

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

O polimorfismo do gene CAST interfere no amaciamento da carne de bovinos machos Nelores em diferentes condições sexuais e reatividades

Ana Cláudia da Silva

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagens

**Piracicaba
2023**

Ana Cláudia da Silva
Zootecnista

O polimorfismo do gene CAST interfere no amaciamento da carne de bovinos machos Nelores em diferentes condições sexuais e reatividades

Orientador:
Prof. Dr. **EDUARDO FRANCISQUINE DELGADO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagens

Piracicaba
2023

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Silva, Ana Cláudia da

O polimorfismo do gene CAST interfere no amaciamento da carne de bovinos machos nelores em diferentes condições sexuais e reatividades / Ana Cláudia da Silva. - Piracicaba, 2023.

98 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Calpastatina 2. Castração 3. Proteólise 4. Temperamento I. Título

DEDICATÓRIA

A meus pais, Rose e Ademar, a minha irmã Paulinha e ao meu noivo Alex por todo amor e incentivo.

“Cada sonho que você deixa pra trás, é um pedaço do seu futuro que deixa de existir” (Steve Jobs)

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus** e a **Nossa Senhora Aparecida**, que me deram força não somente nestes anos de doutorado, mas em todos os momentos da minha vida .

Agradeço aos meus pais **Ademar** e **Rose** meus maiores exemplos, obrigada por cada incentivo e orientação, pelas orações em meu favor, pela preocupação para que estivesse sempre andando pelo caminho correto. Obrigada por estarem ao meu lado sempre. Amo vocês.

E meu agradecimento muito especial a minha irmã gêmea **Ana Paula** que é minha companheira de todos os momentos, obrigada por sempre me mostrar que eu sou capaz, te amo.

Agradeço ao meu companheiro de vida **Alex**, que jamais me negou apoio, carinho e incentivo. Obrigado, amor da minha vida por aguentar as crises choro e estresse, te amo.

Ao **Professor Dr. Eduardo** pela sua orientação, paciência e atenção, que dedicou seu tempo para me orientar neste trabalho, além disso, por ter me inspirado para que eu me torne uma profissional melhor a cada dia. Agradeço também pela amizade construída nesses 7 anos de convivência.

Á **Patricia**, por tudo que me ensinou, por sua contribuição no meu crescimento pessoal e profissional, por ser uma inspiração. Sou muito grata pela sua amizade. Vou lembrar sempre das nossas inúmeras conversas e risada nos momentos de trabalho. Conviver com você no LAFA, fez desse período muito mais leve.

Ao **João Pedro**, por toda ajuda durante as análises, além da amizade, as risadas, que você compartilhou comigo nessa etapa tão desafiadora da minha vida, fizeram toda a diferença.

Á nossa pequena grande família do LAFA **Gabriele, Gabriela e Carol**.

Ao professor **Saulo**, pela parceria e acolhimento na FZEA/USP, pela oportunidade, pela atenção e colaboração no projeto.

Á Professora **Aline**, as alunas **Julia, Iza e Simara**, pela ajuda e acolhimento no Laboratório de Biologia Molecular e Micotoxinas.

Aos meus queridos amigos Zé Matheus, Oc, Juuh, Giu e Bruna por tornarem os dias da pós mais leves e divertidos

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Pastagens** e à **ESALQ/USP**, pela oportunidade de realização do meu mestrado. Á **CAPES** pela bolsa de doutorado concedida.

MUITO OBRIGADA!

*“Conviva com os sábios e será um deles”
Provérbios 13.20*

Sumário

RESUMO	7
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO.....	11
Referências	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Estresse – Fisiologia do desafio à homeostase	15
2.2 Temperamento animal	18
2.2.1 Avaliação do temperamento animal	19
2.3 Condição sexual.....	21
2.3.1 Imunocastração.....	22
2.4 Transformação de músculo em carne	23
2.5 Sistema proteolítico calpaína e calpastatina	24
2.5.1 Calpaínas	24
2.5.2 Calpastatina	26
2.6.1 Temperamento e maciez.....	27
2.6.2 Efeito da condição sexual sobre a maciez da carne.....	29
2.6.3 Efeito dos componentes raciais na maciez	30
2.6.3.1 Marcador molecular no gene da calpastatina na maciez	31
Referências	32
3. BOVINOS NELORE IMONOCASTRADO COM SNP CAST HOMOZIGOTO DESFAVORÁVEL PARA TEXTURA DA CARNE REDUZEM A TAXA DE AMACIAMENTO.....	45
Resumo	45
Abstract.....	45
3.1 Introdução.....	46
3.2 Material e Métodos.....	47
3.3 Resultados.....	54
3.3.1 Declínio do pH e temperatura do músculo <i>Longissimus Lumborum</i> e concentração de lactato plasmático	54
3.3.2 Atividade inibitória caseinolítica de calpastatina e força de cisalhamento	56
3.3.3 Valores de perdas por cozimento e cor.....	59
3.4 Discussão	61
3.5 Conclusão	65

Referências.....	66
4. POLIMORFISMO NO GENE DA CALPASTATINA EM BOVINOS NELORE ALTERA O AMACIAMENTO DA CARNE EM ANIMAIS COM TEMPERAMENTO- REATIVO	71
Resumo.....	71
Abstract	71
4.1 Introdução	72
4.2 Material e Métodos	74
4.3 Resultados	82
4.3.1 Declínio do pH e temperatura do músculo <i>Longissimus Lumborum</i>	82
4.3.2 Atividade inibitória caseinólica de calpastatina, força de cisalhamento e índice de fragmentação miofibrilar.....	83
4.3.3 Valores de perdas por cozimento, lactato plasmático e cor	86
4.4 Discussão	89
4.5 Conclusão.....	93
Referências.....	94

RESUMO

O polimorfismo do gene CAST interfere no amaciamento carne bovinos machos Nelores em diferentes condições sexual e reatividades

O objetivo deste estudo foi avaliar associação do gene CAST em bovinos machos Nelores com o processo de amaciamento da carne, proveniente de animais de duas categorias sexuais (imunocastrado e não castrado) e temperamento divergentes (calmo e reativo). Foram utilizados 51 machos bovinos da raça Nelore, sendo: 26 não-castrados (NC), 25 imunocastrados (IM). A genotipagem dos animais foi realizada através da PCR convencional e digestão do amplificado com a endonuclease de restrição Dde I, com os três genótipos para SNP do gene CAST identificados: homozigotos AA (n= 19) e GG (n= 6) e heterozigotos AG (n= 26). Os músculos *LL* foram retirados das meia-carcaças esquerdas, as 24h *post mortem*, para porcionamento em bifes para as seguintes análises: cor, perdas por cozimento (PPC), força de cisalhamento (FC) e atividade inibitória de calpastatina. Houve efeito de genótipo e tempo *post mortem* ($P < 0,05$) para o declínio de pH do músculo *LL*. A atividade inibitória de calpastatina não foi influenciada pela condição sexual e genótipo ($P > 0,05$). A FC apresentou efeito da interação entre condição sexual e genótipo ($P < 0,05$) e tempo *post mortem*. Aos 7 e 14 dias *post mortem* (dpm), os animais IM-GG apresentaram FC significativamente superior a todos os outros genótipos, exceto para o 7 dpm em comparação ao NC-GG. Na comparação da FC dentro de cada condição sexual e genótipo nos tempos *post mortem*, a FC dos animais IM-AA apresentaram diferenças para todos os tempos de maturação. Para os animais IