróxi-vitamina D₃ marcada com biotina para que a *DBP* marcada com rutênio não ligada forme um complexo com a 25-hidróxi-vitamina D₃ marcada com biotina de fase sólida via interação de biotina e estreptavidina; iv) a reação de mistura é aspirada para dentro da célula de medição, onde micropartículas são magneticamente capturadas para a superfície do eletrodo; v) substâncias não ligadas são então removidas com o aparato ProCell/ProCell M; vi) aplicação de uma voltagem ao eletrodo induz então emissão quimioluminescente, a qual é medida por um fotomultiplicador; e vii) resultados são determinados através de uma curva de calibração de dois (2) pontos gerada pelo próprio instrumento e de uma curva principal fornecida via código de barras do reagente. Os valores foram expressos em ng/mL.

Por sua vez, as concentrações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ foram determinadas por Radioimunoensaio (RIA) (HOLLIS et al., 1996) precedido da separação de frações da vitamina D (vitamina D₃, 25-hidróxi-vitamina D₃, 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (SHEPARD et al., 1979; HORST et al., 1981). Quantidades conhecidas de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ marcado por radioisótopos em etanol foram adicionadas, como um marcador interno, a cada tubo contendo o plasma para monitorar a recuperação do analito no ensaio. Os lipídios foram extraídos das amostras com cloreto de metanol:metileno (1:3) e solventes removidos com um concentrador. O extrato lipídico resultante foi solubilizado em hexano:clorofórmio:metanol (9:1:1) e aplicado à coluna Sephadex LH no HPLC

para separar as frações. A fração contendo os metabólitos di-hidróxi-vitamina D (24,25-di-hidróxi-vitamina D, 25,26-di-hidróxi-vitamina D e 1,25-di-hidróxi-vitamina D) foi coletada, solubilizada em isopropanol:hexano (11:86) e aplicada à coluna Zorbax Sil no HPLC. A fração 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ foi coletada e a radioatividade do marcador interno colocado no início da análise foi medida para analisar a porcentagem recuperada. A fração 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ foi então mensurada por RIA, que consistiu de uma incubação com o anticorpo primário por 2 horas a temperatura ambiente, seguida por uma incubação com o anticorpo secundário por 20 minutos para precipitar o complexo formado. Uma centrifugação foi realizada e o sobrenadante foi descartado. A radioatividade restante no tubo foi contada por um sistema contador de gama. Os valores foram expressos em pg/mL.

6.2.6. Concentração de cálcio plasmático e muscular

A determinação das concentrações de cálcio no plasma e músculo foi realizada respectivamente nas amostras de 86 e 43 animais. O plasma foi diretamente analisado, enquanto que o músculo foi primeiramente homogeneizado com tampão PBS 1X a 30.000 rpm por 40 segundos usando um homogeneizador Ika T-10. Em seguida, os homogenatos de músculos foram centrifugados a $3.000 \times g$ (4°C) por 10 minutos para obtenção do sobrenadante, que foi usado nas determinações.

As concentrações de cálcio foram determinadas usando o *kit QuantiChrom™ Calcium Assay* (DICA-500, Biossay Systems) por método colorimétrico (ARPORNMAEKLONG et al., 2009; HERNANDEZ et al., 2007; PONNAPAKKAM et al., 2012; VALVERDE et al., 2008; SHU et al., 2010). Um reagente de trabalho foi preparado por combinar volumes iguais de um reagente A (ácido o-ftálico, polivinilpirrolidona, metiltimol azul e hidroxiquinolona) e um reagente B (sulfito de sódio e monoetanolamina). O cloreto de cálcio foi diluído e usado como padrão. Então, padrões diluídos e amostras (5 µL) foram transferidos para uma microplaca. O reagente de trabalho (200 µL) foi adicionado e agitado levemente para misturar. Após uma incubação de 3 minutos a temperatura ambiente, leituras de absorbâncias à 620 nm foram realizadas.

Os valores de cálcio (mg/dL) no músculo foram multiplicados pelo fator de diluição [(leitura de absorbância $\times$ volume de tampão) $\div$ peso do músculo]. A unidade em mg/dL foi convertida para mg/100 g, uma vez que um (1) dL ou 100 mL de tampão PBS 1X pesava aproximadamente 99,4 gramas.

6.2.7. Índice de Fragmentação Miofibrilar (MFI)

As análises de MFI foram realizadas nos bifes (1 cm de espessura) maturados por 1, 7 e 14 dias, usando o procedimento descrito por Olson et al. (1976) e Culler et al. (1978). Amostras (2 g) foram homogeneizadas em 20 mL de tampão de MFI (100 mM de KCl, 20 mM de KH_2PO_4 , 20 mM de K_2HPO_4 , 1 mM MgCl_2 e 1 mM EDTA, pH=7,0) a 22.500 rpm por 40 segundos usando um homogeneizador Turratec TE-102. Posteriormente, o homogenato foi centrifugado por 15 minutos à $1.000 \times g$ em 4°C . O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado com a adição de 20 mL de tampão de MFI e agitado em vórtex. O ressuspensionado foi novamente centrifugado por 15 minutos à $1.000 \times g$ em 4°C e o sobrenadante foi descartado. Para ressuspender o precipitado, 10 mL de tampão de MFI foi adicionado. O ressuspensionado foi filtrado com uma peneira para retirar o tecido colagenoso. Em cada ressuspensionado filtrado foi determinado a concentração de proteína pelo método de Biureto, onde a curva padrão com proteína purificada (*Bovine Serum Albumin*) foi usada. Após a determinação da concentração de proteína, os ressuspensionados filtrados tiveram suas concentrações de proteína igualada por diluição em tampão de MFI (0,5 mg de proteína/mL) e foram submetidos às leituras de absorbância à 540 nm em um espectrofotômetro. Então, os valores de absorbância foram multiplicados por 200 para obter os valores de MFI.

6.2.8. Força de cisalhamento

A análise de força de cisalhamento foi realizada em bifes (2,5 cm de espessura) maturados por 1, 7 e 14 dias, seguindo os procedimentos descritos por AMSA (1995). Para força de cisalhamento, os bifes foram cozidos no forno elétrico até atingirem a temperatura interna de 40°C , quando então foram virados, aguardando atingirem a temperatura interna final de 71°C (monitoradas por termômetros individuais). Após retornarem a temperatura ambiente, os bifes foram colocados na geladeira ($\pm 2^\circ\text{C}$) por onde ficaram toda a noite. No dia seguinte, as extremidades e os tecidos conjuntivos foram removidos dos bifes. Entre seis (6) e oito (8) cilindros com diâmetros de 1,25 cm foram retirados dos bifes no sentido paralelo às fibras. Por fim, os cilindros foram submetidos perpendicularmente ao aparelho *Warner-Bratzler* a fim de se medir a força necessária para cisalhar o cilindro. A medida foi expressa em kg.

6.2.9. Cor objetiva

As leituras de cor foram realizadas nos bifes (2,5 cm de espessura) maturados por 1, 7 e 14 dias. Um colorímetro Minolta CM-2500d (Minolta Corporation/ISD, Ramsey, NJ, USA) com uma abertura de 30 mm, uma fonte de luz D₆₅ e um observador de 10° foi usado para medir a luminosidade (L^*), vermelho (a^*) e amarelo (b^*) segundo o sistema *CIELAB* (CIE, 1976). A relação entre os valores de a^* e b^* (a^*/b^*) foi utilizada como um indicador de oxidação do pigmento mioglobina (AMSA, 2012).

6.2.10. Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa *Statistical Analysis System*®, versão 9.2 (SAS, 2008). Inicialmente, análises descritivas para checagem dos dados foram realizadas para todas as variáveis usando o procedimento PROC MEANS. Análises de correlações de Momento-Produto de *Pearson* foram realizadas usando o procedimento PROC CORR, visando estudar as relações entre as concentrações de melanina total e suas frações na pele, metabólitos da vitamina D₃ no plasma, cálcio no plasma e músculo e maciez e cor de carne. Modelos de regressão linear e quadrático foram avaliados usando o procedimento PROC GLM. Coeficientes de correlação de *Pearson*, modelos de regressão linear e quadrático e coeficientes de regressão foram considerados significativos quando a probabilidade do teste aplicado foi menor ou igual 5% e sugestivas quando a probabilidade do teste esteve entre 5 e 8%.

6.3. Resultados e Discussão

6.3.1. Análise descritiva

O comportamento das variáveis relacionadas ao desempenho e características de carcaça dos animais utilizados no experimento está descrito na Tabela 2. A espessura de gordura e a temperatura às 24 horas *post-mortem* medidas no músculo *Longissimus thoracis* das carcaças tiveram os maiores coeficientes de variação. Diferenças na espessura de gordura têm resultado em diferenças na temperatura média (dados agrupados de 0, 3, 6, 9, 12 e 24 horas *post-mortem*) do músculo

Longissimus entre animais da raça Brahman e Angus (SHACKELFORD et al., 1991), sugerindo que a espessura de gordura define o ritmo de resfriamento da carcaça. Portanto, uma maior variação na temperatura final dos músculos *Longissimus thoracis* avaliados poderia ser atribuída à maior variação de espessura de gordura na carcaça entre os animais. Todavia, médias e coeficientes de variação de todas as características de desempenho e carcaça estão próximos aos encontrados em outros experimentos usando animais da raça Nelore, Tabapuã e Brahman (CURI et al., 2010; FERRAZ et al., 2009; LOBO-JR. et al., 2012; RIBEIRO et al., 2012; SMITH et al., 2009).

Tabela 2. Análise descritiva dos dados de desempenho e características de carcaça em bovinos da raça Nelore

Variável	N	Média	DP	CV (%)	Mínimo	Máximo
PVI (kg)	86	359	34,9	9,7	248	446
PVF (kg)	86	516	39,0	7,6	374	592
GMD (kg/dia)	86	1,7	0,38	22,3	0,9	2,7
PCQ (kg)	86	306	23,3	7,6	229	350
RCQ (%)	86	59,3	1,79	3,0	55,0	65,1
AOL (cm ²)	86	76,4	8,23	10,8	60,0	108,0
EGS (mm)	85	4,9	2,16	43,7	0,3	10,0
pH _{0h}	86	6,49	0,186	2,9	5,50	6,84
pH _{3h}	86	6,20	0,236	3,8	5,28	6,57
pH _{6h}	86	5,90	0,289	4,9	5,20	6,47
pH _{24h}	86	5,61	0,220	3,9	5,04	6,13
TEMP _{0h} (°C)	86	37,7	1,41	3,7	33,1	40,6
TEMP _{3h} (°C)	86	26,1	3,08	11,8	18,8	33,1
TEMP _{6h} (°C)	86	17,5	3,07	17,5	11,2	23,8
TEMP _{24h} (°C)	86	3,2	1,21	38,3	1,2	6,9

Legenda: n = número de animais avaliados; DP = desvio-padrão; CV = coeficiente de variação; Mínimo = valor mínimo; Máximo = valor máximo; PVI = peso vivo inicial; PVF = peso vivo final; PCQ = peso de carcaça quente; RCQ = rendimento de carcaça quente; AOL = área de olho de lombo; EGS = espessura de gordura subcutânea; pH_{0h, 3h, 6h e 24h} = pH de carcaça às 0, 3, 6 e 24 horas *post-mortem*; e TEMP_{0h, 3h, 6h e 24h} = temperatura de carcaça às 0, 3, 6 e 24 horas *post-mortem*.

Nenhum trabalho em bovinos foi encontrado até o momento para comparar as concentrações de faeumelanina, eumelanina e melanina total na pele (Tabela 3). No entanto, as médias e dispersões encontradas para melanina total e suas frações na pele escura dos bovinos Nelore deste trabalho foram próximas àquelas encontradas na pele escura de pessoas de origem africana e indiana (ALALUF et al., 2002). A maior média e o menor coeficiente de variação para as concentrações de eumelanina na

pele, quando comparado com as concentrações de faeumelanina, sugerem que eumelanina é a fração predominante na pele e, também, que a faeumelanina é a fração que mais contribui para as diferenças na cor de pele entre animais dentro da raça Nelore, mesmo que as diferenças possam ser de baixa magnitude.

Tabela 3. Análises descritivas para as concentrações das frações de melanina na pele, dos metabólitos da vitamina D₃ no plasma e de cálcio no plasma e músculo em animais bovinos da raça Nelore

Variável	n	Média	DP	CV (%)	Mínimo	Máximo
FAE (µg/mg)	86	3,1	1,89	60,2	1,2	13,1
EUM (µg/mg)	86	11,3	4,16	36,6	0,4	25,7
MEL _T (µg/mg)	86	14,5	4,15	28,7	7,6	32,9
25-D _p (ng/mL)	30	29,2	13,70	46,9	10,0	65,7
1,25-D _p (pg/mL)	30	29,8	12,23	41,0	10,9	51,0
Ca _p (mg/dL)	86	11,7	1,01	8,6	9,4	14,2
Ca _m (mg/100 g)	43	2,6	1,04	39,9	0,3	4,5

Legenda: n = número de animais avaliados; DP = desvio-padrão; CV = coeficiente de variação; Mínimo = valor mínimo; Máximo = valor máximo; FAE = concentração de faeumelanina na pele; EUM = concentração de eumelanina na pele; MEL_T = concentração de melanina total na pele dada pela soma das concentrações de faeumelanina e eumelanina; 25-D_p = concentração de 25-hidróxi-vitamina D₃ no plasma; 1,25-D_p = concentração de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma; Ca_p = concentração de cálcio no plasma; e Ca_m = concentração de cálcio no músculo.

As concentrações dos metabólitos da vitamina D₃ no plasma tiveram médias menores e coeficientes de variação maiores em relação à maioria dos outros trabalhos comparados, os quais analisaram ambos os metabólitos do plasma usando o método Radioimunoensaio (RIA) precedido por extração via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Houve relatos de médias variando de 36,9 a 62,7 ng/mL e coeficientes de variação variando de 11,0 a 26,7% para as concentrações de 25-hidróxi-vitamina D₃ e de médias variando de 20,8 a 146,3 pg/mL e coeficientes de variação variando de 12,2 a 27,4% para as concentrações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ (FOOTE et al., 2004; HORST et al., 1981; HORST; LITTLEDIKE, 1982; MONTGOMERY et al., 2000, 2004a).

Dificuldade de comparar os resultados de dosagens dos metabólitos da vitamina D₃ no plasma tem sido relatada em humanos e atribuída às diferentes técnicas usadas na quantificação (HOLLIS; HORST, 2007; HOLLIS, 2008; SERTESER et al., 2012; WALLACE et al., 2010). Alguns trabalhos relatam que o método Imunoensaio de Eletroquimioluminescência (ECLIA), usado para determinar as concentrações de 25-hidróxi-vitamina D₃ no plasma dos animais neste trabalho, subestima os valores

medidos no plasma e soro de humanos quando comparados com o método RIA (CAVALIER et al., 2010; HEIJBOER et al., 2012; ONG et al., 2012; SNELLMAN et al., 2010), mas um único trabalho relatou uma boa concordância entre os dois métodos (LEINO et al., 2008). Por sua vez, as determinações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma, tanto neste experimento, como nos trabalhos comparados acima, foram mensuradas seguindo os mesmos protocolos e usando o método RIA (SHEPARD et al., 1979; HORST et al., 1981).

A importância do cálcio extracelular para as funções vitais dos animais como manutenção do tecido nervoso e contração do miocárdio (LITTLEDIKE; GOFF, 1987) poderia explicar a baixa variabilidade (8,6%) para as concentrações de cálcio no plasma. Por outro lado, as concentrações de cálcio no músculo apresentaram variação (39,9%) maior do que aquelas encontradas por outros autores. Médias variando de 9,2 a 11,0 mg/dL e coeficientes de variação variando de 1,6 a 9,8% para cálcio plasmático e médias variando de 0,9 a 12,3 mg/100 g e coeficientes de variação variando de 6,9 a 19,4% para cálcio muscular foram anteriormente encontradas em amostras de bovinos (CHO et al., 2006; KARGES et al., 2001; MONTGOMERY et al., 2004a; PEDREIRA et al., 2003; SWANEK et al., 1999; WHIPPLE et al., 1990). Na maioria dos trabalhos consultados, cálcio muscular foi estimado pelo método de absorção atômica, o qual tem alta especificidade para os metais, mesmo que muitas substâncias possam causar interferências aniônicas e catiônicas (NAKAMURA, 1973).

Médias e coeficientes de variação para as características de maciez e cor de carne nos diferentes tempos de maturação (Tabela 4) se encontraram próximas, com poucas exceções, àquelas observadas em outros trabalhos (Tabela 5) usando animais da raça Nelore, Tabapuã, Brahman e Brangus (CURI et al., 2010; GOMES et al., 2012; LOBO-JR. et al., 2012; MAZZUCCO et al., 2010; PFLANZER; FELICIO, 2011; PINTO et al., 2010, 2011; PRINGLE et al., 1997; RIBEIRO et al., 2012; RILEY et al., 2003; SHACKELFORD et al., 1991; SMITH et al., 2009). A razão dos valores de a^* e b^* (a^*/b^*) não foram avaliadas nos trabalhos citados acima e, por isso, médias e coeficientes de variação não foram comparados.

Tabela 4. Análises descritivas para as características de maciez e cor de carne em bovinos da raça Nelore

Variável	Dia	n	Média	DP	CV (%)	Mínimo	Máximo
MFI	1	86	55,6	13,76	24,8	29,7	102,4
	7	86	77,8	20,15	25,9	31,0	125,1
	14	86	99,5	20,34	20,5	55,7	142,3
FC (kg)	1	86	8,7	2,20	25,3	3,0	15,3
	7	86	7,4	1,58	21,3	3,8	12,6
	14	86	5,9	1,42	23,9	3,5	10,8
L^*	1	85	23,9	4,17	17,5	12,4	39,1
	7	86	30,9	3,40	11,0	17,5	41,2
	14	86	27,9	4,07	14,6	19,2	38,6
a^*	1	85	22,1	2,85	12,9	15,3	29,1
	7	86	17,9	3,56	19,9	10,5	27,0
	14	86	21,4	3,20	14,9	13,8	28,4
b^*	1	85	14,7	3,69	25,1	5,9	21,9
	7	86	16,5	3,70	22,4	9,5	24,5
	14	86	17,4	3,44	19,8	12,0	27,4
a^*/b^*	1	85	1,6	0,50	31,0	0,9	3,6
	7	86	1,2	0,40	34,8	0,6	2,4
	14	86	1,3	0,23	18,2	0,8	1,8

Legenda: DIA = dia de maturação; n = número de animais avaliados; DP = desvio-padrão; CV = coeficiente de variação; Mínimo = valor mínimo; Máximo = valor máximo; MFI = Índice de Fragmentação Miofibrilar; FC = força de cisalhamento; L^* = valores de L^* (luminosidade, variando do mais escuro ao mais claro); a^* = valores de a^* (cromaticidade, variando do verde ao vermelho); b^* = valores de b^* (cromaticidade, variando do azul ao amarelo); a^*/b^* = razão entre os valores de a^* e b^* (maiores valores indicam carne mais vermelha e menos descolorida).

A maior média para MFI aos 14 dias de maturação neste trabalho (Tabela 4), quando as estruturas celulares da carne estão bem fragilizadas, poderia ser um resultado da velocidade e/ou do aparelho usado durante a homogeneização das amostras (HOPKINS et al., 2000, 2004). Médias menores para os valores de L^* em todos os tempos e médias maiores para os valores de b^* nos dias um (1) e sete (7) de maturação (Tabela 4) quando comparados aos outros trabalhos (Tabela 5) poderiam estar associadas com as diferenças de maturidade dos animais, espessura de gordura da carcaça, declínio de pH e temperatura da carcaça e composição físico-química do músculo (FIEMS et al., 2000; ORELLANA et al., 2009; WULF; WISE, 1999).

Tabela 5. Médias e coeficientes de variação observados para as características de maciez e cor de carne em outros trabalhos usando bovinos da raça Nelore, Tabapuã, Brahman e Brangus

Variável	Dia	Média	CV (%)	Autores
MFI	1	35,4 a 53,9	17,7 a 38,1	Curi et al. (2010), Gomes et al. (2012), Riley et al. (2003), Shackelford et al. (1991)
	7	55,8 a 73,5	17,8 a 30,6	
	14	65,8 a 69,6	16,7 a 25,5	
FC (kg)	1	4,3 a 10,7	13,4 a 20,4	Lobo et al. (2012), Pinto et al. (2010), Pringle et al. (1997), Smith et al. (2009), Ribeiro et al. (2012)
	7	4,6 a 9,1	18,7 a 26,5	
	14	3,8 a 7,1	19,7 a 31,4	
L^*	1	31,4 a 38,5	8,3 a 8,9	Lobo et al. (2012), Mazzucco et al. (2010), Pinto et al. (2011), Pflanzner; Felicio (2011), Ribeiro et al. (2012)
	7	37,9 a 39,2	8,3 a 8,6	
	14	32,9 a 40,2	8,7 a 13,9	
a^*	1	15,0 a 20,0	6,1 a 17,6	Lobo et al. (2012), Mazzucco et al. (2010), Pinto et al. (2011), Pflanzner; Felicio (2011), Ribeiro et al. (2012)
	7	15,8 a 21,7	11,2 a 15,1	
	14	16,4 a 22,0	10,7 a 15,5	
b^*	1	3,8 a 13,4	10,7 a 47,6	Lobo et al. (2012), Mazzucco et al. (2010), Pinto et al. (2011), Pflanzner; Felicio (2011), Ribeiro et al. (2012)
	7	12,3 a 13,4	14,5 a 17,5	
	14	12,5 a 20,1	11,2 a 19,9	

Legenda: DIA = dia de maturação; CV = coeficiente de variação; MFI = Índice de Fragmentação Miofibrilar; FC = força de cisalhamento; L^* = valores de L^* (luminosidade, variando do mais escuro ao mais claro); a^* = valores de a^* (cromaticidade, variando do verde ao vermelho); b^* = valores de b^* (cromaticidade, variando do azul ao amarelo).

6.3.2. Análises de correlação e regressão

6.3.2.1. Relação entre as frações de melanina na pele

As concentrações de faeumelanina foram levemente correlacionadas com as concentrações de eumelanina ($r=-0,23$; $P=0,03$) e melanina total ($r=0,23$; $P=0,04$), enquanto as concentrações de eumelanina foram altamente correlacionadas com as concentrações de melanina total ($r=0,90$; $P<0,01$) (Tabela 6). Tais correlações indicam que as concentrações de faeumelanina são menores à medida que maiores concentrações de eumelanina estão presentes na pele e, que a fração faeumelanina contribui menos do que a fração eumelanina para as concentrações de melanina total. Porém, concentrações maiores de ambas as frações estão associadas com as maiores concentrações de melanina total.

Tabela 6. Estimativas dos coeficientes de correlação entre as concentrações de faeumelanina, eumelanina e melanina total na pele de bovinos da raça Nelore

Variável	FAE (n=86)	EUM (n=86)	MEL _T (n=86)
FAE	1,00	-0,23	0,23
EUM		1,00	0,90
MEL _T			1,00

Legenda: FAE = concentração de faeumelanina na pele; EUM = concentração de eumelanina na pele; e MEL_T = concentração de melanina total na pele dada pela soma das concentrações de faeumelanina e eumelanina. Coeficientes de correlação em negrito foram significativos ($P \leq 0,04$).

Estas relações encontradas entre as frações de melanina na pele de bovinos Nelore estão em acordo com aquelas encontradas na pele de humanos. Pessoas com pele escura de origem africana e indiana tiveram maiores concentrações de eumelanina do que faeumelanina na pele, sendo eumelanina a fração que mais contou para a concentração de melanina total (ALALUF et al., 2002). Em bovinos, a pele dos animais de raça *Bos indicus* foram mais pigmentadas e escuras do que a pele dos animais de raça *Bos taurus* (SILVA et al., 2001; YANG, 1952), sugerindo que um componente genético poderia explicar pelo menos em parte as diferenças nas concentrações de melanina. Entretanto, diferenças de pigmentação foram também encontradas na pele de animais de duas raças *Bos taurus* e atribuídas às diferenças no grau de exposição dos animais à radiação solar, o qual estimula a síntese de melanina na pele (AMAKIRI, 1979).

Relações entre as concentrações de faeumelanina e eumelanina foram melhoradas quando modelos de regressão quadráticos ($P < 0,01$) foram testados (Tabela 7). A porcentagem de variação total das concentrações de faeumelanina explicada pelas concentrações de eumelanina foi melhorada consideravelmente (R^2 foi de 5,3 para 45,5%) quando uma equação curvilínea foi usada ($\hat{Y} = 8,68 - 0,94X + 0,03X^2$). Por sua vez, a porcentagem de variação total das concentrações de eumelanina explicadas pelas concentrações de faeumelanina aumentou de 5,3 para 16,5% ao usar uma equação quadrática ($\hat{Y} = 8,77 + 1,62X - 0,19X^2$). Estas diferenças na porcentagem de variação total explicadas nas duas frações de melanina com modelos de regressão quadráticos apontam que as concentrações de faeumelanina são mais dependentes das concentrações de eumelanina do que o inverso.

Tabela 7. Estimativas de coeficientes de regressão, valores de probabilidade (P) e coeficientes de determinação múltiplo (R^2) para as concentrações de faeumelanina, eumelanina e melanina total na pele de bovinos da raça Nelore

Variável		Linear				Quadrática				
DEP	INDEP	P	β_0	β_1	R^2 (%)	P	β_0	β_1	β_2	R^2 (%)
FAE	EUM	0,03	4,32	-0,10	5,3	<0,01	8,68	-0,94	0,03	45,5
EUM	FAE	0,03	12,92	-0,50	5,3	<0,01	8,77	1,62	-0,19	16,5
MEL _T	FAE	0,04	12,92	0,50	5,1	<0,01	8,77	2,62	-0,19	16,4
MEL _T	EUM	<0,01	4,32	0,90	80,4	<0,01	8,68	0,06	0,03	88,7

Legenda: DEP = variável dependente; INDEP = variável independente; FAE = concentração de faeumelanina na pele; EUM = concentração de eumelanina na pele; e MEL_T = concentração de melanina total na pele dada pela soma das concentrações de faeumelanina e eumelanina; P = valores de probabilidade para os modelos testados (linear e quadrático); e R^2 = coeficiente de determinação. Coeficientes de regressão (β_0 = intercepto; β_1 = linear; β_2 = quadrático) em negrito foram significativos ($P \leq 0,04$).

Dentre as duas frações de melanina analisadas, a eumelanina foi a fração que mais explicou a variação de melanina total na pele (Tabela 7). A melhor equação para prever e explicar as concentrações de melanina total na pele usando as concentrações de faeumelanina foi a quadrática ($\hat{Y} = 8,77 + 2,62X - 0,19X^2$), uma vez que o coeficiente de determinação (R^2) aumentou de 5,1 para 16,4%. Todavia, a melhor equação para prever e explicar as concentrações de melanina total na pele usando as concentrações de eumelanina foi a linear ($\hat{Y} = 4,32 + 0,90X$), uma vez que o aumento no coeficiente de determinação não foi de alta magnitude e que o coeficiente de regressão β_1 para o modelo quadrático não diferiu estatisticamente de zero. A grande porcentagem de variação total de melanina total explicada por eumelanina (R^2 de 80,4%) confirma a forte associação encontrada entre as duas características pela análise de correlação ($r=0,90$; Tabela 6).

6.3.2.2. Relação das frações de melanina na pele com as concentrações dos metabólitos da vitamina D₃ no plasma e cálcio plasmático e muscular

As concentrações de faeumelanina na pele não tiveram relação ($P \geq 0,31$) com as concentrações de 25-hidróxi-vitamina D₃ plasmático e de cálcio no plasma e músculo (Tabela 8). Porém, correlação negativa moderada entre as concentrações de faeumelanina na pele e 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ plasmático foi detectada ($r=-0,37$; $P=0,04$). Isto indica que maiores concentrações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ foram observadas no plasma quando menores concentrações de faeumelanina estavam presentes na pele. Todavia, nenhuma correlação foi observada ($P \geq 0,25$) entre as

concentrações de eumelanina e melanina total na pele com as concentrações dos metabólitos da vitamina D₃ no plasma e cálcio plasmático e muscular.

Tabela 8. Estimativas dos coeficientes de correlação entre as concentrações de faeumelanina, eumelanina e melanina total na pele com as concentrações dos metabólitos da vitamina D₃ no plasma e cálcio plasmático e muscular em bovinos da raça Nelore

Variável	FAE (n=86)	EUM (n=86)	MEL _T (n=86)
25-D _p (n=30)	-0,08	0,00	-0,03
1,25-D _p (n=30)	-0,37	-0,04	-0,22
Ca _p (n=86)	0,02	0,09	0,10
Ca _m (n=43)	0,16	-0,14	-0,07

Legenda: FAE = concentração de faeumelanina na pele; EUM = concentração de eumelanina na pele; e MEL_T = concentração de melanina total na pele dada pela soma das concentrações de faeumelanina e eumelanina; 25-D_p = concentração de 25-hidróxi-vitamina D₃ no plasma; 1,25-D_p = concentração de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma; Ca_p = concentração de cálcio no plasma; e Ca_m = concentração de cálcio no músculo. Coeficientes de correlação em negrito foram significativos (P=0,04).

Maiores concentrações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma poderia ser um resultado da maior fotossíntese de vitamina D₃ sob a pele menos pigmentada (NORMAN, 1998; HARRIS; DAWSON-HUGHES, 1998; ZADSHIR et al., 2005). Desta forma, parece ser pouco provável encontrar maiores concentrações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma sem observar também maiores concentrações dos seus precursores vitamina D₃ e 25-hidróxi-vitamina D₃ no plasma. Isto foi notado com a ausência de relações entre as concentrações de faeumelanina na pele e 25-hidróxi-vitamina D₃ no plasma (Tabela 8). Maiores concentrações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ plasmático em pessoas com pele clara e origem europeia do que em pessoas escuras e origem africana tem sido observada quando acompanhada de maiores concentrações de 25-hidróxi-vitamina D₃ plasmático (ENGELMAN et al., 2008).

Por outro lado, há um relato que observou maiores concentrações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma de pessoas normais com pele escura quando comparado com aquelas com pele clara, mesmo que concentrações menores de 25-hidróxi-vitamina D₃ plasmático foram também observadas (BELL et al., 1985). Neste caso, a explicação dada para as maiores concentrações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma foi as maiores concentrações do hormônio da paratireoide, o qual parece estar relacionado com a maior massa óssea observada geralmente em pessoas de pele escura. Outro trabalho também verificou concentrações menores de 25-hidróxi-vitamina D₃ no plasma e maiores do hormônio da paratireoide no soro em pessoas com

pele escura do que com pele clara, mas nenhuma diferença foi observada nas concentrações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ plasmático (HARRIS; DAWSON-HUGHES, 1998).

A análise de regressão não detectou melhoras nas relações entre as concentrações de faeumelanina, eumelanina e melanina total com as concentrações dos metabólitos da vitamina D₃ plasmático e cálcio no plasma e músculo (Tabela 9). No entanto, as concentrações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma confirmaram depender das concentrações de faeumelanina na pele de uma forma linear ($\hat{Y} = 36,54 - 1,87X$). A porcentagem de variação total das concentrações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma explicada pelas concentrações de faeumelanina foi de 13,6%.

Tabela 9. Estimativas de coeficientes de regressão, valores de probabilidade (P) e coeficientes de determinação múltiplo (R²) para as concentrações dos metabólitos da vitamina D₃ no plasma e cálcio plasmático e muscular de bovinos da raça Nelore em função das concentrações de faeumelanina, eumelanina e melanina total na pele

Variável		Linear				Quadrática				
DEP	INDEP	P	β_0	β_1	R ² (%)	P	β_0	β_1	β_2	R ² (%)
25-D _p	FAE	0,67	30,82	-0,46	0,6	0,40	41,99	-5,55	0,38	6,6
	EUM	0,98	29,03	0,01	0,0	0,92	25,90	0,60	-0,02	0,6
	MEL _T	0,86	30,44	-0,09	0,1	0,71	11,72	2,11	-0,06	2,5
1,25-D _p	FAE	0,05	36,54	-1,87	13,6	0,11	41,75	-4,25	0,18	15,2
	EUM	0,82	30,92	-0,10	0,2	0,12	17,64	2,37	-0,09	14,4
	MEL _T	0,25	37,31	-0,52	4,7	0,38	21,37	1,35	-0,05	6,9
Ca _p	FAE	0,85	11,68	0,01	0,0	0,23	11,13	0,29	-0,02	3,4
	EUM	0,38	11,46	0,02	0,9	0,21	12,07	-0,09	0,00	3,7
	MEL _T	0,34	11,35	0,02	1,1	0,22	12,64	-0,14	0,00	3,6
Ca _m	FAE	0,31	2,34	0,07	2,6	0,51	2,05	0,20	-0,01	3,3
	EUM	0,36	2,95	-0,03	2,0	0,37	3,40	-0,12	0,00	4,9
	MEL _T	0,64	2,86	-0,02	0,5	0,19	4,99	-0,27	0,01	8,0

Legenda: DEP = variável dependente; INDEP = variável independente; FAE = concentração de faeumelanina na pele; EUM = concentração de eumelanina na pele; e MEL_T = concentração de melanina total na pele dada pela soma das concentrações de faeumelanina e eumelanina; 25-D_p = concentração de 25-hidróxi-vitamina D₃ no plasma; 1,25-D_p = concentração de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma; Ca_p = concentração de cálcio no plasma; e Ca_m = concentração de cálcio no músculo; P = valores de probabilidade para os modelos testados (linear e quadrático); e R² = coeficiente de determinação. Coeficientes de regressão (β_0 = intercepto; β_1 = linear; β_2 = quadrático) em negrito foram significativos (P≤0,05).

6.3.2.3. Relação das concentrações dos metabólitos da vitamina D₃ no plasma com as concentrações de cálcio plasmático e muscular

Nenhuma relação ($P \geq 0,10$) foi encontrada entre as concentrações de 25-hidróxi-vitamina D₃ e 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma com as concentrações de cálcio tanto plasmático quanto muscular (Tabela 10).

Tabela 10. Estimativas dos coeficientes de correlação entre as concentrações dos metabólitos da vitamina D₃ no plasma com as concentrações de cálcio plasmático e muscular em bovinos da raça Nelore

Variável	25-D _p (n=30)	1,25-D _p (n=30)
Ca _p (n=86)	-0,16 (n=30)	-0,30 (n=30)
Ca _m (n=43)	-0,13 (n=20)	-0,24 (n=20)

Legenda: 25-D_p = concentração de 25-hidróxi-vitamina D₃ no plasma; 1,25-D_p = concentração de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma; Ca_p = concentração de cálcio no plasma; e Ca_m = concentração de cálcio no músculo. Nenhum coeficiente de correlação significativo foi detectado ($P \geq 0,10$).

No geral, não é possível inferir se melanina e suas frações na pele são os principais responsáveis pelas mudanças nas concentrações dos metabólitos da vitamina D₃ e, conseqüentemente, nas concentrações de cálcio plasmático e muscular. Uma relação foi observada entre as concentrações de faeumelanina na pele com as concentrações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma, mas não com as concentrações de 25-hidróxi-vitamina D₃ plasmática (Tabela 8).

Concentrações maiores de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma poderiam estar relacionadas às maiores concentrações do hormônio da paratireoide (BELL et al., 1985; HARRIS; DAWSON-HUGHES, 1998), que geralmente é liberado na corrente sanguínea quando concentrações de cálcio plasmático são menores (LITTLEDIKE; GOFF, 1987; OMDAHL et al., 2002). Todavia, correlações entre concentrações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma com concentrações de cálcio plasmático não foram também detectadas (Tabela 10). Neste caso, uma relação pontual entre as concentrações de faeumelanina na pele com as concentrações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma poderia ter ocorrido. A grande variabilidade encontrada para as concentrações de faeumelanina (Tabela 3) poderia ter colaborado para esta relação significativa.

As concentrações de cálcio no plasma e no músculo não foram dependentes das concentrações de 25-hidróxi-vitamina D₃ e 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma, mesmo quando modelos de regressão quadráticos foram testados (Tabela 11). Houve

melhoras na porcentagem de variação total das concentrações de cálcio muscular explicada pelas concentrações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma, porém o modelo quadrático de regressão não foi significativo (P=0,14).

Tabela 11. Estimativas de coeficientes de regressão, valores de probabilidade (P) e coeficientes de determinação múltiplo (R²) para as concentrações de cálcio plasmático e muscular de bovinos da raça Nelore em função das concentrações dos metabólitos da vitamina D₃ no plasma

Variável		Linear				Quadrática				
DEP	INDEP	P	β_0	β_1	R ² (%)	P	β_0	β_1	β_2	R ² (%)
Ca _p	25-D _p	0,39	12,12	-0,01	2,7	0,47	12,86	-0,06	0,00	5,5
	1,25-D _p	0,10	12,52	-0,02	9,3	0,27	12,38	-0,01	0,00	9,3
Ca _m	25-D _p	0,59	2,69	-0,01	1,6	0,67	2,04	0,04	0,00	4,7
	1,25-D _p	0,32	2,92	-0,02	5,6	0,14	4,93	-0,17	0,00	20,9

Legenda: DEP = variável dependente; INDEP = variável independente; 25-D_p = concentração de 25-hidróxi-vitamina D₃ no plasma; 1,25-D_p = concentração de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma; Ca_p = concentração de cálcio no plasma; e Ca_m = concentração de cálcio no músculo; P = valores de probabilidade para os modelos testados (linear e quadrático); e R² = coeficiente de determinação. Nenhum coeficiente de regressão (β_0 = intercepto; β_1 = linear; β_2 = quadrático) foi significativo (P≥0,10).

6.3.2.4. Relação das concentrações de cálcio no plasma e no músculo com maciez e cor de carne

As concentrações de cálcio plasmático foram correlacionadas com o MFI (r=0,24; P=0,03) e força de cisalhamento (r=-0,19; P=0,07) ao dia sete (7) de maturação, enquanto as concentrações de cálcio muscular foram correlacionadas com MFI ao dia um (1) de maturação (r=0,29; P=0,06) e força de cisalhamento ao dia 14 de maturação (r=-0,30; P=0,05) (Tabela 12).

Além da baixa correlação entre as concentrações de cálcio plasmático com os valores de L* no dia 14 de maturação (r=0,24; P=0,03) e a*/b* no dia um (1) de maturação (r=-0,18; P=0,08), foi também verificadas moderadas correlações entre as concentrações de cálcio muscular com os valores de L* (r=0,31; P=0,04) e a* (r=-0,37; P=0,02) no dia sete (7) de maturação e com os valores de b* no dia 14 de maturação (r=0,34; P=0,03) (Tabela 12).

Tabela 12. Estimativas dos coeficientes de correlação entre as concentrações de cálcio plasmático e muscular com maciez e cor de carne em bovinos da raça Nelore

Variável	Dia	Ca _p (n=86)	Ca _m (n=43)
MFI	1	0,07	0,29
	7	0,24	0,23
	14	0,12	0,23
FC	1	0,08	0,05
	7	-0,19	-0,03
	14	-0,12	-0,30
<i>L</i> *	1	0,03	-0,01
	7	0,04	0,31
	14	0,24	0,06
<i>a</i> *	1	0,04	0,00
	7	0,03	-0,37
	14	-0,15	0,05
<i>b</i> *	1	0,17	0,04
	7	-0,03	0,00
	14	-0,13	0,34
<i>a</i> */ <i>b</i> *	1	-0,18	-0,07
	7	0,07	-0,25
	14	0,05	-0,23

Legenda: DIA = dia de maturação; Ca_p = concentração de cálcio no plasma; e Ca_m = concentração de cálcio no músculo; MFI = Índice de Fragmentação Miofibrilar; FC = força de cisalhamento; *L** = valores de *L** (luminosidade, variando do mais escuro ao mais claro); *a** = valores de *a** (cromaticidade, variando do verde ao vermelho); *b** = valores de *b** (cromaticidade, variando do azul ao amarelo); *a**/*b** = razão entre os valores de *a** e *b** (maiores valores indicam carne mais vermelha e menos descolorida). Coeficientes de correlação em negrito foram significativos (P≤0,08).

As correlações encontradas indicam que maiores concentrações de cálcio no plasma e músculo melhoram maciez de carne, resultando em maior fragmentação miofibrilar e menores valores de força de cisalhamento. Durante a maturação de carne, o processo de degradação das proteínas é atribuído à ação das enzimas calpaínas, que são dependentes de cálcio (DRANSFIELD, 1992; KOOHMARAIE; GEESINK, 2006). Maiores concentrações de cálcio no plasma e músculo poderiam então melhorar a ação das enzimas calpaínas e, conseqüentemente, a maciez de carne (SWANEK et al., 1999; WHIPPLE; KOOHMARAIE, 1993).

Paradoxalmente à melhora na maciez de carne, um efeito detrimental sobre a capacidade de retenção de água e estabilidade oxidativa da carne pareceu ocorrer devido às maiores concentrações de cálcio no plasma e músculo. Isto foi percebido

com os maiores valores de L^* (maior perda de água) e os menores valores de a^* e a^*/b^* (maior descoloração) observados na carne à medida que maiores concentrações de cálcio no plasma e músculo foram encontradas. Somente os valores de b^* no dia 14 de maturação não apontaram um progresso na oxidação de carne em função do aumento nas concentrações de cálcio. Maiores concentrações de cálcio no músculo já foram relacionadas anteriormente com diminuição na capacidade de retenção de água e aumento da oxidação por radicais livres, resultando em carne com valores maiores de L^* e menores de a^* e b^* (KUCHENMEISTER et al., 2000; LAWRENCE et al., 2003; LOBO-JR. et al., 2012).

Todas as características de maciez de carne que foram associadas com as concentrações de cálcio plasmático e muscular mantiveram uma relação linear após a análise de regressão testando modelos lineares e quadráticos (Tabela 13). A porcentagem de variação total de MFI e força de cisalhamento ao dia sete (7) de maturação explicada pelas concentrações de cálcio plasmático foram respectivamente 5,6 e 3,7%. As equações lineares para prever MFI e força de cisalhamento ao dia sete (7) de maturação usando as concentrações de cálcio plasmático foram $\hat{Y} = 22,39 + 4,73X$ e $\hat{Y} = 11,00 - 0,31X$, respectivamente. Por sua vez, a porcentagem de variação total de MFI ao dia um (1) de maturação e força de cisalhamento ao dia 14 de maturação explicada pelas concentrações de cálcio muscular foram de 8,5 e 8,8% usando as equações lineares $\hat{Y} = 49,43 + 3,28X$ e $\hat{Y} = 6,74 - 0,39X$, respectivamente.

Tabela 13. Estimativas de coeficientes de regressão, valores de probabilidade (P) e coeficientes de determinação múltiplo (R^2) para maciez e cor de carne de bovinos da raça Nelore em função das concentrações de cálcio plasmático e muscular (Continua)

Variável		Linear				Quadrática				
DEP	INDEP	P	β_0	β_1	R^2 (%)	P	β_0	β_1	β_2	R^2 (%)
MFI _{dia 1}	Ca _p	0,50	43,80	1,00	0,5	0,26	279,90	-39,52	1,73	3,2
	Ca _m	0,06	49,43	3,28	8,5	0,16	52,00	0,96	0,44	8,7
MFI _{dia 7}	Ca _p	0,03	22,39	4,73	5,6	0,09	21,28	4,92	-0,01	5,6
	Ca _m	0,13	70,16	4,18	5,4	0,32	74,26	0,48	0,71	5,6
MFI _{dia 14}	Ca _p	0,26	70,48	2,47	1,5	0,29	-184,47	46,24	-1,86	2,9
	Ca _m	0,13	86,84	4,49	5,5	0,26	96,64	-4,37	1,69	6,5

Legenda: DEP = variável dependente; INDEP = variável independente; Ca_p = concentração de cálcio no plasma; e Ca_m = concentração de cálcio no músculo; MFI = Índice de Fragmentação Miofibrilar; FC = força de cisalhamento; L^* = valores de L^* (luminosidade, variando do mais escuro ao mais claro); a^* = valores de a^* (cromaticidade, variando do verde ao vermelho); b^* = valores de b^* (cromaticidade, variando do azul ao amarelo); a^*/b^* = razão entre os valores de a^* e b^* (maiores valores indicam carne mais vermelha e menos descolorida); DIA 1, 7 e 14 = dias 1, 7 e 14 de maturação; P = valores de probabilidade para os modelos testados (linear e quadrático); e R^2 = coeficiente de determinação. Coeficientes de regressão (β_0 = intercepto; β_1 = linear; β_2 = quadrático) em negrito foram significativos ($P \leq 0,08$).

Tabela 13. Estimativas de coeficientes de regressão, valores de probabilidade (P) e coeficientes de determinação múltiplo (R^2) para maciez e cor de carne de bovinos da raça Nelore em função das concentrações de cálcio plasmático e muscular (Continuação)

Variável		Linear				Quadrática				
DEP	INDEP	P	β_0	β_1	R^2 (%)	P	β_0	β_1	β_2	R^2 (%)
FC _{dia1}	Ca _p	0,45	6,61	0,18	0,7	0,70	-2,81	1,80	-0,07	0,8
	Ca _m	0,73	7,71	0,11	0,3	0,84	6,94	0,81	-0,13	0,8
FC _{dia7}	Ca _p	0,07	11,00	-0,31	3,7	0,20	12,98	-0,64	0,01	3,7
	Ca _m	0,84	7,38	-0,05	0,1	0,75	6,53	0,73	-0,15	1,4
FC _{dia14}	Ca _p	0,28	7,88	-0,17	1,4	0,55	11,51	-0,79	0,03	1,4
	Ca _m	0,05	6,74	-0,39	8,8	0,14	6,23	0,06	-0,09	9,4
L* _{dia1}	Ca _p	0,75	22,19	0,15	0,1	0,12	119,50	-16,56	0,71	5,1
	Ca _m	0,97	23,93	-0,02	0,0	0,83	21,86	1,85	-0,36	0,9
L* _{dia7}	Ca _p	0,71	29,29	0,14	0,2	0,39	80,53	-8,66	0,37	2,2
	Ca _m	0,04	27,38	1,10	9,5	0,13	27,50	0,99	0,02	9,5
L* _{dia14}	Ca _p	0,03	16,66	0,96	5,6	0,01	111,30	-15,28	0,69	10,5
	Ca _m	0,68	29,02	0,23	0,4	0,87	28,09	1,07	-0,16	0,7
a* _{dia1}	Ca _p	0,69	20,64	0,12	0,2	0,89	29,39	-1,38	0,06	0,3
	Ca _m	0,98	22,63	-0,01	0,0	1,00	22,74	-0,11	0,02	0,0
a* _{dia7}	Ca _p	0,81	16,83	0,09	0,0	0,68	51,27	-5,82	0,25	0,9
	Ca _m	0,02	23,20	-1,15	13,4	0,05	21,73	0,17	-0,25	14,3
a* _{dia14}	Ca _p	0,17	27,00	-0,47	2,2	0,24	-9,14	5,73	-0,26	3,4
	Ca _m	0,74	19,86	0,15	0,3	0,69	18,09	1,75	-0,31	1,8
b* _{dia1}	Ca _p	0,13	7,60	0,61	2,7	0,17	54,03	-7,37	0,34	4,2
	Ca _m	0,78	16,09	0,09	0,2	0,71	14,78	1,28	-0,23	1,7
b* _{dia7}	Ca _p	0,81	17,66	-0,10	0,1	0,80	-8,91	4,46	-0,19	0,5
	Ca _m	0,97	14,15	-0,02	0,0	0,78	12,66	1,33	-0,26	1,2
b* _{dia14}	Ca _p	0,24	22,50	-0,44	1,6	0,49	13,54	1,10	-0,06	1,7
	Ca _m	0,03	13,35	0,59	11,4	0,02	11,26	2,48	-0,36	17,0
a*/b* _{dia1}	Ca _p	0,08	2,68	-0,09	3,4	0,15	-2,74	0,84	-0,04	4,5
	Ca _m	0,66	1,42	-0,01	0,5	0,55	1,54	-0,12	0,02	3,0
a*/b* _{dia7}	Ca _p	0,50	0,81	0,03	0,5	0,43	5,96	-0,85	0,04	2,0
	Ca _m	0,11	1,67	-0,08	6,2	0,26	1,60	-0,01	-0,01	6,5
a*/b* _{dia14}	Ca _p	0,67	1,14	0,01	0,2	0,89	0,51	0,12	-0,01	0,3
	Ca _m	0,13	1,49	-0,05	5,4	0,29	1,57	-0,12	0,01	5,9

Legenda: DEP = variável dependente; INDEP = variável independente; Ca_p = concentração de cálcio no plasma; e Ca_m = concentração de cálcio no músculo; MFI = Índice de Fragmentação Miofibrilar; FC = força de cisalhamento; L* = valores de L* (luminosidade, variando do mais escuro ao mais claro); a* = valores de a* (cromaticidade, variando do verde ao vermelho); b* = valores de b* (cromaticidade, variando do azul ao amarelo); a*/b* = razão entre os valores de a* e b* (maiores valores indicam carne mais vermelha e menos descolorida); DIA 1, 7 e 14 = dias 1, 7 e 14 de maturação; P = valores de probabilidade para os modelos testados (linear e quadrático); e R^2 = coeficiente de determinação. Coeficientes de regressão (β_0 = intercepto; β_1 = linear; β_2 = quadrático) em negrito foram significativos ($P \leq 0,08$).

Entre aquelas variáveis da cor de carne associadas com as concentrações de cálcio plasmático e muscular, somente os valores de L^* no dia 14 de maturação regredido em função das concentrações de cálcio plasmático tiveram uma porcentagem de variação total explicada (R^2 foi de 5,6 para 10,5%) quando uma equação curvilínea ($\hat{Y} = 111,30 - 15,28X + 0,69X^2$) foi usada (Tabela 13). A descoloração de carne, medido pela razão dos valores de a^* e b^* , no dia 1 de maturação foi explicada (R^2 de 3,4%) pelas concentrações de cálcio plasmático usando uma equação linear $\hat{Y} = 2,68 - 0,09X$. As concentrações de cálcio muscular explicaram 9,5; 13,4 e 11,4% da variação observada nos valores de L^* e a^* ao dia sete (7) de maturação e nos valores de b^* ao dia 14 de maturação, respectivamente. Nestes casos, as equações lineares usadas para predizer os valores de L^* e a^* ao dia sete (7) de maturação e os valores de b^* ao dia 14 de maturação foram $\hat{Y} = 27,38 + 1,10X$, $\hat{Y} = 23,20 - 1,15X$ e $\hat{Y} = 13,35 + 0,59X$, respectivamente.

6.3.2.5. Relação das frações de melanina na pele e das concentrações dos metabólitos da vitamina D₃ plasmático com maciez e cor de carne

As concentrações de faeumelanina foram positivamente correlacionadas com os valores de MFI ao dia um (1) de maturação ($r=0,23$; $P=0,03$), enquanto as concentrações de eumelanina ($r=-0,23$; $P=0,03$) e melanina total ($r=-0,20$; $P=0,06$) foram negativamente correlacionadas com os valores de força de cisalhamento medidos também ao dia um (1) de maturação (Tabela 14). As concentrações de melanina total na pele foram também correlacionadas com os valores de força de cisalhamento aos 14 dias ($r=-0,22$; $P=0,04$). Por sua vez, as concentrações de 25-hidróxi-vitamina D₃ no plasma apresentaram correlações moderadas e positivas com os valores de MFI ao dia sete (7) ($r=0,34$; $P=0,06$) e 14 ($r=0,41$; $P=0,02$) de maturação.

Com relação à cor de carne, as concentrações de faeumelanina foram correlacionadas negativamente com os valores de L^* ($r=0,34$; $P=0,06$) e b^* no dia sete (7) de maturação e com os valores de a^* e b^* no dia 14 de maturação e positivamente com os valores de a^* e a^*/b^* no dia sete (7) de maturação (Tabela 14). As concentrações de eumelanina e melanina total na pele foram correlacionadas positivamente com os valores de L^* ($P\leq 0,07$) e negativamente com os valores de a^* , b^* e a^*/b^* ($P\leq 0,05$), independente do dia de maturação. E, concentrações de 25-hidróxi-vitamina D₃ no plasma apresentaram correlações negativas com os valores de L^* ($P=0,08$) e correlações positivas com os valores de a^* , b^* e a^*/b^* ($P\leq 0,08$),

independente do dia de maturação. As concentrações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ não foram correlacionadas ($P \geq 0,23$) com nenhuma característica de maciez e cor de carne.

Tabela 14. Estimativas dos coeficientes de correlação entre as concentrações das frações de melanina na pele e dos metabólitos da vitamina D₃ no plasma com maciez e cor de carne em bovinos da raça Nelore

Variável	Dia	FAE (n=86)	EUM (n=86)	MEL _T (n=86)	25-D _p (n=30)	1,25-D _p (n=30)
MFI	1	0,23	-0,09	0,01	0,04	0,06
	7	0,18	-0,02	0,06	0,34	0,04
	14	0,05	0,13	0,15	0,41	-0,02
FC	1	0,07	-0,23	-0,20	0,06	0,04
	7	-0,02	-0,16	-0,17	0,02	0,19
	14	-0,11	-0,17	-0,22	-0,04	-0,15
L *	1	-0,01	0,20	0,20	-0,07	0,23
	7	-0,21	0,23	0,14	0,01	0,03
	14	0,17	0,15	0,23	-0,33	0,06
a *	1	0,17	-0,29	-0,21	0,02	-0,13
	7	0,37	-0,18	-0,01	-0,01	0,05
	14	-0,24	-0,14	-0,25	0,38	-0,16
b *	1	0,09	0,06	0,10	-0,27	0,08
	7	-0,32	0,04	-0,11	0,01	-0,17
	14	-0,25	-0,16	-0,27	0,32	-0,12
a*/b *	1	-0,07	-0,22	-0,25	0,40	-0,14
	7	0,40	-0,13	0,05	-0,04	0,07
	14	0,06	0,04	0,07	0,00	0,03

Legenda: DIA = dia de maturação; FAE = concentração de faeumelanina na pele; EUM = concentração de eumelanina na pele; e MEL_T = concentração de melanina total na pele dada pela soma das concentrações de faeumelanina e eumelanina; 25-D_p = concentração de 25-hidróxi-vitamina D₃ no plasma; 1,25-D_p = concentração de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma; MFI = Índice de Fragmentação Miofibrilar; FC = força de cisalhamento; L* = valores de L* (luminosidade, variando do mais escuro ao mais claro); a* = valores de a* (cromaticidade, variando do verde ao vermelho); b* = valores de b* (cromaticidade, variando do azul ao amarelo); a*/b* = razão entre os valores de a* e b* (maiores valores indicam carne mais vermelha e menos descolorida). Coeficientes de correlação em negrito foram significativos ($P \leq 0,08$).

De início, é possível verificar que as concentrações de melanina total e suas frações na pele e 25-hidróxi-vitamina D₃ no plasma pareceram influenciar positivamente a maciez de carne. Maior fragmentação e menores valores de força de cisalhamento foram notados quando maiores concentrações de melanina total e suas frações na pele e 25-hidróxi-vitamina D₃ no plasma foram observados. No entanto, ao analisar as variáveis de cor, é possível notar que as concentrações de faeumelanina na

pele e 25-hidróxi-vitamina D₃ no plasma foram benéficas, mas que as concentrações de eumelanina e melanina total foram detrimenais.

As concentrações de faeumelanina na pele não poderiam ter algum efeito benéfico sobre maciez e cor de carne explicada pela correlação observada com as concentrações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma ($r=-0,37$; Tabela 8). Primeiro, porque menores concentrações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma foram observadas quando maiores concentrações de faeumelanina foram também verificadas na pele. Neste caso, não haveria explicação para a maior fragmentação miofibrilar encontrada na carne daqueles animais com maiores concentrações de faeumelanina na pele, pois o que se verifica normalmente é uma melhora na maciez com o aumento da concentração de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma, e não com a sua diminuição (MONTGOMERY et al., 2000, 2004b; FOOTE et al., 2004). Segundo, porque as concentrações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma não tiveram nenhuma relação com maciez e cor de carne (Tabela 14).

Melhores relações das concentrações de faeumelanina e piores relações das concentrações de eumelanina e melanina total com cor de carne poderia ser atribuída à maior estabilidade oxidativa na carne dos animais com maiores concentrações de faeumelanina. Pele de pessoa negra é mais protegida contra os raios ultravioletas do que pele de pessoa branca, devido as maiores concentrações de eumelanina na pele (BRENNER; HEARING, 2008). A fração eumelanina parece mobilizar maiores concentrações de antioxidantes para neutralizar os radicais livres dos processos oxidativos na pele, enfraquecendo assim o sistema de defesa antioxidante em outras partes do corpo (GALVAN; ALONSO-ALVAREZ, 2009; HORAK et al., 2010). Desta forma, menores concentrações de antioxidantes presentes no músculo dos animais com maiores concentrações de eumelanina e melanina total poderia ser uma explicação para as maiores perdas de água e oxidação na carne daqueles animais, resultando assim em piores variáveis de cor.

Durante estresse oxidativo, o mecanismo endógeno de proteção como a apoptose pode ocorrer em maior frequência (BRENNER; HEARING, 2008), o que poderia resultar na melhora de maciez (GUILLEMIN et al., 2012; LAVILLE et al., 2009; POLATI et al., 2012) observada na carne dos animais com maiores concentrações de eumelanina e melanina total na pele. A melhora na maciez de carne em animais com maiores concentrações de faeumelanina seria então o resultado de maior atividade de

calpaínas em uma carne menos oxidada, o que também confere uma carne com melhor cor (ROWE et al., 2004ab).

Já, as maiores concentrações de 25-hidróxi-vitamina D₃ no plasma não poderiam alterar maciez de carne por modificar as concentrações de cálcio no plasma e músculo, uma vez que nenhuma correlação foi observada entre aquelas características (Tabela 10). Há relatos de que a maioria das células no corpo, incluindo a muscular, não só tem um receptor de vitamina D (*VDR*), mas também a capacidade de converter 25-hidróxi-vitamina D₃ em 1,25-hidróxi-vitamina D₃ (HOLICK, 2013). Alguns efeitos tais como aumento de cálcio intracelular e apoptose foram reportados para vitamina D₃ e seus metabólitos (CAPIATI et al., 2000; HOLICK, 2013; WALTERS et al., 1987). Melhoras em maciez de carne também foram observadas quando maiores concentrações de vitamina D₃ e/ou seus metabólitos foram verificadas no plasma (FOOTE et al., 2004; MONTGOMERY et al., 2000, 2004b). As maiores concentrações de 25-hidróxi-vitamina D₃ no plasma parecem também ter um efeito benéfico para as variáveis de cor, já que uma menor perda de água e maior coloração foram verificadas. Neste caso, a propriedade antioxidante da vitamina D₃ e seus metabólitos poderia ser a explicação para a melhor cor de carne (HAMDEN et al., 2009; LAHUCKY et al., 2007). Uma melhor cor de carne já foi anteriormente observada em animais suplementados com vitamina D₃ e seus metabólitos (HANSEN et al., 2012; LOBO-JR. et al., 2012; WIEGAND et al., 2002).

A porcentagem de variação total dos valores de MFI ao dia um (1) de maturação explicada pelas concentrações de faeumelanina ($\hat{Y} = 50,21 + 1,71X$) e de variação total dos valores de força de cisalhamento ao dia um (1) de maturação explicada pelas concentrações de eumelanina ($\hat{Y} = 10,14 - 0,12X$) foram semelhantes de 5,5% (Tabela 15). As concentrações de melanina total na pele explicaram variabilidade nos valores de força de cisalhamento no dia um (1) (R^2 de 8,3%) e sete (7) (R^2 de 7,6%) de maturação com as equações quadráticas $\hat{Y} = 13,91 - 0,57X + 0,01X^2$ e $\hat{Y} = 11,15 - 0,41X + 0,01X^2$, respectivamente. Enquanto que, as concentrações de melanina total na pele explicaram 4,8% da variação nos valores de força de cisalhamento ao dia 14 de maturação com uma equação linear $\hat{Y} = 7,03 - 0,07X$. As concentrações de 25-hidróxi-vitamina D₃ no plasma explicaram 11,6% da variação nos valores de MFI no dia sete (7) de maturação e 16,8% da variação nos valores de MFI no dia 14 de maturação com as equações lineares $\hat{Y} = 58,09 + 0,43X$ e $\hat{Y} = 76,11 + 0,56X$, respectivamente.

Tabela 15. Estimativas de coeficientes de regressão, valores de probabilidade (P) e coeficientes de determinação múltiplo (R^2) para maciez e cor de carne de bovinos da raça Nelore em função das concentrações das frações de melanina na pele e dos metabólitos da vitamina D₃ no plasma

Variável		Linear				Quadrática				
DEP	INDEP	P	β_0	β_1	R^2 (%)	P	β_0	β_1	β_2	R^2 (%)
MFI _{dia 1}	FAE	0,03	50,21	1,71	5,5	0,07	47,04	3,33	-0,14	6,1
MFI _{dia 7}	25-D _p	0,06	58,09	0,43	11,6	0,12	45,48	1,31	-0,01	14,4
MFI _{dia 14}	25-D _p	0,02	76,11	0,56	16,8	0,04	58,67	1,77	-0,02	21,3
FC _{dia 1}	EUM	0,03	10,14	-0,12	5,5	0,05	11,08	-0,30	0,01	6,9
FC _{dia 1}	MEL _T	0,06	10,27	-0,11	4,1	0,03	13,91	-0,57	0,01	8,3
FC_{dia 7}	MEL_T	0,11	8,39	-0,07	2,9	0,04	11,15	-0,41	0,01	7,6
FC _{dia 14}	MEL _T	0,04	7,03	-0,07	4,8	0,13	7,25	-0,10	0,00	4,8
L^* _{dia 1}	EUM	0,06	21,61	0,20	4,1	0,14	20,49	0,42	-0,01	4,6
L^* _{dia 1}	MEL _T	0,07	21,02	0,20	3,9	0,17	19,34	0,41	-0,01	4,2
L^* _{dia 7}	FAE	0,05	32,09	-0,37	4,3	0,16	31,87	-0,26	-0,01	4,4
L^* _{dia 7}	EUM	0,03	28,77	0,19	5,4	0,04	26,90	0,55	-0,01	7,7
L^* _{dia 14}	MEL _T	0,03	24,71	0,22	5,2	0,11	23,88	0,33	0,00	5,2
L^* _{dia 14}	25-D _p	0,07	31,63	-0,10	10,7	0,17	29,26	0,06	0,00	12,3
a^* _{dia 1}	EUM	<0,01	24,33	-0,20	8,4	<0,01	26,42	-0,60	0,02	12,6
a^* _{dia 1}	MEL _T	0,05	24,20	-0,15	4,6	0,10	26,44	-0,43	0,01	5,5
a^*_{dia 1}	1,25-D_p	0,49	23,23	-0,03	1,7	0,03	12,29	0,80	-0,01	23,6
a^* _{dia 7}	FAE	<0,01	15,73	0,70	13,7	<0,01	15,85	0,64	0,01	13,7
a^*_{dia 7}	EUM	0,11	19,63	-0,15	3,1	0,03	22,47	-0,69	0,02	7,9
a^* _{dia 14}	FAE	0,03	22,73	-0,41	5,8	0,02	24,39	-1,26	0,08	8,8
a^* _{dia 14}	MEL _T	0,02	24,20	-0,19	6,0	0,07	23,72	-0,13	0,00	6,1
a^* _{dia 14}	25-D _p	0,04	18,32	0,08	14,5	0,12	18,67	0,05	0,00	14,6
b^* _{dia 7}	FAE	<0,01	18,51	-0,63	10,3	<0,01	22,19	-2,52	0,17	21,6
b^* _{dia 14}	FAE	0,02	18,79	-0,45	6,2	0,03	20,16	-1,16	0,06	8,0
b^* _{dia 14}	MEL _T	0,01	20,67	-0,23	7,6	0,03	21,86	-0,38	0,00	7,7
b^* _{dia 14}	25-D _p	0,08	14,39	0,08	10,2	0,13	17,31	-0,12	0,00	14,0
a/b^* _{dia 1}	EUM	0,04	1,91	-0,03	4,8	0,12	1,86	-0,02	0,00	4,9
a/b^* _{dia 1}	MEL _T	0,02	2,05	-0,03	6,5	0,03	2,62	-0,10	0,00	8,5
a/b^* _{dia 1}	25-D _p	0,03	1,17	0,01	16,4	<0,01	2,15	-0,05	0,00	36,6
a/b^* _{dia 7}	FAE	<0,01	0,89	0,09	16,3	<0,01	0,65	0,21	-0,01	20,0
a/b^*_{dia 7}	EUM	0,23	1,30	-0,01	1,7	0,02	1,69	-0,09	0,00	8,9

Legenda: DEP = variável dependente; INDEP = variável independente; FAE = concentração de faeumelanina na pele; EUM = concentração de eumelanina na pele; e MEL_T = concentração de melanina total na pele dada pela soma das concentrações de faeumelanina e eumelanina; 25-D_p = concentração de 25-hidróxi-vitamina D₃ no plasma; 1,25-D_p = concentração de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma; MFI = Índice de Fragmentação Miofibrilar; FC = força de cisalhamento; L^* = valores de L^* (luminosidade, variando do mais escuro ao mais claro); a^* = valores de a^* (cromaticidade, variando do verde ao vermelho); b^* = valores de b^* (cromaticidade, variando do azul ao amarelo); a^*/b^* = razão entre os valores de a^* e b^* (maiores valores indicam carne mais vermelha e menos descolorida); DIA 1, 7 e 14 = dias 1, 7 e 14 de maturação; P = valores de probabilidade para os modelos testados (linear e quadrático); e R^2 = coeficiente de determinação. Variáveis dependentes e independentes em negrito são aquelas variáveis que não apresentaram nenhuma associação na análise prévia de correlação de Pearson. Nesta tabela, somente foram incluídas as variáveis relacionadas significativamente na análise de regressão. Coeficientes de regressão (β_0 = intercepto; β_1 = linear; β_2 = quadrático) em negrito foram significativos ($P \leq 0,07$).

Em resumo, a porcentagem de variação total dos valores de MFI nos diferentes tempos de maturação foi explicada separadamente pelas concentrações de faeumelanina na pele (5,5%), 25-hidróxi-vitamina D₃ no plasma (11,6 a 16,8%) e cálcio no músculo (8,5%), enquanto a porcentagem de variação total dos valores de força de cisalhamento nos diferentes tempos de maturação foi explicada separadamente pelas concentrações de eumelanina (5,5%) e melanina total (4,8 a 8,3%) na pele, cálcio no plasma (3,7%) e cálcio no músculo (8,8%). É importante ressaltar que a atividade de calpaína e calpastatina poderia explicar grande parte da variação ainda não explicada para maciez de carne nos animais *Bos indicus* deste experimento (SHACKELFORD et al., 1991, 1994; WHEELER et al., 1990).

As concentrações de faeumelanina na pele explicaram 4,3 e 13,7% da variação nos valores de L^* e a^* no dia sete (7) de maturação usando respectivamente as equações lineares $\hat{Y} = 32,09 - 0,37X$ e $\hat{Y} = 15,73 + 0,70X$, enquanto as concentrações de faeumelanina na pele explicaram 21,6 e 20,0% da variação nos valores de b^* e a^*/b^* no dia sete (7) de maturação usando as equações de segundo grau $\hat{Y} = 22,19 - 2,52X + 0,17X^2$ e $\hat{Y} = 0,65 + 0,21X - 0,01X^2$, respectivamente. A porcentagem de variação total dos valores de a^* e b^* no dia 14 de maturação explicada pelas concentrações de faeumelanina na pele foram de 5,8 e 6,2% quando as equações lineares $\hat{Y} = 22,73 - 0,41X$ e $\hat{Y} = 18,79 - 0,45X$ foram usadas.

As concentrações de eumelanina na pele explicaram 4,1 e 4,8% da variação nos valores de L^* e a^*/b^* no dia um (1) de maturação usando respectivamente as equações lineares $\hat{Y} = 21,61 + 0,20X$ e $\hat{Y} = 1,91 - 0,03X$. A porcentagem de variação total dos valores de a^* no dia um (1) de maturação e de a^*/b^* no dia sete (7) de maturação explicada pelas concentrações de eumelanina na pele melhoraram quando as equações curvilíneas $\hat{Y} = 26,42 - 0,60X + 0,02X^2$ (R^2 de 8,4 para 12,6%) e $\hat{Y} = 1,69 - 0,09X + 0,003X^2$ (R^2 de 1,7 para 8,9%) foram usadas. As concentrações de eumelanina na pele também explicaram 5,4% da variação nos valores de L^* no dia sete (7) de maturação usando a equação linear $\hat{Y} = 28,77 + 0,19X$ e explicaram 7,9% da variação nos valores de a^* no dia sete (7) de maturação usando a equação curvilínea $\hat{Y} = 22,47 - 0,69X + 0,02X^2$. As concentrações de melanina total na pele explicaram 3,9 e 4,6% da variação nos valores de L^* e a^* no dia um (1) de maturação com a equação linear $\hat{Y} = 21,02 + 0,20X$ e $\hat{Y} = 24,20 - 0,15X$, respectivamente. Por fim, as concentrações de melanina total na pele explicaram 5,2; 6,0 e 7,6% da variação nos valores de L^* , a^* e b^* no dia 14 de maturação usando respectivamente as equações lineares $\hat{Y} = 24,71 +$

0,22X, $\hat{Y} = 24,20 - 0,19X$ e $\hat{Y} = 20,67 - 0,23X$ e 6,5% da variação nos valores de a^*/b^* no dia um (1) de maturação usando a equação linear $\hat{Y} = 2,05 - 0,03X$.

Concentrações de 25-hidróxi-vitamina D₃ no plasma explicaram 10,7; 14,5 e 10,2% da variação nos valores de L^* , a^* e b^* no dia 14 de maturação usando respectivamente as equações lineares $\hat{Y} = 31,63 - 0,10X$, $\hat{Y} = 18,32 + 0,08X$ e $\hat{Y} = 14,39 + 0,08X$ e 36,6% da variação nos valores de a^*/b^* no dia um (1) de maturação com a equação curvilínea $\hat{Y} = 2,15 - 0,05X + 0,001X^2$ (Tabela 15). Embora nenhuma associação entre as concentrações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma e os valores de a^* no dia um (1) de maturação foi observada ($P=0,49$; Tabela 14), os valores de a^* no dia um (1) de maturação foram dependentes de forma quadrática das concentrações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma usando a equação $\hat{Y} = 12,29 + 0,80X - 0,01X^2$ (R^2 de 23,6%).

6.4. Conclusão

De forma geral, as maiores concentrações de melanina total e suas frações na pele não reduziram as concentrações dos metabólitos de vitamina D₃ no plasma e de cálcio plasmático e muscular. Entretanto, as maiores concentrações de faeumelanina na pele e 25-hidróxi-vitamina D₃ no plasma melhoraram proteólise miofibrilar e cor de carne. As maiores concentrações de eumelanina e melanina total na pele resultaram em uma carne mais macia, mas pioraram a cor de carne. Trabalhos investigando os mecanismos bioquímicos envolvidos nas relações de melanina total e suas frações na pele e 25-hidróxi-vitamina D₃ no plasma com maciez e cor de carne são sugeridos para estudos futuros.

7. ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES *MC1R* (LOCO *EXTENSION*), *DPB* E *CAST* COM MELANINA NA PELE, 1,25-DI-HIDRÓXI-VITAMINA D₃ PLASMÁTICO E MACIEZ E COR DE CARNE EM BOVINOS NELORE

Resumo

Calpastatina (*CAST*) inibe enzimas calpaínas, afetando amaciamento de carne maturada. Melanina na pele e metabólitos de vitamina D₃ [25-hidróxi-vitamina D₃ (25-D) e 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ (1,25-D)] no plasma podem influenciar cálcio plasmático e muscular, alterando proteólise miofibrilar. Metabólitos de vitamina D₃ e cálcio também podem afetar cor de carne. O objetivo deste trabalho foi investigar associações dos polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) nos genes receptor da melanocortina-1 [*MC1R*; rs109688013 (C/T) e rs110710422 (G/-)], proteína ligante à vitamina D₃ [*DBP*; rs136359868 (T/C) e rs135330728 (T/C)] e *CAST* [rs109384915 (T/C)] com melanina total (MEL_T) e suas frações na pele, 25-D e 1,25-D no plasma, cálcio plasmático e muscular e maciez [Índice de Fragmentação Miofibrilar (MFI) e força de cisalhamento (FC)] e cor (valores de L^* , a^* e b^*) em carne maturada (1, 7 e 14 dias). Bovinos Nelore (n=86), abatidos com 516 ± 39 kg aos 24 ± 1 meses, foram usados para determinação dos genótipos e mensuração das características. No gene *MC1R*, alelo T do SNP rs109688013 apresentou-se fixado (100%), enquanto alelo G e sua deleção (-) no SNP rs110710422 tiveram frequência de 97,7 e 2,3%, respectivamente. SNPs do gene *MC1R* resultaram no loco *Extension* ($E/E = T/T + G/G$ e $E/e = T/T + G/-$), que foi associado com 1,25-D plasmático e valores de b^* no dia 1. No gene *DBP*, alelo C do SNP rs136359868 foi menos frequente (3,5%), enquanto alelos C e T do SNP rs135330728 tiveram frequência de 73,8 e 26,2%, respectivamente. SNPs do gene *DBP* foram associados com MEL_T na pele e valores de L^* e a^* em diferentes dias. No gene *CAST*, alelos C e T tiveram mesma frequência no SNP rs109384915, que foi associado com MFI ao dia 7. Substituição do alelo T por C reduziu os valores de MFI e a^* no dia 7 e os valores de b^* no dia 1. Associações do loco *Extension* e dos SNPs no gene *DBP* com cor de carne parecem consequência das diferenças em 1,25-D no plasma e melanina na pele. SNP do *CAST* associou-se com proteólise miofibrilar e cor de carne maturada, mas não com FC.

Palavras-chave: *CAST*, força de cisalhamento, proteólise miofibrilar, qualidade de carne, radiação ultravioleta, SNP

ASSOCIATION OF POLYMORPHISMS IN THE *MC1R* (EXTENSION LOCUS), *DPB* AND *CAST* GENES WITH SKIN MELANIN, PLASMA 1,25-DI-HYDROXY-VITAMIN D₃, AND MEAT TENDERNESS AND COLOR IN NELLORE CATTLE

Abstract

Calpastatin (*CAST*) inhibits calpains enzymes, affecting the tenderization in aged meat. Melanin in skin and vitamin D₃ metabolites [25-hydroxy-vitamin D₃ (25-D) and 1,25-di-hydroxy-vitamin D₃ (1,25-D)] in plasma can influence the plasma and muscle calcium, altering myofibrillar proteolysis. Vitamin D₃ metabolites and calcium could also affect meat color. The objective of this work was to investigate the associations of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in melanocortin-1 receptor [*MC1R*; rs109688013 (C/T) and rs110710422 (G/-)], vitamin D₃-binding protein [*DBP*; rs136359868 (T/C) and rs135330728 (T/C)], and *CAST* [rs109384915 (T/C)] genes with total melanin (MEL_T) and its fractions, 25-D and 1,25-D in plasma, plasma and muscle calcium, and tenderness [Myofibrillar Fragmentation Index (MFI) and shear force (SF)] and color (*L**, *a**, and *b** values) in aged meat (1, 7, and 14 days). Nellore cattle (n=86), slaughtered with 516 ± 39 kg at 24 ± 1 months, were used for genotyping and traits measurements. In *MC1R* gene, the rs109688013 SNP allele T was fixed (100%), while the rs110710422 SNP allele G and its deletion (-) had a frequency of 97.7 and 2.3%, respectively. *MC1R* SNPs resulted in *Extension* locus (*E/E* = T/T + G/G and *E/e* = T/T + G/-), which was associated with plasma 1,25-D and *b** values at the day 1. In *DBP* gene, the rs136359868 SNP allele C was less frequent (3.5%), while rs135330728 SNP alleles C and T had a frequency of 73.8 and 26.2%, respectively. *DBP* SNPs were associated with MEL_T in skin, and *L** and *a** values at different days. In *CAST* gene, the alleles C and T had a similar frequency in rs109384915 SNP, which was associated with MFI at the day 7. Substitution from allele T to C reduced the MFI and *a** values at the day 7 and the *b** values at the day 1. Associations of the *Extension* locus and polymorphisms in *DBP* gene with the meat color seem to be a consequence of the differences in plasma 1,25-D and skin melanin. *CAST* SNP is associated with myofibrillar proteolysis and meat color, but not with SF.

Keywords: *CAST*, meat quality, myofibrillar proteolysis, shear force, ultraviolet radiation, SNP

7.1. Introdução

Maciez e cor de carne bovina são importantes aspectos ligados à satisfação do consumidor (MORGAN et al., 1991a; ROBBINS et al., 2003a). Amaciamento de carne maturada ocorre devido ação das proteases cálcio-dependentes (μ - e m-calpaína), mas suas atividades podem ser inibidas pela calpastatina (CAST) (KOOHMARAIE, 1992; PRINGLE et al., 1997; SHACKELFORD et al., 1991; WHIPPLE et al., 1990). Variáveis de cor podem ser influenciadas pela capacidade de retenção de água e oxidação da carne (JOO et al., 1995; MANCINI; HUNT, 2005; PAGE et al., 2001).

Alguns trabalhos relatam que vitamina D₃ e seus metabólitos (25-hidróxi-vitamina D₃ e 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃) no plasma, bem como, cálcio plasmático e muscular afetam maciez e cor de carne (HANSEN et al., 2012; KUCHENMEISTER et al., 2000; LAWRENCE et al., 2003; LOBO-JR. et al., 2012; WIEGAND et al., 2002; WILBORN et al., 2004). Por esta razão, a concentração de melanina na pele seria uma importante característica para explicar a variação na síntese de vitamina D₃ (HARRIS; DAWSON-HUGHES, 1998; NORMAN, 1998).

Existem dois tipos de melanina que são sintetizados na pele, eumelanina e faeumelanina. A síntese de eumelanina, pigmento escuro, é estimulada pela ligação do hormônio estimulante α -melanócito (α -MSH) ao receptor melanocortina-1 (*MC1R*), enquanto que a síntese de faeumelanina, pigmento claro, é estimulada quando a proteína sinalizadora agouti (*ASIP*) antagoniza a ação de α -MSH (HUNT et al., 1994; KLUNGLAND et al., 1995; LU et al., 1994). Indivíduos contendo maiores concentrações de melanina na pele absorvem mais radiação ultravioleta da luz solar e fotossintetizam menos vitamina D₃ sob a pele (ENGELMAN et al., 2008; HARRIS; DAWSON-HUGHES, 1998). A vitamina D₃ fotossintetizada é transportada pela proteína ligante à vitamina D₃ (*DBP*) na corrente sanguínea até o fígado onde é convertida em 25-hidróxi-vitamina D₃ e, posteriormente, transportada até os rins onde é finalmente convertida no metabólito ativo 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ (OMDAHL et al., 2002).

O gene *MC1R* é um dos principais responsáveis pela regulação de melanina na pele de bovinos (ADALSTEINSSON et al., 1995; KLUNGLAND et al., 1995; ROUZAUD et al., 2000, 2003), enquanto o gene *DBP* está associado com as diferenças nas concentrações dos metabólitos da vitamina D₃ no plasma de humanos (ENGELMAN et al., 2008; KURYLOWICZ et al., 2006; SINOTTE et al., 2009). Por sua vez, o gene *CAST* está associado com maciez e cor de carne (CASAS et al., 2006; LI et al., 2013;

MELUCCI et al., 2012; PINTO et al., 2010, 2011; REARDON et al., 2010; RIBECA et al., 2012; SCHENKEL et al., 2006).

Embora associações de polimorfismos no gene *CAST* com maciez e cor de carne são extensivamente estudadas, não há relatos de estudos de associações entre polimorfismos dos genes *MC1R* e *DBP* com estas características. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar se a variação nas concentrações de melanina na pele, de metabólitos da vitamina D₃ no plasma e de cálcio no plasma e músculo estão associadas com os polimorfismos nos genes *MC1R* e *DBP* e se a variação na maciez e cor de carne bovina estão associadas com os polimorfismos nos genes *MC1R*, *DBP* e *CAST*.

7.2. Material e Métodos

7.2.1. Animais, dieta e abate

Foram usados 86 animais da raça Nelore, sendo 43 machos castrados e 43 machos inteiros. Todos os animais tinham pais conhecidos e foram criados a pasto até o sobreano (18 a 20 meses). Os animais foram confinados por diferentes períodos (59, 80, 115 e 129 dias) no confinamento localizado na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) em Pirassununga (SP), campus pertencente à Universidade de São Paulo (USP). Uma dieta comum composta de 15% de volumoso (bagaço de cana de açúcar) e 85% de concentrado (milho, farelo de soja, casca de soja, glúten de milho, sal mineral e ureia), contendo 79,4% de matéria seca, 74,8% de nutriente digestível total, 14,4% de proteína bruta, 3,0% de extrato etéreo, 0,2% de cálcio e 0,5% de fósforo, foi oferecida aos animais durante o período de confinamento. Um total de oito aditivos foi testado na dieta dos animais. Ao final de cada tempo de confinamento, um grupo de animais (n=20-24) foi abatido serialmente no Matadouro Escola da Prefeitura do Campus de Pirassununga. Todos os 86 animais (516 ± 39 kg aos 24 ± 1 meses) foram abatidos entre os meses de Setembro e Dezembro de 2011.

7.2.2. Coleta de amostras

7.2.2.1. Sangue

O sangue de cada animal foi coletado em dois tubos *vacutainer* durante a sangria, na linha de abate. Para a determinação dos genótipos, o sangue foi coletado

no tubo com EDTA. Para as mensurações de 25-hidróxi-vitamina D₃, 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ e cálcio plasmático, o sangue foi coletado no tubo com heparina de sódio e imediatamente submetido à centrifugação de 1.000 × g por 15 minutos para a obtenção do plasma, que foi então congelado à –20°C até a realização das análises.

7.2.2.2. Pele

Um pedaço (225 mm²) de couro de cada animal foi retirado na região dorsal próximo à cauda durante a esfolia. Cada pedaço de couro foi seccionado em aproximadamente nove pedaços menores de 25 mm², os quais foram congelados rapidamente em nitrogênio líquido (–196°C) e armazenados no freezer à –80°C para posterior quantificação de melanina.

7.2.2.3. Músculo

Todas as amostras do músculo *Longissimus thoracis* foram coletadas entre a 10^a e 13^a vértebra torácica da meia-carcaça direita de cada animal. Amostras foram coletadas imediatamente após o abate, congeladas rapidamente em nitrogênio líquido (–196°C) e armazenados no freezer à –80°C para posterior quantificação de cálcio muscular. Às 24 horas *post-mortem*, durante a desossa, foram coletados três bifes de 2,5 cm de espessura para análise de força de cisalhamento e três bifes de 1 cm de espessura para análise de Índice de Fragmentação Miofibrilar, bifes os quais foram embalados a vácuo e maturados à 2°C por 1, 7 e 14 dias. As medidas de cor foram realizadas nos mesmos bifes usados para análise de força de cisalhamento, antes do cozimento, em todos os tempos de maturação.

7.2.3. Determinação de genótipos dos animais

Todos os marcadores utilizados na determinação de genótipos dos animais são do tipo SNP e foram sintetizados a partir dos polimorfismos depositados no banco de dados do site *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*. Foram eleitos dois (2) polimorfismos (rs109688013 e rs110710422) para o gene *MC1R*, dois (2) polimorfismos (rs136359868 e rs135330728) para o gene *DBP* e um (1) polimorfismo (rs109384915) para o gene *CAST*. Informações sobre localização e tipo dos polimorfismos nos genes *MC1R*, *DBP* e *CAST* foram apresentadas na Tabela 16.

A extração do DNA genômico, a partir do sangue coletado nos tubos de EDTA, foi feita por precipitação em sal (MILLER et al., 1988). O DNA extraído teve sua qualidade e concentração avaliada pela determinação da razão A260/280 em biofotômetro, sendo aceitas para prosseguir para a determinação dos genótipos apenas amostras que possuíam valor em torno de 1,5 a 2,0.

Tabela 16. Identificação, localização (cromossomo, éxon e posição do nucleotídeo) e tipo (substituição ou deleção de nucleotídeo) dos polimorfismos no gene receptor melanortina-1 (*MC1R*), proteína ligante à vitamina D₃ (*DBP*) e calpastatina (*CAST*)

Polimorfismo	Cromossomo	Éxon	Posição (pb)	Tipo
Gene <i>MC1R</i>				
rs109688013	18	1	14.757.910	C → T
rs110710422	18	1	14.757.924	G → -
Gene <i>DBP</i>				
rs136359868	06	5	88.711.884	T → C
rs135330728	06	13	88.739.073	T → C
Gene <i>CAST</i>				
rs109384915	07	20	98.554.459	T → C

Legenda: - = deleção do nucleotídeo G

A determinação dos genótipos foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (PCR-RT) com o equipamento *ABI Prism® 7500 Sequence Detection System*. A PCR-RT foi conduzida em volumes de reação de 10 µL, usando 2,00 µL (40 ng) de DNA genômico, 2,75 µL de água milli-Q autoclavada, 0,25 µL de *Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays* (primers e sondas) e 5,00 µL de *TaqMan® Universal PCR Master Mix (AmpliTaq Gold® DNA Polymerase Ultra Pure* e dNTPs com dUTPs) da *Applied Biosystems*. Os primers e sondas de cada polimorfismo estão apresentados na Tabela 17.

As condições de amplificação foram as seguintes: 95°C por 10 minutos, seguido por 50 ciclos de 95°C por 15 segundos e uma extensão a 60°C por 1,5 minutos. A detecção dos genótipos foi obtida por meio de fluorescência, emitida quando as diferentes sondas foram degradadas pela enzima *Taq DNA polimerase* presente no *TaqMan® Universal PCR Master Mix*.

Tabela 17. *Primers* e sondas dos polimorfismos localizados nos genes receptor melanortina-1 (*MC1R*), proteína ligante à vitamina D₃ (*DBP*) e calpastatina (*CAST*)

Polimorfismo	Primers	Sondas
Gene <i>MC1R</i>		
rs109688013	D: ggtgagcgtcagcaacgt R: tccagctgctgcaccac	D: ccagcagc ag catga R: cagcagc gg catga
rs110710422	D: gctggagacggcagtcac R: tccagctgctgcaccac	D: aggacac cg gcctc R: aggacac cg gcctc
Gene <i>DBP</i>		
rs136359868	D: ggcttttcagggtgactcaagtat R: gtgtatacgcaaatctacccatgtt	D: caggaagactc gg attc R: caggaagactc ag attc
rs135330728	D: tcttgcaaattggtcacagc R: cctggttttcctccttgctgtag	D: ccttggtgc gt gctct R: ccttggtgc at gctct
Gene <i>CAST</i>		
rs109384915	D: gctccgcccacagca R: ggaagaacactgctttctcaagaca	D: cactcacc g ctggagc R: cactcacc act ggagc

Legenda: D = sentido direto; e R = sentido reverso. Substituição ou deleção de nucleotídeos está em negrito.

7.2.4. Características fenotípicas

7.2.4.1. Concentração de faeumelanina, eumelanina e melanina total na pele

A quantificação das frações de melanina (faeumelanina e eumelanina) foi realizada nas secções (25 mm²) de couro seguindo a metodologia descrita em humanos por Alaluf et al. (2002). Cada secção de couro foi tratada com 2 M de brometo de sódio (NaBr) em tampão fosfato de sódio 1X (PBS 1X, 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 8 mM de Na₂HPO₄ e 1,5 mM de KH₂PO₄ a pH = 7,4) por 5 horas à temperatura ambiente para que a epiderme fosse separada da derme. A epiderme foi seca a vácuo e pesada. Em seguida, a epiderme seca foi macerada com uma pinça em um microtubo usando nitrogênio líquido. A pinça foi lavada com 500 µL de água destilada sobre o microtubo, o qual foi centrifugado à 15.000 rpm por 15 minutos (25°C).

A água foi então descartada e a epiderme macerada foi suspendida em uma solução contendo 1 M de hidróxido de sódio (NaOH) e 8 M de ureia. A epiderme suspendida foi incubada por 3 horas à 37°C sob agitação para que a fração alcalina solúvel (faeumelanina) fosse obtida. Foi realizada uma centrifugação nas mesmas condições anteriores e os sobrenadantes obtidos foram transferidos para um novo microtubo, enquanto os precipitados foram retidos para posterior determinação da fração alcalina insolúvel (eumelanina). Clorofórmio foi então adicionado nos sobrenadantes e agitado para separar lipídio (parte inferior) de proteína (parte superior). Uma nova centrifugação foi realizada nas mesmas condições e os

sobrenadantes obtidos foram transferidos à uma microplaca para que a leitura de absorbância à 405 nm fosse realizada. Os precipitados retidos foram então ressuspendidos em uma solução contendo somente 1 M de NaOH e, depois, incubados por 72 horas à 60°C sob agitação para que a fração alcalina insolúvel fosse obtida. A partir desta etapa, todo o procedimento realizado para a fração alcalina solúvel foi repetido.

As concentrações de faeumelanina foram obtidas usando como padrão a melanina sintética solubilizada à 37°C por 3 horas, enquanto as concentrações de eumelanina foram obtidas usando como padrão a melanina sintética solubilizada à 60°C por 72 horas. Os dados foram normalizados para o peso das epidermes secas. Por fim, a concentração de melanina total foi obtida somando as concentrações das duas frações. Os resultados foram expressos em µg/mg de epiderme.

7.2.4.2. Concentração dos metabólitos da vitamina D₃ no plasma

As determinações de 25-hidróxi-vitamina D₃ e 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ foram realizadas no plasma de 30 animais. As concentrações de 25-hidróxi-vitamina D₃ foram determinadas por Imunoensaio de Eletroquimioluminescência (ECLIA) através do *Kit Elecsys Vitamin D total* (REF 05894913, Cobas®, Roche Diagnostics GmbH), usado em humanos (LEINO et al., 2008; ONG et al., 2012). O princípio do teste se baseia na competição da 25-hidróxi-vitamina D₃ presente na amostra para se ligar à proteína ligante à vitamina D₃ (*DBP*). O ensaio consistiu das seguintes etapas: i) primeira incubação – incubação da amostra com ditiotreitol e NaOH para que a 25-hidróxi-vitamina D₃ ligada se desprenda da *DBP*; ii) segunda incubação – incubação da amostra pré-tratada com a *DBP* marcada com rutênio para que um complexo entre a 25-hidróxi-vitamina D₃ livre e a *DBP* marcada com rutênio seja formado; iii) terceira incubação – adição de micropartículas revestidas com estreptavidina e 25-hidróxi-vitamina D₃ marcada com biotina para que a *DBP* marcada com rutênio não ligada forme um complexo com a 25-hidróxi-vitamina D₃ marcada com biotina de fase sólida via interação de biotina e estreptavidina; iv) a reação de mistura é aspirada para dentro da célula de medição, onde micropartículas são magneticamente capturadas para a superfície do eletrodo; v) substâncias não ligadas são então removidas com o aparato ProCell/ProCell M; vi) aplicação de uma voltagem ao eletrodo induz então emissão quimioluminescente, a qual é medida por um fotomultiplicador; e vii) resultados são determinados através de uma curva de calibração de dois (2) pontos gerada pelo

próprio instrumento e de uma curva principal fornecida via código de barras do reagente. Os valores foram expressos em ng/mL.

Por sua vez, as concentrações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ foram determinadas por Radioimunoensaio (RIA) (HOLLIS et al., 1996) precedido da separação de frações da vitamina D (vitamina D₃, 25-hidróxi-vitamina D₃, 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (SHEPARD et al., 1979; HORST et al., 1981). Quantidades conhecidas de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ marcado por radioisótopos em etanol foram adicionadas, como um marcador interno, a cada tubo contendo o plasma para monitorar a recuperação do analito no ensaio. Os lipídios foram extraídos das amostras com cloreto de metanol:metileno (1:3) e solventes removidos com um concentrador. O extrato lipídico resultante foi solubilizado em hexano:clorofórmio:metanol (9:1:1) e aplicado à coluna Sephadex LH no HPLC para separar as frações. A fração contendo os metabólitos di-hidróxi-vitamina D (24,25-di-hidróxi-vitamin D, 25,26-di-hidróxi-vitamin D e 1,25-di-hidróxi-vitamin D) foi coletada, solubilizada em isopropanol:hexano (11:86) e aplicada à coluna Zorbax Sil no HPLC. A fração 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ foi coletada e a radioatividade do marcador interno colocado no início da análise foi medida para analisar a porcentagem recuperada. A fração 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ foi então mensurada por RIA, que consistiu de uma incubação com o anticorpo primário por 2 horas a temperatura ambiente, seguida por uma incubação com o anticorpo secundário por 20 minutos para precipitar o complexo formado. Uma centrifugação foi realizada e o sobrenadante foi descartado. A radioatividade restante no tubo foi contada por um sistema contador de gama. Os valores foram expressos em pg/mL.

7.2.4.3. Concentração de cálcio plasmático e muscular

A determinação das concentrações de cálcio no plasma e músculo foi realizada respectivamente nas amostras de 86 e 43 animais. O plasma foi diretamente analisado, enquanto que o músculo foi primeiramente homogeneizado com tampão PBS 1X a 30.000 rpm por 40 segundos usando um homogeneizador Ika T-10. Em seguida, os homogenatos de músculos foram centrifugados a 3.000 × g (4°C) por 10 minutos para obtenção do sobrenadante, que foi usado nas determinações.

As concentrações de cálcio foram determinadas usando o *kit QuantiChrom™ Calcium Assay* (DICA-500, Biossay Systems) por método colorimétrico (ARPORNMAEKLONG et al., 2009; HERNANDEZ et al., 2007; PONNAPAKKAM et al.,

2012; VALVERDE et al., 2008; SHU et al., 2010). Um reagente de trabalho foi preparado por combinar volumes iguais de um reagente A (ácido o-ftálico, polivinilpirrolidona, metiltimol azul e hidroxiquinolina) e um reagente B (sulfito de sódio e monoetanolamina). O cloreto de cálcio foi diluído e usado como padrão. Então, padrões diluídos e amostras (5 µL) foram transferidos para uma microplaca. O reagente de trabalho (200 µL) foi adicionado e agitado levemente para misturar. Após uma incubação de 3 minutos a temperatura ambiente, leituras de absorbâncias à 620 nm foram realizadas.

Os valores de cálcio (mg/dL) no músculo foram multiplicados pelo fator de diluição [(leitura de absorbância × volume de tampão) ÷ peso do músculo]. A unidade em mg/dL foi convertida para mg/100 g, uma vez que um (1) dL ou 100 mL de tampão PBS 1X pesava aproximadamente 99,4 gramas.

7.2.4.4. Índice de Fragmentação Miofibrilar (MFI)

As análises de MFI foram realizadas nos bifes (1 cm de espessura) maturados por 1, 7 e 14 dias, usando o procedimento descrito por Olson et al. (1976) e Culler et al. (1978). Amostras (2 g) foram homogeneizadas em 20 mL de tampão de MFI (100 mM de KCl, 20 mM de KH₂PO₄, 20 mM de K₂HPO₄, 1 mM MgCl₂ e 1 mM EDTA, pH=7,0) a 22.500 rpm por 40 segundos usando um homogeneizador Turratec TE-102. Posteriormente, o homogenato foi centrifugado por 15 minutos à 1.000 × g em 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado com a adição de 20 mL de tampão de MFI e agitado em vórtex. O ressuspensionado foi novamente centrifugado por 15 minutos à 1.000 × g em 4°C e o sobrenadante foi descartado. Para ressuspender o precipitado, 10 mL de tampão de MFI foi adicionado. O ressuspensionado foi filtrado com uma peneira para retirar o tecido colagenoso. Em cada ressuspensionado filtrado foi determinado a concentração de proteína pelo método de Biureto, onde a curva padrão com proteína purificada (*Bovine Serum Albumin*) foi usada. Após a determinação da concentração de proteína, os ressuspensionados filtrados tiveram suas concentrações de proteína igualada por diluição em tampão de MFI (0,5 mg de proteína/mL) e foram submetidos às leituras de absorbância à 540 nm em um espectrofotômetro. Então, os valores de absorbância foram multiplicados por 200 para obter os valores de MFI.

7.2.4.5. Força de cisalhamento

A análise de força de cisalhamento foi realizada em bifes (2,5 cm de espessura) maturados por 1, 7 e 14 dias, seguindo os procedimentos descritos por AMSA (1995). Para força de cisalhamento, os bifes foram cozidos no forno elétrico até atingirem a temperatura interna de 40°C, quando então foram virados, aguardando atingirem a temperatura interna final de 71°C (monitoradas por termômetros individuais). Após retornarem a temperatura ambiente, os bifes foram colocados na geladeira ($\pm 2^\circ\text{C}$) por onde ficaram toda a noite. No dia seguinte, as extremidades e os tecidos conjuntivos foram removidos dos bifes. Entre seis (6) e oito (8) cilindros com diâmetros de 1,25 cm foram retirados dos bifes no sentido paralelo às fibras. Por fim, os cilindros foram submetidos perpendicularmente ao aparelho *Warner-Bratzler* a fim de se medir a força necessária para cisalhar o cilindro. A medida foi expressa em kg.

7.2.4.6. Cor objetiva

As leituras de cor foram realizadas nos bifes (2,5 cm de espessura) maturados por 1, 7 e 14 dias. Um colorímetro Minolta CM-2500d (Minolta Corporation/ISD, Ramsey, NJ, USA) com uma abertura de 30 mm, uma fonte de luz D_{65} e um observador de 10° foi usado para medir a luminosidade (L^*), vermelho (a^*) e amarelo (b^*) segundo o sistema *CIELAB* (CIE, 1976). A relação entre os valores de a^* e b^* (a^*/b^*) foi utilizada como um indicador de oxidação do pigmento mioglobina (AMSA, 2012).

7.2.5. Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa *Statistical Analysis System*®, versão 9.2 (SAS, 2008). As frequências genotípicas e alélicas foram calculadas usando o procedimento PROC FREQ. Frequências alélicas foram comparadas pelo teste χ^2 para checar se os alelos distribuídos na população estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Associações entre os genótipos nos polimorfismos dos genes *MC1R*, *DBP* e *CAST* com as características de interesse foram avaliadas usando o procedimento PROC MIXED, considerando um modelo misto linear incluindo sexo, tempo de confinamento, aditivo e genótipo como efeitos fixos, além de reprodutor e resíduo como efeitos aleatórios. A idade dos animais ao abate também foi incluída no modelo como uma covariável linear. Somente para as concentrações de 25-hidróxi-vitamina D_3 e 1,25-di-hidróxi-vitamina D_3 no plasma e

cálcio no músculo foi usado um modelo mais simples, face ao menor tamanho amostral analisado ($n=30-43$). Para estas características, o modelo incluiu somente efeito fixo de genótipo e efeito aleatório de resíduo. Quando diferenças significativas ($P \leq 0,05$) ou sugestivas ($P > 0,05$ e $P \leq 0,08$) foram detectadas pelo teste F entre os genótipos, um teste de médias (*t-Student*) foi usado para discriminar as médias de quadrados mínimos. Os efeitos de substituição de alelo também foram estimados usando os mesmos modelos, mas neste caso o efeito fixo de genótipo não foi mais tratado como um efeito classificatório e sim como um efeito fixo contínuo com base no número de alelos favoráveis (0, 1 e 2) presentes.

7.3. Resultados e Discussão

7.3.1. Frequências genotípicas e alélicas

As frequências genotípicas e alélicas nos polimorfismos de cada gene estudado estão apresentadas na Tabela 18. Em todos os polimorfismos, os alelos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P \geq 0,58$), sugerindo não haver seleção de um alelo em detrimento do outro. No gene *MC1R*, o alelo T referente ao polimorfismo rs109688013 se encontra fixado na população avaliada até o momento. Para o polimorfismo rs110710422, naquele mesmo gene, o genótipo G/G esteve presente em 95,4% da população e o genótipo G/- (deleção de um nucleotídeo G) em 4,6% da população. O genótipo homozigoto -/- (deleção da base G) não foi observado em nenhum animal. As frequências alélicas, neste caso, foram de 97,7% para o alelo G e 2,3% para a deleção.

Como a combinação de nucleotídeos nos polimorfismos rs109688013 e rs110710422 resulta nos alelos do loco *Extension*, foi calculada a frequência genotípica e alélica também para este loco. Isto somente foi possível porque o alelo T do polimorfismo rs109688013 estava fixado na população. Se o alelo C também estivesse presente na população, a definição dos alelos do loco *Extension* seria mais difícil. As frequências dos genótipos *E/E* (combinação dos genótipos T/T e G/G) e *E/e* (combinação dos genótipos T/T e G/-) foram respectivamente de 95,4 e 4,6%. Já, a frequência dos alelos *E* e *e* foram de 97,7 e 2,3%, respectivamente.

Tabela 18. Frequências genotípicas e alélicas para polimorfismos e deleção de um único nucleotídeo nos genes do receptor melanocortina-1 (*MC1R*), da proteína ligante à vitamina D₃ (*DBP*) e da calpastatina (*CAST*) em animais da raça Nelore

Polimorfismo	n	Frequência genotípica (%)			Frequência alélica (%)		P ^ε
Gene <i>MC1R</i>							
rs109688013	86	C/C	C/T	T/T	C	T	-
		0,0	0,0	100,0	0,0	100,0	
rs110710422	86	G/G	G/-	-/-	G	-	0,95
		95,4	4,6	0,0	97,7	2,3	
Loco <i>Extension</i>	86	E/E	E/e	e/e	E	e	0,95
		95,4	4,6	0,0	97,7	2,3	
Gene <i>DBP</i>							
rs136359868	86	C/C	C/T	T/T	C	T	0,94
		0,0	7,0	93,0	3,5	96,5	
rs135330728	86	C/C	C/T	T/T	C	T	0,58
		52,3	43,0	4,7	73,8	26,2	
Gene <i>CAST</i>							
rs109384915	86	C/C	C/T	T/T	C	T	0,98
		25,6	48,8	25,6	50,0	50,0	

Legenda: n = número de animais avaliados; e ^εProbabilidade menor do que 5% no teste χ^2 indica que os alelos na população avaliada não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Pelo fato dos animais de raça Nelore apresentarem pele de cor escura entre cinza e preto (SILVA et al., 2001), seria esperado que os animais desta raça apresentassem genótipos E^D/E^D , E^D/E ou E^D/e no loco *Extension* do gene *MC1R*. Todavia, os genótipos E/E e E/e encontrados nos animais Nelore deste trabalho poderiam ser influenciados pelos diferentes genótipos no loco *Agouti* do gene *ASIP*, onde genótipos homozigotos recessivos a/a poderiam minimizar a ação da proteína sinalizadora agouti, que é antagonista do hormônio estimulante α -melanócito, resultando então em uma maior síntese de eumelanina na pele e uma pele tendendo a uma cor mais próxima do preto (OLSON, 1999). Este efeito epistático foi confirmado quando equinos de diferentes raças, mas de cores cinza e preto sólidas, apresentaram os genótipos E/e no loco *Extension* e os genótipos a/a no loco *Agouti* (RIEDER et al., 2001). Em ovinos, o loco *Agouti* foi considerado ser o responsável pela maior variação de cor de pelo em nove (9) raças diferentes (FONTANESI et al., 2010).

O gene *MC1R* é responsável por regular uma característica qualitativa, cor de pele, que deveria variar muito pouco em animais de uma mesma raça, principalmente quando pura. Este comportamento já foi observado em animais de pele clara, dentro da

raça Blonde d'Aquitaine (n=27), Charolês (n=59) e Limousine (n=42), quando o alelo *e* do loco *Extension* encontrou-se fixado (ROUZAUD et al., 2000). Em animais da raça Angus do Canadá, verificou-se uma frequência alélica de 91,8% para o alelo E^D , 0,6% para o alelo *E* e 7,6% para o alelo *e* (CARRUTHERS et al., 2011), mas nenhuma informação da proporção de Black Angus e Red Angus usados no experimento foi dada. Uma vez que a frequência dos alelos E^D foi elevada na população estudada daquele trabalho, acredita-se que a maioria dos animais fossem Black Angus.

No gene *DBP*, o alelo raro na população foi o alelo C (3,5%) no polimorfismo rs136359868 (Tabela 18). Nenhum dos animais apresentou o genótipo homozigoto C/C neste mesmo polimorfismo, porém 93,0% dos animais eram homozigotos T/T e 7,0% dos animais eram heterozigotos C/T. No polimorfismo rs135330728, o alelo C foi o mais frequente (73,8%) e o alelo T foi o menos frequente na população (26,2%), sendo que todos os genótipos foram observados. Em 52,3 e 43,0% dos animais foram observados respectivamente o genótipo homozigoto C/C e o genótipo heterozigoto C/T, enquanto que somente em 4,7% dos animais foram observados os genótipos homozigotos T/T. Embora ambos os polimorfismos rs136359868 e rs135330728 estejam depositados no banco de dados do site *NCBI*, não há nenhum trabalho relatando as frequências genotípicas e alélicas destes polimorfismos.

No gene *CAST*, o alelo C e T do polimorfismo rs109384915 estiveram presentes na mesma proporção (50%) na população estudada (Tabela 18). Cada um dos genótipos homozigotos C/C e T/T apareceram em 25,6% da população, enquanto que o genótipo heterozigoto C/T apareceu em 48,8% da população. Como para os polimorfismos do gene *DBP*, o polimorfismo rs109384915 do gene *CAST* também foi depositado no banco de dados do site *NCBI*, porém sem nenhum trabalho vinculado que relatasse as frequências genotípicas e alélicas deste polimorfismo.

7.3.2. Estudos de associação

7.3.2.1. Associação de polimorfismos nos genes *MC1R* (loco *Extension*) e *DBP* com melanina total e suas frações na pele, metabólitos da vitamina D₃ no plasma e cálcio plasmático e muscular

Como não haveria diferença nos resultados se as análises de associação dos fenótipos fossem em função dos genótipos no polimorfismo rs110710422 ou dos genótipos no loco *Extension*, foi preferido analisar as variáveis em função dos

genótipos no loco *Extension*, que combina dois (2) nucleotídeos nos polimorfismos rs109688013 e rs110710422 do gene *MC1R* simultaneamente. Nenhuma associação ($P \geq 0,10$) de genótipos no loco *Extension* com as concentrações de melanina total e suas frações na pele, 25-hidróxi-vitamina D₃ no plasma e cálcio no plasma e músculo foi observada (Tabela 19), mas uma associação entre os genótipos no loco *Extension* com as concentrações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ plasmático foi detectada ($P < 0,01$). Animais com genótipos homozigotos *E/E* apresentaram maiores ($P < 0,01$) concentrações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma do que os animais com genótipos heterozigotos *E/e*. A substituição do alelo *E* por *e* resulta na troca do aminoácido glicina por valina, o que reduziu ($P < 0,01$) as concentrações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ plasmático, em média, em 17,26 pg/mL.

Tabela 19. Efeito das combinações alélicas no loco *Extension*, localizado no gene receptor melanocortina-1 (*MC1R*), sobre as concentrações de melanina e suas frações na pele, metabólitos da vitamina D₃ no plasma e cálcio plasmático e muscular de animais da raça Nelore

Variável	Genótipo			P	Efeito de substituição	P
	<i>E/E</i> (n=82)	<i>E/e</i> (n=4)	<i>e/e</i>		<i>E</i> → <i>e</i>	
FAE (n=86)	3,2 (0,19)	3,0 (0,92)	-	0,85	-0,17 (0,937)	0,85
EUM (n=86)	11,2 (0,51)	10,3 (2,23)	-	0,67	-0,96 (2,238)	0,67
MEL _T (n=86)	14,4 (0,46)	13,6 (2,19)	-	0,71	-0,82 (2,217)	0,71
25-D _p (n=30) ^δ	30,4 (2,66)	21,3 (6,78)	-	0,22	-9,04 (7,289)	0,22
1,25-D _p (n=30) ^φ	32,1 (2,13) ^a	14,8 (5,43) ^b	-	<0,01	-17,26 (5,837)	<0,01
Ca _p (n=86)	11,7 (0,11)	12,6 (0,55)	-	0,10	0,92 (0,557)	0,10
Ca _m (n=43) ^λ	2,6 (0,16)	3,1 (0,60)	-	0,37	0,57 (0,627)	0,37

Legenda: n = número de animais avaliados; FAE = concentração de faeumelanina na pele (µg/mg); EUM = concentração de eumelanina na pele (µg/mg); MEL_T = concentração de melanina total na pele dada pela soma das concentrações de faeumelanina e eumelanina (µg/mg); 25-D_p = concentração de 25-hidróxi-vitamina D₃ no plasma (ng/mL); 1,25-D_p = concentração de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma (pg/mL); Ca_p = concentração de cálcio no plasma (mg/dL); Ca_m = concentração de cálcio no músculo (mg/100 g); δ = *E/E* (n=26) e *E/e* (n=4); φ = *E/E* (n=26) e *E/e* (n=4); e λ = *E/E* (n=40) e *E/e* (n=3). ^{a,b}Médias de quadrados mínimos com diferentes letras sobrescritas entre os genótipos diferem estatisticamente pelo teste *t-Student* ($P < 0,01$).

O alelo *e* é um resultado de uma deleção do nucleotídeo G na posição 14.757.924 pb, o que leva à uma troca de aminoácidos responsável pelo aparecimento prematuro do códon de parada (*stop codon*) e pela perda de funcionalidade da proteína (ROUZAUD et al., 2000). Todavia, o alelo *E* é dominante sobre o alelo *e*, tornando sem efeito o aparecimento do códon de parada e tornando o genótipo *E/e* dependente dos genótipos no loco *Agouti* do gene *ASIP* (OLSON, 1999). Desta forma, a falta de diferenças nas concentrações de faeumelanina, eumelanina e melanina total na pele

em função dos genótipos no loco *Extension* podem ser explicadas. Devido à nenhuma diferença nas concentrações de melanina total e suas frações na pele seria também esperado nenhuma diferença na fotossíntese de vitamina D₃ sob a pele, nas concentrações dos metabólitos da vitamina D₃ no plasma e nas concentrações de cálcio plasmático e muscular. Entretanto, uma associação entre os genótipos no loco *Extension* com as concentrações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ plasmático foi observada, sem nenhuma mudança nas concentrações de melanina total e suas frações na pele e 25-hidróxi-vitamina D₃ plasmático. Isto sugere que o loco *Extension* pode ter um efeito direto sobre as concentrações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma.

No gene *DBP*, houve associações entre os genótipos no polimorfismo rs136359868 com as concentrações de eumelanina ($P=0,03$) e melanina total ($P=0,02$) na pele, enquanto somente uma associação entre os genótipos no polimorfismo rs135330728 com as concentrações de melanina total na pele foi notada ($P=0,07$) (Tabela 20). Animais com genótipos heterozigotos C/T apresentaram maiores concentrações de eumelanina ($P=0,03$) e melanina total ($P=0,02$) do que animais com genótipos homozigotos T/T no polimorfismo rs136359868. Neste polimorfismo, a substituição do alelo T por C resulta na troca do aminoácido glutamina por arginina, o que aumentou as concentrações de eumelanina ($P=0,03$) e melanina total ($P=0,02$) na pele, em média, 3,90 e 4,20 µg/mg, respectivamente. Para o polimorfismo rs135330728, animais com genótipos homozigotos T/T tiveram maiores concentrações de melanina total na pele ($P\leq 0,03$) do que os animais com genótipos C/C e C/T, os quais não diferiram ($P=0,81$). Nenhum efeito de substituição do alelo T por C ($P=0,16$) foi detectado para as concentrações de melanina total na pele.

Embora associações foram encontradas entre os genótipos nos polimorfismos rs136359868 e rs135330728 do gene *DBP* com as concentrações de eumelanina e melanina total na pele, nenhum efeito daqueles genótipos naqueles mesmos polimorfismos foram observados sobre as concentrações dos metabólitos da vitamina D₃ no plasma e cálcio plasmático e muscular ($P\geq 0,22$) (Tabela 20). Em outro trabalho, a ausência de associação entre os genótipos nos polimorfismos rs43338560 e rs43338565, localizados na região intrônica do gene *DBP*, com concentrações de vitamina D₃ no plasma de bovinos Holandês foi observada (FERRERI et al., 2011). Entretanto, associações entre polimorfismos no gene *DBP* com as concentrações dos

metabólitos da vitamina D₃ no plasma tem sido relatadas em humanos (AHN et al., 2010; ENGELMAN et al., 2008; KURYLOWICZ et al., 2006; SINOTTE et al., 2009).

Tabela 20. Efeito de polimorfismos de um único nucleotídeo (rs136359868 e rs135330728) no gene da proteína ligante à vitamina D₃ (*DBP*) sobre as concentrações de melanina e suas frações na pele, metabólitos da vitamina D₃ no plasma e cálcio plasmático e muscular de animais da raça Nelore

Variável	Genótipo			P	Efeito de substituição	P
rs136359868						
	C/C	C/T (n=6)	T/T (n=80)		T → C	
FAE (n=86)	-	3,5 (0,75)	3,2 (0,19)	0,69	0,31 (0,768)	0,69
EUM (n=86)	-	14,9 (1,73) ^a	11,0 (0,49) ^b	0,03	3,90 (1,776)	0,03
MEL _T (n=86)	-	18,4 (1,70) ^a	14,2 (0,43) ^b	0,02	4,20 (1,748)	0,02
25-D _p (n=30) ^δ	-	34,2 (5,59)	27,9 (2,79)	0,32	6,34 (6,248)	0,32
1,25-D _p (n=30) ^φ	-	24,2 (4,94)	31,2 (2,47)	0,22	-6,97 (5,528)	0,22
Ca _p (n=86)	-	12,1 (0,45)	11,6 (0,12)	0,28	0,50 (0,464)	0,27
Ca _m (n=43) ^λ	-	2,4 (0,53)	2,6 (0,17)	0,72	-0,20 (0,554)	0,72
rs135330728						
	C/C (n=45)	C/T (n=37)	T/T (n=4)		T → C	
FAE (n=86)	3,1 (0,26)	3,2 (0,28)	3,6 (0,89)	0,84	-0,17 (0,319)	0,60
EUM (n=86)	10,9 (0,65)	11,0 (0,70)	15,5 (2,07)	0,11	-0,95 (0,751)	0,21
MEL _T (n=86)	14,0 (0,61) ^b	14,3 (0,66) ^b	19,1 (2,04) ^a	0,07	-1,06 (0,746)	0,16
25-D _p (n=30) [¥]	28,7 (3,63)	26,5 (3,92)	38,8 (6,79)	0,31	-3,08 (3,593)	0,40
1,25-D _p (n=30) [§]	29,3 (3,38)	29,8 (3,65)	31,5 (6,33)	0,95	-0,95 (3,246)	0,77
Ca _p (n=86)	11,5 (0,17)	11,8 (0,18)	12,3 (0,54)	0,28	-0,29 (0,191)	0,13
Ca _m (n=43) [£]	2,8 (0,24)	2,5 (0,23)	2,2 (0,52)	0,39	0,34 (0,245)	0,17

Legenda: n = número de animais avaliados; FAE = concentração de faeumelanina na pele (µg/mg); EUM = concentração de eumelanina na pele (µg/mg); MEL_T = concentração de melanina total na pele dada pela soma das concentrações de faeumelanina e eumelanina (µg/mg); 25-D_p = concentração de 25-hidróxi-vitamina D₃ no plasma (ng/mL); 1,25-D_p = concentração de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma (pg/mL); Ca_p = concentração de cálcio no plasma (mg/dL); Ca_m = concentração de cálcio no músculo (mg/100 g); δ = C/T (n=6) e T/T (n=24); φ = C/T (n=6) e T/T (n=24); λ = C/T (n=4) e T/T (n=39); ¥ = C/C (n=14), C/T (n=12) e T/T (n=4); § = C/C (n=14), C/T (n=12) e T/T (n=4); e £ = C/C (n=19), C/T (n=20) e T/T (n=4). ^{a,b}Médias de quadrados mínimos com diferentes letras sobrescritas entre os genótipos diferem estatisticamente pelo teste *t-Student* (P≤0,03).

Neste trabalho, interessantes associações foram observadas entre os genótipos do gene *MC1R* (loco *Extension*) e *DBP* com as concentrações de melanina e suas frações na pele e metabólitos da vitamina D₃ no plasma (Tabela 19 e 20). Associações de genótipos no gene *MC1R* (loco *Extension*) com as concentrações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma e associações dos genótipos no gene *DBP* com as concentrações de melanina e suas frações na pele foram observadas. Vários são os genes que podem influenciar as concentrações de melanina e suas frações na pele (*MC1R*, *ASIP* e *TYR*) e 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma (*DBP*, *VDR* e *CYP27B1*)

(ENGELMAN et al., 2008; GAN et al., 2007; GIRARDOT et al., 2005; OGUNKOLADE et al., 2002). Diversas interações entre locos (epistasia) e combinações genotípicas poderiam acontecer entre estes genes e uma investigação abrangendo todas estas possibilidades seria de importância na avaliação destas rotas metabólicas. Além disso, bovinos *Bos indicus* foram ao longo de vários anos selecionados naturalmente para suportar altas taxas de radiação ultravioleta nos climas tropicais (BURROW; PRAYAGA, 2004). Durante esses anos, a seleção de alelos para a característica concentrações de melanina na pele poderia indiretamente selecionar alelos para a característica concentrações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ plasmático e vice-versa.

7.3.2.2. Associação de polimorfismos nos genes *MC1R* (loco *Extension*), *DBP* e *CAST* com maciez e cor de carne

Não houve diferenças para maciez de carne nos diferentes tempos de maturação ($P \geq 0,26$) entre os genótipos no loco *Extension*, localizados no gene *MC1R* (Tabela 21). Embora os genótipos no loco *Extension* foram associados com as concentrações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ plasmático, eles não foram associados com as concentrações de cálcio no plasma e músculo (Tabela 19). Algum efeito das maiores concentrações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma poderia ter sido observado sobre maciez de carne, mas geralmente isso ocorre quando são verificadas maiores concentrações de cálcio no plasma e, principalmente, no músculo (MONTGOMERY et al., 2002, 2004b; SWANEK et al., 1999). Até o momento, não há trabalhos relacionando genótipos no loco *Extension* com maciez de carne bovina.

Diferenças nos valores de L^* , a^* e a^*/b^* dos bifes maturados entre os genótipos no loco *Extension* não foram observadas ($P \geq 0,23$), mas diferenças nos valores de b^* foram encontradas no dia um (1) de maturação ($P=0,04$) (Tabela 21). Bifes de animais com genótipos homozigotos *E/E* tiveram maiores ($P=0,04$) valores de b^* do que os bifes de animais com genótipos heterozigotos *E/e*. A substituição do alelo *E* por *e* reduziu ($P=0,04$) os valores de b^* , em média, 2,64. Carne mais amarelada para animais com genótipos *E/E* poderia ser um resultado das maiores concentrações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma daqueles animais (Tabela 19). Alguns trabalhos observaram efeito o antioxidante da vitamina D₃ e seus metabólitos em carne, com aumento em valores de a^* e b^* (LOBO-JR. et al., 2012; WIEGAND et al., 2002).

Tabela 21. Efeito das combinações alélicas no loco *Extension*, localizado no gene receptor melanocortina-1 (*MC1R*), sobre maciez e cor de carne em animais da raça Nelore

Variável	Dia	Genótipo			P	Efeito de substituição	P
		<i>E/E</i> (n=82)	<i>E/e</i> (n=4)	<i>e/e</i>		<i>E</i> → <i>e</i>	
MFI	1	55,9 (1,42)	50,4 (6,97)	-	0,44	-5,49 (7,076)	0,44
	7	77,2 (2,48)	74,9 (9,06)	-	0,80	-2,27 (8,950)	0,80
	14	98,9 (1,85)	102,3 (9,09)	-	0,71	3,44 (9,232)	0,71
FC (kg)	1	8,8 (0,22)	7,5 (1,08)	-	0,26	-1,26 (1,100)	0,26
	7	7,5 (0,16)	6,8 (0,78)	-	0,40	-0,66 (0,788)	0,40
	14	6,0 (0,14)	6,5 (0,70)	-	0,47	0,52 (0,712)	0,47
<i>L</i> *	1 ^δ	23,5 (0,62)	22,2 (2,44)	-	0,58	-1,35 (2,426)	0,58
	7	30,8 (0,37)	31,2 (1,82)	-	0,83	0,41 (1,850)	0,83
	14	27,8 (0,41)	26,7 (2,00)	-	0,58	-1,13 (2,033)	0,58
<i>a</i> *	1 ^δ	22,4 (0,53)	20,6 (1,50)	-	0,23	-1,73 (1,434)	0,23
	7	18,1 (0,30)	16,6 (1,38)	-	0,29	-1,48 (1,389)	0,29
	14	21,4 (0,31)	22,1 (1,54)	-	0,66	0,69 (1,560)	0,66
<i>b</i> *	1 ^δ	14,7 (0,36) ^a	12,1 (1,29) ^b	-	0,04	-2,64 (1,268)	0,04
	7	16,2 (0,23)	14,6 (1,06)	-	0,13	-1,62 (1,069)	0,13
	14	17,1 (0,27)	17,3 (0,90)	-	0,77	0,26 (0,886)	0,77
<i>a</i> */ <i>b</i> *	1 ^δ	1,6 (0,06)	1,8 (0,19)	-	0,33	0,18 (0,186)	0,33
	7	1,2 (0,02)	1,2 (0,09)	-	0,57	0,05 (0,097)	0,57
	14	1,3 (0,02)	1,3 (0,08)	-	0,89	0,01 (0,082)	0,89

Legenda: n = número de animais avaliados; DIA = dia de maturação; MFI = Índice de Fragmentação Miofibrilar; FC = força de cisalhamento; *L** = valores de *L** (luminosidade, variando do mais escuro ao mais claro); *a** = valores de *a** (cromaticidade, variando do verde ao vermelho); *b** = valores de *b** (cromaticidade, variando do azul ao amarelo); *a**/*b** = razão entre os valores de *a** e *b** (maiores valores indicam carne mais vermelha e menos descolorida); e ^δ = *E/E* (n=81) e *E/e* (n=4). ^{a,b}Médias de quadrados mínimos com diferentes letras sobrescritas entre os genótipos diferem estatisticamente pelo teste *t-Student* (P=0,04).

Os genótipos de ambos os polimorfismos rs136359868 e rs135330728 no gene *DPB* não foram associados com os valores de MFI e força de cisalhamento em carne maturada (P≥0,27) (Tabela 22). Entretanto, os genótipos do polimorfismo rs136359868 foram associados (P=0,07) com os valores de *L**, *a** e *a**/*b** em bifes maturados por um (1) dia e os genótipos do polimorfismo rs135330728 foram associados (P≤0,08) com os valores de *L**, *a** e *a**/*b** em bifes maturados por sete (7) dias. No geral, os animais com genótipos C/T nos polimorfismos rs136359868 e rs135330728 tiveram os bifes mais escuros e vermelhos (P≤0,06) do que os animais com os genótipos T/T no dia um (1) e sete (7) de maturação, respectivamente. A substituição do alelo T por C reduziu

($P=0,07$) os valores de L^* em média 3,70 e aumentou ($P=0,07$) os valores de a^* e a^*/b^* em média 2,32 e 0,28 somente no polimorfismo rs136359868.

Carne maturada com cor mais escura e vermelha de animais com genótipo C/T nos polimorfismos rs136359868 e rs135330728 do gene *DBP* poderiam estar relacionadas com as diferenças observadas nas concentrações de eumelanina e melanina total na pele daqueles animais (Tabela 20). As concentrações de eumelanina e melanina total na pele dos animais com genótipo C/T do polimorfismo rs136359868 foram as mais altas, embora as concentrações de melanina total na pele dos animais com genótipo C/T do polimorfismo rs135330728 foram as mais baixas. As concentrações de eumelanina e melanina total na pele foram correlacionadas positivamente com os valores de L^* e negativamente com os valores de a^* , b^* e a^*/b^* (Capítulo 6). Portanto, as maiores concentrações de eumelanina e melanina total na pele parecem estar relacionadas com a piora na cor de carne, aumentando a perda de água e a descoloração. Este padrão de resposta, entre as concentrações de eumelanina e melanina total na pele com os valores de L^* e a^* , foram somente verificados no polimorfismo rs135330728, mas não no polimorfismo rs136359868. Pele mais pigmentada tem sido relacionada com um sistema de defesa antioxidante do músculo mais desprotegido devido à mobilização de antioxidantes para neutralizar os radicais livres e combater os processos oxidativos na pele (BRENNER; HEARING, 2008; GALVAN; ALONSO-ALVAREZ, 2009; HORAK et al., 2010).

Tabela 22. Efeito de polimorfismos de um único nucleotídeo (rs136359868 e rs135330728) no gene da proteína ligante à vitamina D₃ (*DBP*) sobre maciez e cor de carne em animais da raça Nelore (Continua)

Variável	Dia	Genótipo			P	Efeito de substituição	P
rs136359868							
		C/C	C/T (n=6)	T/T (n=80)		T → C	
MFI	1	-	49,7 (5,62)	56,1 (1,43)	0,27	-6,44 (5,779)	0,27
	7	-	77,2 (7,31)	77,1 (2,57)	1,00	0,03 (7,461)	1,00
	14	-	97,9 (7,37)	99,1 (1,88)	0,88	-1,19 (7,579)	0,88
FC (kg)	1	-	9,5 (0,88)	8,7 (0,22)	0,37	0,82 (0,905)	0,37
	7	-	8,0 (0,63)	7,5 (0,16)	0,42	0,53 (0,646)	0,42
	14	-	5,9 (0,57)	6,0 (0,14)	0,81	-0,14 (0,586)	0,81

Legenda: n = número de animais avaliados; DIA = dia de maturação; MFI = Índice de Fragmentação Miofibrilar; FC = força de cisalhamento; L^* = valores de L^* (luminosidade, variando do mais escuro ao mais claro); a^* = valores de a^* (cromaticidade, variando do verde ao vermelho); b^* = valores de b^* (cromaticidade, variando do azul ao amarelo); a^*/b^* = razão entre os valores de a^* e b^* (maiores valores indicam carne mais vermelha e menos descolorida); δ = C/T (n=6) e T/T (n=79); e ϕ = C/C (n=44), C/T (n=37) e T/T (n=4). ^{a,b}Médias de quadrados mínimos com diferentes letras sobrescritas entre os genótipos diferem estatisticamente pelo teste *t-Student* ($P \leq 0,06$)

Tabela 22. Efeito de polimorfismos de um único nucleotídeo (rs136359868 e rs135330728) no gene da proteína ligante à vitamina D₃ (*DBP*) sobre maciez e cor de carne em animais da raça Nelore (Continuação)

Variável	Dia	Genótipo			P	Efeito de substituição	P
rs136359868							
		C/C	C/T (n=6)	T/T (n=80)		T → C	
L *	1 ^δ	-	20,0 (1,93) ^b	23,7 (0,65) ^a	0,07	-3,70 (1,988)	0,07
	7	-	31,5 (1,47)	30,7 (0,38)	0,63	0,73 (1,516)	0,63
	14	-	26,8 (1,62)	27,9 (0,41)	0,54	-1,03 (1,667)	0,54
a *	1 ^δ	-	24,4 (1,26) ^a	22,1 (0,61) ^b	0,07	2,32 (1,251)	0,07
	7	-	16,9 (1,10)	18,1 (0,28)	0,30	-1,19 (1,134)	0,30
	14	-	21,7 (1,24)	21,4 (0,32)	0,80	0,33 (1,281)	0,80
b *	1 ^δ	-	14,4 (1,07)	14,7 (0,38)	0,84	-0,23 (1,102)	0,84
	7	-	15,0 (0,85)	16,3 (0,22)	0,14	-1,31 (0,872)	0,14
	14	-	16,7 (0,73)	17,1 (0,27)	0,57	-0,43 (0,743)	0,57
a*/b *	1 ^δ	-	1,9 (0,15) ^a	1,6 (0,04) ^b	0,07	0,28 (0,152)	0,07
	7	-	1,2 (0,08)	1,2 (0,02)	0,68	0,03 (0,080)	0,68
	14	-	1,3 (0,06)	1,3 (0,02)	0,28	0,07 (0,067)	0,28
rs135330728							
		C/C (n=45)	C/T (n=37)	T/T (n=4)		T → C	
MFI	1	56,6 (1,93)	55,5 (2,12)	48,2 (6,71)	0,48	2,28 (2,409)	0,35
	7	77,1 (3,03)	77,7 (3,26)	73,9 (8,65)	0,91	0,21 (3,030)	0,94
	14	101,4 (2,50)	96,6 (2,75)	95,1 (8,70)	0,40	4,17 (3,114)	0,18
FC (kg)	1	8,7 (0,30)	8,7 (0,33)	9,1 (1,06)	0,94	-0,03 (0,379)	0,93
	7	7,4 (0,22)	7,5 (0,24)	8,0 (0,75)	0,74	-0,16 (0,270)	0,56
	14	5,8 (0,19)	6,2 (0,21)	6,2 (0,67)	0,47	-0,29 (0,241)	0,23
L *	1 ^φ	24,0 (0,74)	23,1 (0,79)	23,1 (2,31)	0,69	0,69 (0,827)	0,41
	7	31,3 (0,49) ^a	29,9 (0,54) ^b	32,9 (1,70) ^a	0,07	0,57 (0,628)	0,36
	14	27,8 (0,56)	27,8 (0,61)	28,2 (1,94)	0,97	-0,05 (0,695)	0,95
a *	1 ^φ	22,0 (0,62)	22,7 (0,65)	22,3 (1,46)	0,52	-0,48 (0,497)	0,34
	7	17,8 (0,37) ^{ab}	18,5 (0,40) ^a	15,7 (1,28) ^b	0,08	-0,03 (0,475)	0,95
	14	21,2 (0,42)	21,7 (0,47)	20,4 (1,48)	0,55	-0,17 (0,533)	0,75
b *	1 ^φ	14,2 (0,49)	14,8 (0,52)	16,0 (1,26)	0,23	-0,74 (0,437)	0,10
	7	16,5 (0,29)	16,0 (0,32)	15,1 (1,01)	0,36	0,50 (0,363)	0,17
	14	17,0 (0,31)	17,5 (0,33)	15,9 (0,84)	0,10	-0,16 (0,300)	0,59
a*/b *	1 ^φ	1,7 (0,07)	1,7 (0,07)	1,5 (0,19)	0,78	0,02 (0,064)	0,75
	7	1,1 (0,03) ^b	1,2 (0,03) ^a	1,1 (0,09) ^{ab}	0,08	-0,05 (0,033)	0,16
	14	1,3 (0,02)	1,3 (0,03)	1,3 (0,08)	0,65	-0,02 (0,028)	0,57

Legenda: n = número de animais avaliados; DIA = dia de maturação; MFI = Índice de Fragmentação Miofibrilar; FC = força de cisalhamento; *L** = valores de *L** (luminosidade, variando do mais escuro ao mais claro); *a** = valores de *a** (cromaticidade, variando do verde ao vermelho); *b** = valores de *b** (cromaticidade, variando do azul ao amarelo); *a**/*b** = razão entre os valores de *a** e *b** (maiores valores indicam carne mais vermelha e menos descolorida); δ = C/T (n=6) e T/T (n=79); e φ = C/C (n=44), C/T (n=37) e T/T (n=4). ^{a,b}Médias de quadrados mínimos com diferentes letras sobrescritas entre os genótipos diferem estatisticamente pelo teste *t*-Student (P≤0,06).

No gene *CAST*, os genótipos no polimorfismo rs109384915 foram associados somente com os valores de MFI na carne maturada por sete (7) dias ($P=0,03$), sem nenhuma influência sobre valores de força de cisalhamento ($P\geq 0,28$) (Tabela 23). Bifes de animais com genótipos T/T apresentaram maiores valores de MFI ($P=0,03$) quando comparados aos bifes de animais com genótipos C/C e C/T, os quais tiveram valores semelhantes ($P=0,21$). A substituição do alelo T por C, resultando na troca do aminoácido valina para alanina, reduziu os valores de MFI ($P<0,01$) e a^* ($P=0,08$) na carne maturada por sete (7) dias em média 7,00 e 0,74, respectivamente. Os valores de b^* no dia um (1) de maturação também foram reduzidos ($P=0,05$) em média 0,79 quando o alelo T foi substituído por C.

Tabela 23. Efeito de polimorfismo de um único nucleotídeo (rs109384915) no gene da calpastatina (*CAST*) sobre maciez e cor de carne em animais da raça Nelore

Variável	Dia	Genótipo			P	Efeito de substituição	P
		C/C (n=22)	C/T (n=42)	T/T (n=22)		T → C	
MFI	1	55,2 (2,86)	54,1 (2,01)	59,3 (2,92)	0,36	-1,93 (2,157)	0,37
	7	71,2 (3,68) ^b	76,5 (2,72) ^b	85,1 (3,73) ^a	0,03	-7,00 (2,634)	<0,01
	14	96,2 (3,71)	97,7 (2,61)	104,1 (3,79)	0,32	-3,85 (2,784)	0,17
FC (kg)	1	8,6 (0,45)	8,9 (0,32)	8,5 (0,46)	0,78	0,03 (0,339)	0,92
	7	7,5 (0,32)	7,7 (0,22)	7,1 (0,32)	0,28	0,23 (0,240)	0,33
	14	6,1 (0,29)	6,0 (0,20)	5,8 (0,30)	0,72	0,17 (0,217)	0,44
L^*	1 ^δ	23,3 (1,06)	23,7 (0,80)	23,3 (1,07)	0,90	-0,03 (0,748)	0,97
	7	31,4 (0,75)	30,7 (0,53)	30,2 (0,77)	0,56	0,60 (0,561)	0,29
	14	27,4 (0,83)	28,1 (0,58)	27,8 (0,85)	0,78	-0,22 (0,621)	0,73
a^*	1 ^δ	21,6 (0,71)	22,3 (0,58)	23,0 (0,72)	0,30	-0,71 (0,455)	0,12
	7	17,5 (0,55)	17,8 (0,39)	19,0 (0,57)	0,15	-0,74 (0,416)	0,08
	14	21,5 (0,64)	21,3 (0,45)	21,5 (0,65)	0,95	0,04 (0,477)	0,93
b^*	1 ^δ	13,8 (0,54)	14,8 (0,40)	13,4 (0,55)	0,11	-0,79 (0,393)	0,05
	7	16,2 (0,44)	15,9 (0,31)	16,8 (0,44)	0,29	-0,25 (0,328)	0,45
	14	16,9 (0,41)	17,2 (0,32)	17,1 (0,42)	0,78	-0,13 (0,277)	0,64
a^*/b^*	1 ^δ	1,7 (0,09)	1,6 (0,07)	1,6 (0,09)	0,80	0,04 (0,059)	0,51
	7	1,1 (0,04)	1,2 (0,03)	1,2 (0,04)	0,55	-0,03 (0,030)	0,29
	14	1,3 (0,03)	1,2 (0,02)	1,3 (0,03)	0,38	0,01 (0,025)	0,73

Legenda: n = número de animais avaliados; DIA = dia de maturação; MFI = Índice de Fragmentação Miofibrilar; FC = força de cisalhamento; L^* = valores de L^* (luminosidade, variando do mais escuro ao mais claro); a^* = valores de a^* (cromaticidade, variando do verde ao vermelho); b^* = valores de b^* (cromaticidade, variando do azul ao amarelo); a^*/b^* = razão entre os valores de a^* e b^* (maiores valores indicam carne mais vermelha e menos descolorida); e δ = C/C (n=22) C/T (n=41) e T/T (n=22). ^{a,b}Médias de quadrados mínimos com diferentes letras sobrescritas entre os genótipos diferem estatisticamente pelo teste *t-Student* ($P\leq 0,05$).

Diferenças na atividade de calpastatina poderiam explicar as diferenças na fragmentação miofibrilar entre os genótipos no polimorfismo rs109384915, uma vez que calpastatina é um importante inibidor das enzimas calpaínas, as quais são responsáveis pela proteólise miofibrilar e melhora na maciez de carne (KOOHMARAIE et al., 1991; SHACKELFORD et al., 1991, 1994; WHEELER et al., 1990). Alguns trabalhos analisando diferentes polimorfismos no gene *CAST* têm detectado diferenças na atividade de calpastatina e/ou valores de MFI, mas não nos valores de força de cisalhamento (CHUNG et al., 2001; CURI et al., 2010). Por outro lado, há também trabalhos que têm observado associação de polimorfismos no gene *CAST* com valores de força de cisalhamento (CAFE et al., 2010; PINTO et al., 2010; SCHENCKEL et al., 2006; SMITH et al., 2009). A força de cisalhamento é uma característica influenciada por diversos fatores além da proteólise miofibrilar causada pelas calpaínas (SMITH; JUDGE, 1991; WHEELER et al., 1990, 1997). Quanto as variáveis de cor, outros trabalhos também relataram associações com polimorfismos no gene *CAST* em animais de outras raças (LI et al., 2013; REARDON et al., 2010; RIBECA et al., 2012).

7.4. Conclusão

O loco *Extension* (gene *MC1R*) foi associado com as concentrações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma, enquanto os polimorfismos do gene *DBP* foram associados com as concentrações de melanina na pele. Ambos, o loco *Extension* e os polimorfismos do gene *DBP*, foram associados com as variáveis da cor de carne e estas associações poderiam ser atribuídas às diferenças nas concentrações de 1,25-di-hidróxi-vitamina D₃ no plasma e de melanina na pele observadas em função dos genótipos dos animais. Todavia, nenhuma associação do loco *Extension* e dos polimorfismos no gene *DBP* com cálcio plasmático e muscular, como também, com maciez de carne foi encontrada. Polimorfismo no gene *CAST* foi significativamente associado com fragmentação miofibrilar e cor de carne maturada, mas não com força de cisalhamento. Estudos envolvendo maior número de animais devem ser realizados, visando confirmar os resultados deste trabalho. Uma maior variação nas cores de pele entre animais de diferentes raças poderiam auxiliar no entendimento das relações entre as características avaliadas neste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADALSTEINSSON, S.; BJARNADOTTIR, S.; VAGE, D. I.; JONMUNDSSON, J. V. Brown coat color in Icelandic cattle produced by the loci Extension and Agouti. **Journal of Heredity**, v.86, p.395–398, 1995.
- AHN, J.; YU, K.; STOLZENBERG-SOLOMON, R.; SIMON, K. C.; MCCULLOUGH, M. L.; GALLICCHIO, L.; JACOBS, E. J.; ASCHERIO, A.; HELZLSOUER, K.; JACOBS, K. B.; LI, Q.; WEINSTEIN, S. J.; PURDUE, M.; VIRTAMO, J.; HORST, R.; WHEELER, W.; CHANOCK, S.; HUNTER, D. J.; HAYES, R. B.; KRAFT, P.; ALBANES, D. Genome-wide association study of circulating vitamin D levels. **Human Molecular Genetics**, v.19, p.2739-2745, 2010.
- ALALUF, S.; ATKINS, D.; BARRETT, K.; BLOUNT, M.; CARTER, N.; HEATH, A. Ethnic variation in melanin content and composition in photoexposed and photoprotected human skin. **Pigment Cell Research**, v.15, p.112-118, 2002.
- ALALUF, S.; BARRETT, K.; BLOUNT, M.; CARTER, N. Ethnic variation in tyrosinase and TYRP1 expression in photoexposed and photoprotected human skin. **Pigment Cell Research**, v.16, p.35–42, 2003.
- AMAKIRI, S. F. Melanin and DOPA-positive cells in the skin of tropical cattle. **Acta Anatomica**, v.103, p.434-444, 1979.
- AMSA. American Meat Science Association. **Research guidelines for cookery, sensory evaluation and instrumental tenderness of fresh meat**. Chicago, IL, 1995.
- AMSA. American Meat Science Association. **Meat color measurement guidelines**. Champaign, IL, 2012.
- ARPORNMAEKLONG, P.; BROWN, S. E.; WANG, Z.; KREBSBACH, P. H. Phenotypic characterization, osteoblastic differentiation, and bone regeneration capacity of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells And Development**, v.18, p.955-968, 2009.
- BARENDSE, W. J. 2002. DNA markers for meat tenderness. International patent application PCT/AU02/00122. International patent publication WO 02/064820 A1.
- BELL, N. H.; GREENE, A.; EPSTEIN, S.; OEXMANN, M. J.; SHAW, S.; SHARY, J. Evidence for alteration of the vitamin D-endocrine system in blacks. **The Journal of Clinical Investigation**, v.76, p.470-473, 1985.

- BISHOP, M. D.; KOOHMARAIE, M.; KILLEFER, J.; KAPPES, S. Rapid communication: Restriction fragment length polymorphisms in the bovine *calpastatin* gene. **Journal of Animal Science**, v.71, p.2277, 1993.
- BOLEMAN, S. J.; BOLEMAN, S. L.; MILLER, R. K.; TAYLOR, J. F.; CROSS, H. R.; WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M.; SHACKELFORD, S. D.; MILLER, M. F.; WEST, R. L.; JOHNSON, D. D.; SAVELL, J. W. Consumer evaluation of beef of known categories of tenderness. **Journal Animal Science**, v.75, p.1521, 1997.
- BONILLA, C.; BOXILL, L. A.; DONALD, S. A.; WILLIAMS, T.; SYLVESTER, N.; PARRA, E. J.; DIOS, S.; NORTON, H. L.; SHRIVER, M. D.; KITTLES, R. A. The 8818G allele of the agouti signaling protein (ASIP) gene is ancestral and is associated with darker skin colour in African Americans. **Human Genetic**, v.116, p.402–406, 2005.
- BURROW, H. M.; PRAYAGA, K. C. Correlated responses in productive and adaptive traits and temperament following selection for growth and heat resistance in tropical beef cattle. **Livestock Production Science**, v.86, p.143–161, 2004.
- BRENNER, M.; HEARING, V. J. The Protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin. **Photochemistry and Photobiology**, v.84, p.539-549, 2008.
- CAFE, L. M. ; McINTYRE, B. L.; ROBINSON, D. L.; GEESINK, G. H.; BARENDSE, W.; PETHICK, D. W.; THOMPSON, J. M.; GREENWOOD, P. L. Production and processing studies on calpain-system gene markers for tenderness in Brahman cattle: 2. Objective meat quality¹. **Journal of Animal Science**, v.88, p.3059-3069, 2010.
- CAPIATI, D.A.; VAZQUEZ, G. INON, M.T.T.; BOLAND, R.L. Role of protein kinase C in 1,25(OH)₂-vitamin D₃ modulation of intracellular calcium during development of skeletal muscle cells in culture. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.77, p.200-212, 2000.
- CARNAGEY, K.M.; HUFF-LONERGAN, E.J.; TRENKLE, A.; WERTZ-LUTZ, A.E.; HORST, R.L.; BEITZ, D.C. Use of 25-hydroxyvitamin D₃ and vitamin E to improve tenderness of beef from the *Longissimus dorsi* of heifers. **Journal of Animal Science**, v.86, p.1649-1657, 2008a.
- CARNAGEY, K.M.; HUFF-LONERGAN, E.J.; LONERGAN, S.M.; TRENKLE, A.; HORST, R.L.; BEITZ, D.C. Use of 25-hydroxyvitamin D₃ and dietary calcium to improve tenderness of beef from the round of beef cows. **Journal of Animal Science**, v.86, p.1637-1648, 2008b.

- CARPENTER, C. E.; CORNFORTH, D. P.; WHITTIER, D. Consumer preferences for beef color and packaging did not affect eating satisfaction. **Meat Science**, v.57, p.359-363, 2001.
- CARRUTHERS, C. R.; PLANTE, Y.; SCHMUTZ, S. M. Comparison of Angus cattle populations using gene variants and microsatellites. **Canadian Journal of Animal Science**, v.91, p.81-85, 2011.
- CARVALHO, M. E. **Caracterização da frequência de polimorfismos em genes ligados à maciez da carne em bovinos da raça Nelore**. Pirassununga: FZEA, 2008. 56p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/FZEA, 2008.
- CASAS, E.; WHITE, S. N.; WHEELER, T. L.; SHACKELFORD, S. D.; KOOHMARAE, M.; RILEY, D. G.; CHASE-JR., C. C.; JOHNSON, D. D.; SMITH, T. P. L. Effects of calpastatin and {micro}-calpain markers in beef cattle on tenderness traits. **Journal of Animal Science**, v.84, p.520–525, 2006.
- CAVALIER, E.; ROZET, E.; GADISSEUR, R.; CARLISI, A.; MONGE, M.; CHAPELLE, J. P.; HUBERT, P.; SOUBERBIELE, J. C.; DELANAYE, P. Measurement uncertainty of 25-OH vitamin D determination with different commercially available kits: Impact on the clinical cut offs. **Osteoporosis International**, v.21, p.1047-1051, 2010.
- CENA, K.; MONTEITH, J. L. Transfer processes in animal coats. I. Radiative transfer. **Proceedings Royal Society of London**, v.B188, p.377-393, 1975.
- CIE. Commission International de l'Eclairage. **Recommendations on uniform color spaces, color difference equations, psychometric color terms**. Publicação CIE No.15, Suppl.2, Bureau Central de la CIE, Paris, França, 1976.
- CHO, Y.M.; CHOI, H.; HWANG, I.H.; KIM, Y.K; MYUNG, K.H. Effects of 25-hydroxyvitamin D₃ and manipulated dietary cation-anion difference on the tenderness of beef from cull native Korean cows. **Journal of Animal Science**, v.84, p.1481-1488, 2006.
- CHUNG, H. Y.; DAVIS, M. E.; HINES, H. C. Genetic variants detected by PCR±RFLP in intron 6 of the bovine calpastatin gene. **International Society for Animal Genetics, Animal Genetics**, v.32, p.40-53, 2001.
- CORVA, P.; SORIA, L.; SCHOR, A.; VILLARREAL, E.; CENCI, M. P.; MOTTER, M.; MEZZADRA, C.; MELUCCI, L.; MIQUEL, C.; PAVÁN, E.; DEPETRIS, G.; SANTINI, F.; NAÓN, J. G. Association of CAPN1 and CAST gene polymorphisms with meat tenderness in *Bos taurus* beef cattle from Argentina. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, p.1064-1069, 2007.

- CROUSE, J. D.; SEIDMAN, S. C.; CUNDIFF, L. V. The effect of carcass electrical stimulation on meat obtained from *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. **Journal of Food Quality**, v.10, p.407-416, 1987.
- CROUSE, J. D.; CUNDIFF, L. V.; KOCH, R. M.; KOOHMARAIE, M.; SEIDEMAN, S. C. Comparisons of *Bos indicus* and *Bos taurus* inheritance for carcass beef characteristics and meat palatability. **Journal of Animal Science**, v. 67, n.10, p.2661-2668, 1989.
- CULLER, R. D.; PARRISH, F. C.; SMITH, G. C.; CROSS, H. R. Relationship of myofibril fragmentation index to certain chemical, physical and sensory characteristics of bovine *Longissimus* muscle. **Journal of Food Science**, v.43, p.1177-1180, 1978.
- CURI, R. A.; CHARDULO, L. A. L.; GIUSTI, J.; SILVEIRA, A. C.; MARTINS, C. L.; OLIVEIRA, H. N. 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 Science**, v.86, p.915–920, 2010.
- DESCALZO, A. M.; INSANI, E. M.; BIOLATTO, A.; SANCHO, A. M.; GARCIA, P. T.; PENSEL, N. A.; JOSIFOVICH, J. A. Influence of pasture or grain-based diets supplemented with vitamin E on antioxidant/oxidative balance of Argentine beef. **Meat Science**, v.70, p.35-44, 2005.
- DRANSFIELD, E. Modelling post-mortem tenderisation III: Role of calpain I in conditioning. **Meat Science**, v.31, p.85-94, 1992.
- ELLIS, M.; MCKEITH, F.; SOSNICKI, A. **Nutritional Influences on Pork Quality**. Des Moines: American Meat Science Association, 2000. 345p.
- ELLISON, T. I.; DOWD, D. R.; MACDONALD, P. N. Calmodulin-dependent kinase IV stimulates vitamin D receptor-mediated transcription. **Molecular Endocrinology**, v.19, p.2309–2319, 2005.
- ENGELMAN, C. D.; FINGERLIN, T. E.; LANGEFELD, C. D.; HICKS, P. J.; RICH, S. S.; WAGENKNECHT, L. E.; BOWDEN, D. W.; NORRIS, J. M. Genetic and Environmental Determinants of 25-Hydroxyvitamin D and 1,25-Dihydroxyvitamin D Levels in Hispanic and African Americans. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.93, p.3381–3388, 2008.
- FERNANDEZ, L. M.; MASSHEIMER, V.; BOLAND, A. R. Cyclic AMP-dependent membrane protein phosphorylation and calmodulin binding are involved in the rapid stimulation of muscle calcium uptake by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. **Calcified Tissue International**, v.47, p.314-319, 1990.

- FERRAZ, J. B. S.; PINTO, L. F. B.; MEIRELLES, F. V.; ELER, J. P.; REZENDE, F. M.; OLIVEIRA, E. C. M.; ALMEIDA, H. B.; WOODWARD, B.; NKRUMAH, D. Association of single nucleotide polymorphisms with carcass traits in Nellore cattle. **Genetics and Molecular Research**, v.8, p.1360-1366, 2009.
- FERRERI, M.; GAO, J.; REN, G.; CHEN, L.; SU, J.; HAN, B. Variability of Osteocalcin Status in Chinese Holstein Cattle: Do Phylogeny, Vitamin D or Gene Polymorphisms Matter? **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.24, p.173-180, 2011.
- FIEMS, L. O.; DE-CAMPENEERE, S.; DE-SMET, S.; VAN-DE-VOORDE, G.; VANACKER, J. M.; BOUCQUE, CH. V. Relationship between fat depots in carcasses of beef bulls and effect on meat colour and tenderness. **Meat Science**, v.56, p.41-47, 2000.
- FINCH, V. A.; WESTERN, D. Cattle colors in pastoral herds: natural selection or social preference. **Ecology**, v.58, p.1384, 1977.
- FINCH, V. A.; BENNETT, I. L.; HOLMES, C. R. Coat colour in cattle: effect on thermal balance, behaviour and growth, and relationship with coat type. **Journal of Agricultural Science**, 102:141-147, 1984.
- FONTANESI, L.; BERETTI, F.; RIGGIO, V.; DALL'OLIO, S.; CALASCIBETTA, D.; RUSSO, V.; PORTOLANO, B. Sequence characterization of the melanocortin 1 receptor (*MC1R*) gene in sheep with different coat colours and identification of the putative *e* allele at the ovine *Extension* locus. **Small Ruminant Research**, v.91, p.200-207, 2010.
- FOOTE, M. R.; HORST, R. L.; HUFF-LONERGAN, E. J.; TRENKLE, A. H.; PARRISH JR., F. C.; BEITZ, D. C. The use of vitamin D₃ and its metabolites to improve beef tenderness. **Journal of Animal Science**, v.82, p.242-249, 2004.
- GALVAN, I.; ALONSO-ALVAREZ, C. The expression of melanin-based plumage is separately modulated by exogenous oxidative stress and a melanocortin. **Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, v.276, p.3089-3097, 2009.
- GAN, H. Y.; LI, J. B.; WANG, H. M.; GAO, Y. D.; LIU, W. H.; LI, J. P.; ZHONG, J. F. Allele frequencies of TYR and MC1R in Chinese native cattle. **Animal Science Journal**, v.78, p.484-488, 2007.
- GARCIA, P. T.; PENSEL, N. A.; LATIMORI, N. J.; KLOSTER, A. M.; AMIGONE, M. A.; CASAL, J. J. Intramuscular lipids in steers under different grass and grain regimen. **Fleischwirtschaft International**, v.1, p.27-31, 2005.

- GEESINK, G. H.; KOOLMEES, P. A.; VAN LAACKB, H. L. J. M.; SMULDERS, E. J. M. Determinants of tenderisation in beef *Longissimus dorsi* and *Triceps brachii* muscles. **Meat Science**, v.41, p.7-17, 1995.
- GILCHREST, B. A.; ZHAI, S.; ELLER, M. S.; YAROSH, D. B.; YAAR, M. Treatment of human melanocytes and S91 melanoma cells with the DNA repair enzyme T4 endonuclease V enhances melanogenesis after ultraviolet irradiation. **The Journal of Investigative Dermatology**, v.101, p.666-672, 1993.
- GILL, J. L.; BISHOP, S. C.; MCCORQUODALE, C.; WILLIAMS, J. L.; WIENER, P. Association of selected SNP with carcass and taste panel assessed meat quality traits in a commercial population of Aberdeen Angus-sired beef cattle. **Genetics Selection Evolution**, v.41, p.36-47, 2009.
- GUILLEMIN, N.; JURIE, C.; RENAND, G.; HOCQUETTE, J. F.; MICOL, D.; LEPETIT, J.; PICARD, B. Different phenotypic and proteomic markers explain variability of beef tenderness across muscles. **International Journal of Biology**, v.4, p.26-38, 2012.
- GIRARDOT, M.; MARTIN, J.; GUIBERT, S.; LEVEZIEL, H.; JULIEN, R.; OULMOUDEN, A. Widespread expression of the bovine Agouti gene results from at least three alternative promoters. **Pigment Cell Research**, v.18, p.34–41, 2005.
- GIROLAMI, A.; NAPOLITANO, F.; FARAONE, D.; BRAGHIERI, A. Measurement of meat color using a computer vision system. **Meat Science**, v.93, p.111-118, 2013.
- GLITSCH, K. Consumer perceptions of fresh meat quality: cross-national comparison. **British Food Journal**, v.102, p.177-194, 2000.
- GOMES, R. C.; SAINZ, R. D.; SILVA, S. L.; CESAR, M. C.; BONIN, M. N.; LEME, P. R. Feedlot performance, feed efficiency reranking, carcass traits, body composition, energy requirements, meat quality and calpain system activity in Nellore steers with low and high residual feed intake. **Livestock Science**, v.150, p.265-273, 2012.
- HAFEZ, E. S. E.; BADRELDIN, A. L.; SHAFEI, M. M. The hair coat in bovine. **Empire Journal of Experimental Agriculture**, v.23, p.34-39, 1955.
- HAGENAU, T.; VEST, R.; GISSEL, T. N.; POULSEN, C. S.; ERLANDSEN, M.; MOSEKILDE, L.; VESTERGAARD, P. Global vitamin D levels in relation to age, gender, skin pigmentation and latitude: an ecologic meta-regression analysis. **Osteoporosis International**, v.20, p.133–140, 2009.
- HAMDEN, K.; CARREAU, S.; JAMOUCSI, K.; MILADI, S.; LAJMI, S.; ALOULOU, D.; AYADI, F.; ELFEKI, A. 1 α ,25 Dihydroxyvitamin D₃: Therapeutic and preventive effects against oxidative stress, hepatic, pancreatic and renal injury in alloxan-

- induced diabetes in rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v.55, p.215-222, 2009.
- HANSEN, S.; FRYLINCK, L.; STRYDOM, P. E. The effect of vitamin D₃ supplementation on texture and oxidative stability of beef loins from steers treated with zilpaterol hydrochloride. **Meat Science**, v.90, p.145-151, 2012.
- HARDING, R. M.; HEALY, E.; RAY, A. J.; ELLIS, N. S.; FLANAGAN, N.; TODD, C.; DIXON, C.; SAJANTILA, A.; JACKSON, I. J.; BIRCH-MACHIN, M. A.; REES, J. L. Evidence for variable selective pressures at MC1R. **American Journal of Human Genetics**, v.66, p.1351–1361, 2000.
- HARRIS, S. S.; DAWSON-HUGHES, B. Seasonal changes in plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations of young american black and white. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.67, p.1232–1236, 1998.
- HEIJBOER, A. C.; BLANKENSTEIN, M. A.; KEMA, I. P.; BUIJS, M. M. Accuracy of 6 routine 25-hydroxyvitamin D assays: Influence of vitamin D binding protein concentration. **Clinical Chemistry**, v.58, p.543-548, 2012.
- HELGESON, S. C.; SCHMUTZ, S. M. Genetic variation in the pro-melanin-concentrating hormone gene affects carcass traits in *Bos taurus* cattle. **Animal Genetics**, v.39, p.310–315, 2008.
- HERNANDEZ, L. The antiproliferative role of ERG K⁺ channels in rat osteoblastic cells. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v.47, p.199-208, 2007.
- HOLICK, M. F. Vitamin D, sunlight and cancer connection. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry- Anti-Cancer Agents**, v.13, p.70-82, 2013.
- HOLLIS, B. W.; KAMERUD, J. Q.; KURKOWSKI, A.; BEAULIEU, J.; NAPOLI, J. L. Quantification of circulating 1,25-dihydroxyvitamin D by radioimmunoassay with ¹²⁵I-labeled tracer. **Clinical Chemistry**, v.42, p.586-592, 1996.
- HOLLIS, B. W. **Circulating 25-hydroxyvitamin D levels indicative of vitamin D sufficiency: implications for establishing a new effective dietary intake recommendation for vitamin D.** In: SYMPOSIUM: VITAMIN D INSUFFICIENCY: A SIGNIFICANT RISK FACTOR IN CHRONIC DISEASES AND POTENTIAL DISEASE-SPECIFIC BIOMARKERS OF VITAMIN D SUFFICIENCY. American Society for Nutritional Sciences. p.317-322, 2005.
- HOLLIS, B. W.; HORST, R. L. The assessment of circulating 25(OH)D and 1,25(OH)₂D: Where we are and where we are going. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v.103, p.473-476, 2007.

- HOLLIS, B. W. Measuring 25-hydroxyvitamin D in a clinical environment: Challenges and needs. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.88 (Suppl), p.507S–510S, 2008.
- HOPKINS, D. L.; LITTLEFIELD, P. J.; THOMPSON, J. M. A research note on factors affecting the determination of myofibrillar fragmentation. **Meat Science**, v.56, p.19-22, 2000.
- HOPKINS, D. L.; MARTIN, L.; GILMOUR, A. R. The impact of homogenizer type and speed on the determination of myofibrillar fragmentation. **Meat Science**, v.67, p.705-710, 2004.
- HORAK, P.; SILD, E.; SOOMETS, U.; SEPP, T.; KILK, K. Oxidative stress and information content of black and yellow plumage coloration: an experiment with greenfinches. **The Journal of Experimental Biology**, v.213, p.2225-2233, 2010.
- HORST, R. L.; LITTLEDIKE, E. T.; RILEY, J. L.; NAPOLI, J. L. Quantitation of vitamin D and its metabolites and their plasma concentrations in five species of animals. **Analytical Biochemistry**, v.116, p.189-203, 1981.
- HORST, R. L.; LITTLEDIKE, E. T. Comparison of plasma concentrations of vitamin D and its metabolites in young and aged domestic animals. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.73B, p.485-489, 1982.
- HUFF, E. J.; PARRISH JR, F. C. Bovine *Longissimus* muscle tenderness as affected by postmortem aging time, animal age and sex. **Journal of Food Science**, v.58, n.4, p.713-716, 1993.
- HUNT, G.; DONATIEN, P.; LUNEC, J.; TODD, C.; KYNE, S.; THODY, A. Cultured human melanocytes respond to MSH peptides and ACTH. **Pigment Cell Research**, v.7, p.217–221, 1994.
- HUTCHINSON, J. C. D.; BROWN, G. D. Penetrance of cattle coats by radiation. **Journal of Applied Physiology**, v.26, p.454-464, 1969.
- JABLONSKI, N. G.; CHAPLIN, G. The evolution of human skin coloration. **Journal of Human Evolution**, v.39, p.57–106, 2000.
- JEREMIAH, L. E.; MARTIN, A. H.; ACHTYNOMICHUK, G. Effects of delayed chilling and altered carcass suspension upon beef muscle – I Physical and textural properties. **Journal of Food Quality**, v.6, n.4 p.259-271, 1984.
- JOHNSON, D. D.; HUFFMAN, R. D.; WILLIAMS, S. E. Effects of percentage Brahman and Angus breeding, age-season of feeding and slaughter end point on meat palatability and muscle characteristics. **Journal of Animal Science**, v. 68, n. 7, p. 1980-1986, 1990.

- JOO, S. T.; KAUFFMAN, R. G.; KIM, B. C.; KIM, C. J. The relationship between color and water-holding capacity in postrigor porcine *Longissimus* muscle. **Journal of Muscle Foods**, v.6, p.211-226, 1995.
- JUSZCZUK-KUBIAK, E.; ROSOCHACKI, S. J.; WICIŃSKA, K.; SZREDER, T.; SAKOWSKI, T. A novel RFLP/AIul polymorphism of the bovine calpastatin (CAST) gene and its association with selected traits of beef. **Animal Science Papers and Reports**, v.22, p.195-204, 2004.
- KARGES, K.; BROOKS, J. C.; GILL, D. R.; BREAZILE, J. E.; OWENS, F. N.; MORGAN, J. B. Effects of supplemental vitamin D₃ on feed intake, carcass characteristics, tenderness, and muscle properties of beef steers. **Journal of Animal Science**, v.79, n.11, p.2844-2850, 2001.
- KERRY, J. P.; BUCKLEY, D. J.; MORRISEY, P. A.; O'SULLIVAN, K.; LYNCH, P. B. Endogenous and exogenous α -tocopherol supplementation: effects on lipid stability (TBARS) and warmed-over flavour (WOF) in porcine M. *Longissimus dorsi* roasts held in aerobic and vacuum packs. **Food Research International**, v.31, p.211-216, 1998.
- KING, D. A.; SHACKELFORD, S. D.; KUEHN, L. A.; KEMP, C. M.; RODRIGUEZ, A. B.; THALLMAN, R. M.; WHEELER, T. L. Contribution of genetic influences to animal-to-animal variation in myoglobin content and beef lean color stability. **Journal of Animal Science**, v.88, p.1160-1167, 2010.
- KING, D. A.; SHACKELFORD, S. D.; RODRIGUEZ, A. B.; WHEELER, T. L. Effect of time of measurement on the relationship between metmyoglobin reducing activity and oxygen consumption to instrumental measures of beef *Longissimus* color stability. **Meat Science**, v.87, p.26-32, 2011.
- KLUNGLAND, H.; VAGE, D. I.; GOMEZ-RAYA, L.; ADALSTEINSSON, S.; LIEN, S. The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. **Mammalian Genome**, v.6, p.636-639, 1995.
- KOOHMARAIE, M.; WHIPPLE, G.; KRETCHMAR, D. H.; CROUSE, J. D.; MERSMANN, H. J. Postmortem proteolysis in *Longissimus* muscle from beef, lamb and pork carcasses. **Journal of Animal Science**, v.69, p.617-624, 1991.
- KOOHMARAIE, M. The role of Ca²⁺-dependent proteases (calpains) in postmortem proteolysis and meat tenderness. **Biochimie**, v.74, p.239, 1992.
- KOOHMARAIE, M. Muscle proteinases and meat ageing. **Meat Science**, v.36, p.93-104, 1994.

- KOOHMARAIE, M. Biochemical Factors Regulating the Toughening and Tenderization Processes of Meat. **Meat Science**, v.43, p.193-201, 1996.
- KOOHMARAIE, M.; GEESINK, G. H. Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. **Meat Science**, v.74, p.34–43, 2006.
- KUCHENMEISTER, U.; KUHN, G.; ENDER, E. Seasonal effects on Ca^{+2} transport of sarcoplasmic reticulum and on meat quality of pigs with different malignant hyperthermia status. **Meat Science**, v.55, p.239-245, 2000.
- KURYLOWICZ, A.; RAMOS-LOPEZ, E.; BEDNARCZUK, T.; BADENHOOP, K. Vitamin D-binding protein (DBP) gene polymorphism is associated with Graves' disease and the vitamin D status in a Polish population study. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v.114, p.329–335, 2006.
- LAHUCKY, R.; BAHNELKA, I.; KUECHENMEISTER, U.; VASICKOVA, K.; NUERNBERG, K.; ENDER, K.; NUERNBERG, G. Effects of dietary supplementation of vitamins D₃ and E on quality characteristics of pigs and *Longissimus* muscle antioxidative capacity. **Meat Science**, v.77, p.264-268, 2007.
- LAVILLE, E.; SAYD, T.; MORZEL, M.; BLINET, S.; CHAMBON, C.; LEPETIT, J.; RENAND, G.; HOCQUETTE, J. F. Proteome changes during meat aging in tough and tender beef suggest the importance of apoptosis and protein solubility for beef aging and tenderization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.10755-10764, 2009.
- LAWRENCE, T. E.; DIKEMAN, M. E.; HUNT, M. C.; KASTNER, C. L.; JOHNSON, D. E. Effects of calcium salts on beef *Longissimus* quality. **Meat Science**, v.64, p.299-308, 2003.
- LAWRENCE, T. E.; DIKEMAN, M. E.; HUNT, M. C.; KASTNER, C. L.; JOHNSON, D. E. Effects of enhancing beef *Longissimus* with phosphate plus salt, or calcium lactate plus non-phosphate water binders plus rosemary extract. **Meat Science**, v.67, p.129-137, 2004.
- LAWRENCE, R.W.; DOYLE, J.; ELLIOTT, R.; LOXTON, I.; MCMENIMAN, J.P.; NORTON, B.W.; REID, D.J.; TUME, R.W. The efficacy of a vitamin D₃ metabolite for improving the myofibrillar tenderness of meat from *Bos indicus* cattle. **Meat Science**, v.72, p.69–78, 2006.
- LEDWARD, D. A.; JOHNSTON, D. E.; KNIGHT, M. K. **The chemistry of muscle-based foods**. The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Science Park, Cambridge, U.K, p.128-139, 1992.

- LEINO, A.; TURPEINEN, U.; KOSKINEN, P. Automated Measurement of 25-OH Vitamin D₃ on the Roche Modular E170 Analyzer. **Clinical Chemistry**, v.54, p.2059-2062, 2008.
- LI, S.; GOLDBERG, E. A novel N-terminal domain directs membrane localization of mouse testis-specific calpastatin. **Biology of Reproduction**, v.63, p.1594-600, 2000.
- LI, Y.; LIU, S. Reducing lipid peroxidation for improving colour stability of beef and lamb: on-farm considerations. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.92, p.719-726, 2012.
- LI, Y. X.; JIN, H. G.; YAN, C. G.; SEO, K. S.; ZHANG, L. C.; REN, C. Y.; JIN, X. Association of CAST gene polymorphisms with carcass and meat quality traits in Yanbian cattle of China. **Molecular Biology Reports**, v.40, p.1875-1881, 2013.
- LIN, J. Y.; FISHER, D. E. Melanocyte biology and skin pigmentation. **Nature**, v.445, p.843-850, 2007.
- LITTLEDIKE, E. T.; GOLF, J. Interactions of calcium, phosphorus, magnesium and vitamin D that influence their status in domestic meat animals. **Journal of Animal Science**, v.65, p.1727-1743, 1987.
- LOBO-JR., A. R.; DELGADO, E. F.; MOURÃO, G. B.; PEDREIRA, A. C. M. S.; BERNDT, A.; DEMARCHI, J. J. A. A. Interaction of dietary vitamin D₃ and sunlight exposure on *B. indicus* cattle: Animal performance, carcass traits, and meat quality. **Livestock Science**, v.145, p.196-204, 2012.
- LONERGAN, S. M.; ERNST, C. W.; BISHOP, M. D.; CALKINS, C. R.; KOOHMARAIE, M. Relationship of restriction fragment length polymorphisms (RFLP) at the bovine calpastatin locus to calpastatin activity and meat tenderness. **Journal of Animal Science**, v.73, p.3608–3612, 1995.
- LU, D.; WILLARD, D.; PATEL, I. R.; KADWELL, S.; OVERTON, L.; KOST, T.; LUTHER, M.; CHEN, W.; WOYCHIK, R. P.; WILKISON, W. O. Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. **Nature**, v.371, p.799–802, 1994.
- MANCINI, R. A.; HUNT, M. C. Current research in meat color. **Meat Science**, v.71, p.100-121, 2005.
- MARIANTE, A. S.; MCMANUS, C. Conservação de bovinos de raças naturalizadas, visando sua inserção em sistemas de produção. In: MEDEIROS, S. R.; EUCLIDES-FILHO, K; EUCLIDES, V. P. B. (Ed.) **A produção animal e a segurança alimentar**. 21. ed. Campo Grande, MS: SBZ: Embrapa Gado de Corte, 2004. p.335-342.
- MARTINEZ, M. L.; MACHADO, M. A.; SILVA, M. V. G. B.; VERNEQUE, R. S. Perspectivas para o melhoramento genético em bovinos de leite. In: MEDEIROS, S.

- R.; EUCLIDES-FILHO, K; EUCLIDES, V. P. B. (Ed.) **A produção animal e a segurança alimentar**. 21. ed. Campo Grande, MS: SBZ: Embrapa Gado de Corte, 2004. p.343-357.
- MAZZUCCO, J. P.; MELUCCI, L. M.; VILLARREAL, E. L.; MEZZADRA, C. A.; SORIA, L.; CORVA, P.; MOTTER, M. M.; SCHOR, A.; MIQUEL, M. C. Effect of ageing and μ -calpain markers on meat quality from Brangus steers finished on pasture. **Meat Science**, v.86, p.878-882, 2010.
- MELUCCI, L. M.; PANARACE, M.; FEULA, P.; VILLARREAL, E. L.; GRIGIONI, G.; CARDUZA, F.; SORIA, L. A.; MEZZADRA, C. A.; ARCEO, M. E.; PAPALEO-MAZZUCCO, J.; CORVA, P. M.; IRURUETA, M.; ROGBERG-MUÑOZ, A.; MIQUEL, M. C. Genetic and management factors affecting beef quality in grazing Hereford steers. **Meat Science**, v.92, p.768-774, 2012.
- MERCIER, Y.; GATELLIER, P.; RENERRE, M. Lipid and protein oxidation in vitro, and antioxidant potential in meat from Charolais cows finished on pasture or mixed diet. **Meat Science**, v.66, p.467-473, 2004.
- MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v.16, p.1215, 1988.
- MONTGOMERY, J.L.; PARRISH JR, F.C.; BEITZ, D.C.; HORST, R.L.; HUFFLONERGAN, E.J.; TRENKLE, A.H. The use of vitamin D₃ to improve beef tenderness. **Journal of Animal Science**, v.78, p.2615–2621, 2000.
- MONTGOMERY, J.L.; CARR, M.A.; KERTH, C.R.; HILTON, G.G.; PRICE, B.P.; GALYEAN, M.L.; HORST, R.L.; MILLER, M.F. Effect of vitamin D₃ supplementation level on the postmortem tenderization of beef from steers. **Journal of Animal Science**, v.80, p.971–981, 2002.
- MONTGOMERY, J. L.; BLANTON JR., J. R.; HORST, R. L.; GALYEAN, M. L.; MORROW JR., K. J.; WESTER, D. B.; MILLER, M. F. Effects of biological type of beef steers on vitamin D, calcium, and phosphorus status. **Journal of Animal Science**, v.82, p.2043–2049, 2004a.
- MONTGOMERY, J.L.; KING, M.B.; GENTRY, J.G.; BARHAM, A.R.; BARHAM, B.L.; HILTON, G.G.; BLANTON, J.R.; HORST, JR., R.L.; GALYEAN, M.L.; MORROW, K.J. WESTER, JR., D. B.; MILLER, M. F. Supplemental vitamin D₃ concentration and biological type of steers. II. Tenderness, quality, and residues of beef. **Journal of Animal Science**, Albany, v.82, p.2092-2104, 2004b.

- MORGAN, J.B.; SAVELL, J.W.; HALE, D.S.; MILLER, R.K.; GRIFFEN, D.B.; CROSS, H.R.; SHACKLEFORD, S.D. National beef tenderness survey. **Journal of Animal Science**, v.69, n.8, p.3274-3283, 1991a.
- MORGAN, J.B.; MILLER, R.K.; MENDEZ, F.M.; HALE, D.S.; SAVELL, J.W. Using calcium chloride injection to improve tenderness of beef from mature cows. **Journal of Animal Science**, v.69, p.4469-4476, 1991b.
- MUROYA, S.; NEATH, K. E.; NAKAJIMA, I.; OE, M.; SHIBATA, M.; OJIMA, K.; CHIKUNI, K. Differences in mRNA expression of calpains, calpastatin isoforms and calpain/calpastatin ratios among bovine skeletal muscles. **Animal Science Journal**, v.83, p.252–259, 2012.
- NAKAMURA, R. Estimation of water-extractable Ca in chicken breast muscle by atomic absorption. **Analytical Biochemistry**, v.53, p.531-538, 1973.
- NICOLOSO, L.; NEGRINI, R.; MILANESI, E.; CREPALDI, P. Identification of polymorphism in the SCL24A5 gene of cattle. **Italian Journal of Animal Science**, v.7, p.505-512, 2008.
- NORMAN, A. W. Sunlight, season, skin pigmentation, vitamin D, and 25-hydroxyvitamin D: integral components of the vitamin D endocrine system. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.67, p.1108–1110, 1998.
- OGUNKOLADE, B. W.; BOUCHER, B. J.; PRAHL, J. M.; BUSTIN, S. A.; BURRIN, J. M.; NOONAN, K.; NORTH, B. V.; MANNAN, N.; MCDERMOTT, M. F.; DELUCA, H. F.; HITMAN, G. A. Vitamin D receptor (VDR) mRNA and VDR protein levels in relation to vitamin D status, insulin secretory capacity, and VDR genotype in Bangladeshi Asians. **Diabetes**, v.51, p.2294–2300, 2002.
- OLSON, D. G.; PARRISH-JR., F. C.; STROMER, M. H. Myofibrillar fragmentation and shear resistance of three bovine muscles during postmortem storage. **Journal of Food Science**, v.41, p.1036-1041, 1976.
- OLSON, T.A. **Genetics of colour variation**. In: FRIES, R., RUVINSKY, A. (Ed.). The genetics of cattle. New York, NY, EUA: CABI Publishing, 1999.
- OMDAHL, J. L., MORRIS, H. A., MAY, B. K. Hydroxylase enzymes of the vitamin D pathway: expression, function, and regulation. **Annual Review of Nutrition**, v.22, p.139-166, 2002.
- ONG, L.; SAW, S.; SAHABDEEN, N. B.; TEY, K. T.; HO, C. S.; SETHI, S. K. Current 25-hydroxyvitamin D assays: Do they pass the test? **Clinica Chimica Acta**, v.413, p.1127-1134, 2012.

- ORELLANA, C.; PENA, F.; GARCIA, A.; PEREA, J.; MARTOS, J.; DOMENECH, V.; ACERO, R. Carcass characteristics, fatty acid composition, and meat quality of Criollo Argentino and Braford steers raised on forage in a semi-tropical region of Argentina. **Meat Science**, v.81, p.57-64, 2009.
- PAGE, J. K.; WULF, D. M.; SCHWOTZER, T. R. A survey of beef muscle color and pH. **Journal of Animal Science**, v.79, p.678-687, 2001.
- PAGE, B. T.; CASAS, E.; HEATON, M. P.; CULLEN, N. G.; HYNDMAN, D. L.; MORRIS, C. A.; CRAWFORD, A. M.; WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M.; KEELE, J. W.; SMITH, T. P. L. Evaluation of singlenucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. **Journal of Animal Science**, v.80, p.3077–3085, 2002.
- PAGE, B. T.; CASAS, E.; QUAAS, R. L.; THALLMAN, R. M.; WHEELER, T. L.; SHACKELFORD, S. D.; KOOHMARAIE, M.; WHITE, S. N.; BENNETT, G. L.; KEELE, J. W.; DIKEMAN, M. E.; SMITH, T. P. L. Association of markers in the bovine CAPN1 gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. **Journal of Animal Science**, v.82, p.3474–3481, 2004.
- PARR, T.; JEWELL, K. K.; SENSKY, P. L.; BRAMELD, J. M.; BARDSLEY, R. G.; BUTTERY, P. J. Expression of calpastatin isoforms in muscle and functionality of multiple calpastatin promoters. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.427, p.8-15, 2004.
- PARRA, E. J.; KITTLES, R. A.; SHRIVER, M. D. Implications of correlations between skin color and genetic ancestry for biomedical research. **Nature Genetics Supplement**, v.36, p.S54-S60, 2004.
- PEDREIRA, A.C.M.S.; LUCHIARI FILHO, A.; LEITE, V.B.O.; CARVALHO, M.H. Quality characteristics of *Longissimus dorsi* muscle from *Bos indicus* animals treated with vitamin D₃. **Scientia Agricola**, v.60, n.4, p.637-642, 2003.
- PFLANZER, S. B.; FELICIO, P. E. Moisture and fat content, marbling level and color of boneless rib cut from Nellore steers varying in maturity and fatness. **Meat Science**, v.87, p.7-11, 2011.
- PINTO, L.F.B.; FERRAZ, J.B.S.; MEIRELLES, F.V.; ELER, J.P.; REZENDE, F.M.; CARVALHO, M.E.; ALMEIDA, H.B. ; SILVA, R.C.G. Association of SNPs on CAPN1 and CAST genes with tenderness in Nellore cattle. **Genetics and Molecular Research**, v.9, p.1431-1442, 2010.

- PINTO, L. F. B.; FERRAZ, J. B. S.; PEDROSA, V. B.; ELER, J. P.; MEIRELLES, F. V.; BONIN, M. N.; REZENDE, F. M.; CARVALHO, M. E.; CUCCO, D. C.; SILVA, R. C. G. Single nucleotide polymorphisms in CAPN and leptin genes associated with meat color and tenderness in Nellore cattle. **Genetics and Molecular Research**, v.10, p.2057-2064, 2011.
- POLATI, R.; MENINI, M.; ROBOTTI, E.; MILLIONI, R.; MARENGO, E.; NOVELLI, E.; BALZAN, S.; CECCONI, D. Proteomic changes involved in tenderization of bovine *Longissimus dorsi* muscle during prolonged ageing. **Food Chemistry**, v.135, p.2052-2069, 2012.
- PONNAPAKKAM, T.; KATIKANENI, R.; SUDA, H.; MIYATA, S.; MATSUSHITA, O.; SAKON, J.; GENSURE, R. C. A single injection of the anabolic bone agent, parathyroid hormone–collagen binding domain (PTH-CBD), results in sustained increases in bone mineral density for up to 12 months in normal female mice. **Calcified Tissue International**, v.91, p.196-203, 2012.
- PRINGLE, T. D.; WILLIAMS, S. E.; LAMB, B. S.; JOHNSON, D. D.; WEST, R. L. Carcass characteristics, the calpain proteinase system, and aged tenderness of Angus and Brahman crossbred steers. **Journal of Animal Science**, v.75, p.2955–2961, 1997.
- RAMOS-LOPEZ, E.; JANSEN, T.; IVASKEVICIUS, V.; KAHLES, H.; KLEPZIG, C.; OLDENBURG, J.; BADENHOOP, K. Protection from type 1 diabetes by vitamin D receptor haplotypes. **Annals New York Academy of Sciences**, v.1079, p.327–334, 2006.
- RANA, B. K.; HEWETT-EMMETT, D.; JIN, L.; CHANG, B. H. J.; SAMBUUGHIN, N.; LIN, M.; WATKINS, S.; BAMSHAD, M.; JORDE, L. B.; RAMSAY, M.; JENKINS, T.; LI, W. H. High polymorphism at the human melanocortin 1 receptor locus. **Genetics**, v.151, p.1547–1557, 1999.
- RAYNAUD, P.; JAYAT-VIGNOLES, C.; LAFORÊT, M. P.; LEVÉZIEL, H.; AMARGER, V. Four promoters direct expression of the calpastatin gene. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.437, p.69–77, 2005a.
- RAYNAUD, P.; GILLARD, M.; PARR, T.; BARDSLEY, R.; AMARGER, V.; LEVÉZIEL, H. Correlation between bovine calpastatin mRNA transcripts and protein isoforms. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.440, p.46–53, 2005b.
- REARDON, W.; MULLEN, A. M.; SWEENEY, T.; HAMILL, R. M. Association of polymorphisms in candidate genes with colour, water-holding capacity, and

- composition traits in bovine *M. longissimus* and *M. semimembranosus*. **Meat Science**, v.86, p.270-275, 2010.
- REILING, B.A.; JOHNSON, D.D. Effects of implant regimens (trenbolone acetate-estradiol administered alone or in combination with zeranol) and vitamin D₃ on fresh beef color and quality. **Journal of Animal Science**, v.81, p.135-142, 2003.
- RIBECA, C.; BONFATTI, V.; CECCHINATO, A.; ALBERA, A.; MARETTO, F.; GALLO, L.; CARNIER, P. Association of polymorphisms in calpain 1, (μ /I) large subunit, calpastatin, and cathepsin D genes with meat quality traits in double-muscled Piemontese cattle. **Animal Genetics**, 2012. doi: 10.1111/j.1365-2052.2012.02370.x
- RIBEIRO, J. S.; GONÇALVES, T. M.; LADEIRA, M. M.; TULLIO, R. R.; CAMPOS, F. R.; BERGMANN, J. A. G.; NETO, O. R. M.; CARVALHO, J. R. R. Reactivity, performance, color and tenderness of meat from Zebu cattle finished in feedlot. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, p.1009-1015, 2012.
- RIEDER, S.; TAOURIT, S.; MARIAT, D.; LANGLOIS, B.; GUERIN, G. Mutations in the agouti (*ASIP*), the extension (*MC1R*), and the brown (*TYRP1*) loci and their association to coat color phenotypes in horses (*Equus caballus*). **Mammalian Genome**, v.12, p.450-455, 2001.
- RILEY, D. G.; CHASE-JR., C. C.; PRINGLE, T. D.; WEST, R. L.; JOHNSON, D. D.; OLSON, T. A.; HAMMOND, A. C.; COLEMAN, S. W. Effect of sire on μ - and m-calpain activity and rate of tenderization as indicated by myofibril fragmentation indices of steaks from Brahman cattle. **Journal of Animal Science**, v.81, p.2440-2447, 2003.
- RISVIK, E. Sensory properties and preferences. **Meat Science**, v.36, p.67-77, 1994.
- ROBERT, K. M.; PETER, A. M.; DARYL, K. G. **Harper Bioquímica**. 9. ed. São Paulo: Editora Ateneu, 2002. p 645-647.
- ROBBINS, L. S.; NADEAU, J. H.; JOHNSON, K. R.; KELLY, M. A.; ROSELLI-REHFUSS, L.; BAACK, E.; MOUNTJOY, K. G.; CONE, R. D. Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. **Cell**, v.72, p.827-834, 1993.
- ROBBINS, K.; JENSEN, J.; RYAN, K. J.; HOMCO-RYAN, C.; MCKEITH, F. K.; BREWER, M. S. Consumer attitudes towards beef and acceptability of enhanced beef. **Meat Science**, v.65, p.721-729, 2003a.
- ROBBINS, K.; JENSEN, J.; RYAN, K. J.; HOMCO-RYAN, C.; MCKEITH, F. K.; BREWER, M. S. Dietary vitamin E supplementation effects on the color and sensory characteristics of enhanced beef steaks. **Meat Science**, v.64, p.279-285, 2003b.

- ROUZAUD, F.; MARTIN, J.; GALLET, P. F.; DELOURME, D.; GOULEMOT-LEGER, V.; AMIGUES, Y.; MÉNISSIER, F.; LEVÉZIEL, H.; JULIEN, R.; OULMOUDEN, A. A first genotyping assay of French cattle breeds based on a new allele of the *extension* gene encoding the melanocortin-1 receptor (Mc1r). **Genet. Sel. Evol.**, v.32, p.511-520, 2000.
- ROUZAUD, F.; ANNÉREAU, J. P.; VALENCIA, J. C.; COSTIN, G. E.; HEARING, V. J. Regulation of melanocortin 1 receptor expression at the mRNA and protein levels by its natural agonist and antagonist. **The FASEB Journal**, v.17, p.2154-2156, 2003.
- ROWE, L. J.; MADDOCK, K. R.; LONERGAN, S. M.; HUFF-LONERGAN, E. Influence of early postmortem protein oxidation on beef quality. **Journal of Animal Science**, v.82, p.785-793, 2004a.
- ROWE, L. J.; MADDOCK, K. R.; LONERGAN, S. M.; HUFF-LONERGAN, E. Oxidative environments decrease tenderization of beef steaks through inactivation of μ -calpain. **Journal of Animal Science**, v.82, p.3254-3266, 2004b.
- RUBENSAM, J. M.; FELÍCIO, P. E.; TERMIGNONI, C. Influência do genótipo *Bos indicus* na atividade de calpastatina e na textura da carne de novilhos abatidos no sul do Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.4, p.405-409, 1998.
- SAS. Statistical Analysis System. **User's guide: Statistics**. Version 9.2 Edition. SAS Inst., Cary, NC, 2008.
- SASAZAKI, S.; USUI, M.; MANNEN, H. et al. Allele frequencies of the extension locus encoding the melanocortin-1 receptor in Japanese and Korean cattle. **Animal Science Journal**, v.76, p.129-32, 2005.
- SCHENKEL, F. S.; MILLER, S. P.; JIANG, Z.; MANDELL, I. B.; YE, X.; LI, H.; WILTON, J. W. Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 291-299, 2006.
- SCHMUTZ, S. M.; BERRYERE, T. G.; CIOBANU, D. C.; MILEHAM, A. J.; SCHMIDTZ, B. H.; FREDHOLM, M. A form of albinism in cattle is caused by a tyrosinase frameshift mutation. **Mammalian Genome**, v.15, p.62-67, 2004.
- SELL, N.R.; MIKEL, W.B.; XIONG; Y.L.; BEHREND, J.M. Vitamin D₃ supplementation of cull cows: Effects on *Longissimus* and *Semitendinosus* muscle tenderness. **Journal of Animal Science**, v.82, p.225-230, 2004.
- SERTESER, M.; COSKUN, A.; INAL, T. C.; UNSAL, I. Challenges in vitamin D analysis. **Journal of Medical Biochemistry**, v.31, p.326-332, 2012.

- SHACKELFORD, S.D.; KOOHMARAIE, M.; MILLER, M.F.; CROUSE, J.D.; REAGAN, J.O. An evaluation of tenderness of the *Longissimus* muscle of Angus by Hereford versus Brahman crossbred heifers. **Journal of Animal Science**, v.69, p. 171-177, 1991.
- SHACKELFORD, S.D.; KOOHMARAIE, M.; CUNDIFF, L.V.; GREGORY, K.E.; ROHRER, G.A.; SAVELL, J.W. Heritabilities and phenotypic and genetic correlations for bovine post rigor calpastatin activity, intramuscular fat content, Warner Bratzler shear force, retail product yield and growth rate. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 857-863, 1994.
- SHEPARD, R. M.; HORST, R. L.; HAMSTRA, A. J.; DELUCA, H. F. Determination of vitamin D and its metabolites in plasma from normal and anephric man. **Biochemical Journal**, v.182, p.55-69, 1979.
- SHU, S. T.; MARTIN, C. K.; THUDI, N. K.; DIRKSEN, W. P.; ROSOL, T. J. Osteolytic bone resorption in adult T-cell leukemia/lymphoma. **Leukemia & Lymphoma**, v.51, p.702-714, 2010.
- SILVA, R. G.; SCALA-JR., N. L.; POYAY, P. L. B. Transmissão de radiação ultravioleta através do pelame e da epiderme de bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, p.1939-1947, 2001.
- SINOTTE, M.; DIORIO, C.; BÉRUBÉ, S.; POLLAK, M.; BRISSON, J. Genetic polymorphisms of the vitamin D binding protein and plasma concentrations of 25-hydroxyvitamin D in premenopausal women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.89, p.634–40, 2009.
- SLOMINSKI, A.; TOBIN, D. J.; SHIBAHARA, S.; WORTSMAN, J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. **Physiological Reviews**, v.84, p.1155–1228, 2004.
- SMITH, T.; THOMAS, M.G.; BIDNER, T.D.; PASCHAL, J.C.; FRANKE, D.E. Single nucleotide polymorphisms in Brahman steers and their association with carcass and tenderness traits. **Genetics and Molecular Research**, v.8, p.39-46, 2009.
- SNELLMAN, G.; MELHUS, H.; GEDEBORG, R.; BYBERG, L.; BERGLUND, L.; WERNROTH, L.; MICHAELSSON, K. Determining vitamin D status: A comparison between commercially available assays. **Plos One**, v.5, p.e11555, 2010.
- SUMIDA, T.; HINO, N.; KAWACHI, H.; MATSUI, T.; YANO, H. Expression of agouti gene in bovine adipocytes **Animal Science Journal**, v.75, p.49–51, 2004.
- SUTTON, A. L. M.; MACDONALD, P. N. Vitamin D: more than a “bone-a-fide” hormone. **Molecular Endocrinology**, v.17, p.777–791, 2003.

- SUZUKI, I.; TADA, A.; OLLMANN, M. M.; BARSH, G. S.; IM, S.; LAMOREUX, M. L.; HEARING, V. J.; NORDLUND, J. J.; ABDEL-MALEK, Z. A. Agouti signaling protein inhibits melanogenesis and the response of human melanocytes to alpha-melanotropin. **Journal of Investigation Dermatology**, v.108, p.838–842, 1997.
- SWANEK, S.S.; MORGAN, J.B.; OWENS, F.N.; GILL, D.R.; STRASIA, C.A.; DOLEZAL, H. G.; RAY, F.K. Vitamin D₃ supplementation of beef steers increases *Longissimus* tenderness. **Journal of Animal Science**, Albany, v.77, n.4, p.874-881, 1999.
- TIPTON, N.C.; KING, D.A.; PASCHAL, J.C.; HALE, D.S.; SAVELL, J.W. Effects of oral vitamin D₃ supplementation and supplement withdrawal on the accumulation of magnesium, calcium, and vitamin D in the serum, liver, and muscle tissue and subsequent carcass and meat quality of *Bos indicus* influenced cattle. **Meat Science**, Barking, v.75, p.150-158, 2007.
- VALVERDE, P.; ZHANG, J.; FIX, A.; ZHU, J.; MA, W.; TU, Q.; CHEN, J. Overexpression of bone sialoprotein leads to an uncoupling of bone formation and bone resorption in mice. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.23, p.1775-1788, 2008.
- VOISEY, J.; KELLY, G.; VAN-DAAL, A. Agouti signal protein regulation in human melanoma cells. **Pigment Cell Research**, v.16, p.65–71, 2003.
- WALTERS, M. R.; ILENCHUK, T. T.; CLAYCOMB, W. C. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ stimulates ⁴⁵Ca²⁺ uptake by cultured adult rat ventricular cardiac muscle cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v.262, p.2536-2541, 1987.
- WALLACE, A. M.; GIBSON, S.; HUNTY, A.; LAMBERG-ALLARDT, C.; ASHWELL, M. Measurement of 25-hydroxyvitamin D in the clinical laboratory: Current procedures, performance characteristics and limitations. **Steroids**, v.75, p.477-488, 2010.
- WHEELER, T.L.; SAVELL, J. W.; CROSS, H.R.; LUNT, D.K.; SMITH, S. B. Mechanisms associated with the variation in tenderness of meat from Brahman and Hereford cattle. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 68, p. 4206-4220, 1990.
- WHEELER, T.L.; CUNDIFF, L.V.; KOCH, R.M. Effect of marbling degree on beef palatability in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, Albany, v.72, p.3145–3151, 1994.
- WHIPPLE, G.; KOOHMARAIE, M.; DIKEMAN, M.E.; CROUSE, J.D.; HUNT, M.C.; KLEMM, R.D. Evaluation of attributes that affect *Longissimus* muscle tenderness in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, Albany, v.68, p. 2716-2728, 1990.

- WHIPPLE, G.; KOOHMARAIE, M. Calcium chloride marination effects on beef steak tenderness and calpain proteolytic activity. **Meat Science**, v.33, p.265-275, 1993.
- WIEGAND, B. R.; SPARKS, J. C.; BEITZ, D. C.; PARRISH-JR., F. C.; HORST, R. L.; TRENKLE, A. H.; EWAN, R. C. Short-term feeding of vitamin D3 improves color but does not change tenderness of pork-loin chops. **Journal of Animal Science**, v.80, p.2116-2121, 2002.
- WILBORN, B. S.; KERTH, C. R.; OWSLEY, W. F.; JONES, W. R.; FROBISH, L. T. Improving pork quality by feeding supranutritional concentrations of vitamin D₃. **Journal of Animal Science**, v.82, p.218-224, 2004.
- WOOD, J. D.; ENSER, M.; FISHER, A. V.; NUTE, G. R.; SHEARD, P. R.; RICHARDSON, R. I.; HUGHES, S. I.; WHITTINGTON, F. M. Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. **Meat Science**, v.78, p.343-358, 2008.
- WULF, D. M.; O'CONNOR, S. F.; TATUM, J. D.; SMITH, G. C. Using objective measures of muscle color to predict beef *Longissimus* tenderness. **Journal of Animal Science**, v.75, p.684-692, 1997.
- WULF, D. M.; WISE, J. W. Measuring muscle color on beef carcasses using the L*a*b* color space. **Journal of Animal Science**, v.77, p.2418-2427, 1999.
- YANG, S. H. A method of assessing cutaneous pigmentation in bovine skin. **Australian Journal of Agriculture Research**, v.6:p.891-902, 1952.
- YANG, A.; BREWSTER, M. J.; LANARI, M. C.; TUME, R. K. Effect of vitamin E supplementation on a-tocopherol and b-carotene concentrations in tissues from pasture- and grain-fed cattle. **Meat Science**, v.60, p.35-40, 2002.
- ZADSHIR, A.; TAREEN, N.; PAN, D.; NORRIS, K.; MARTINS, D. The prevalence of hypovitaminosis D among US adults: data from the NHANES III. **Ethnicity & Disease**, v.15, Suppl.5, p.S5–S97–S101, 2005.
- ZHAN, X.; WANG, M.; ZHAO, R.; LI, W.; XU, Z. Effects of different selenium source on selenium distribution, loin quality and antioxidant status in finishing pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v.132, p.202-211, 2007.
- ZEIGLER-JOHNSON, C.; PANOSSIAN, S.; GUEYE, S. M.; JALLOH, M.; OFORI-ADJEI, D.; KANETSKY, P. A. Population Differences in the frequency of the agouti signaling protein g.8818A>G polymorphism. **Pigment Cell Research**, v.17, p.185–187, 2004.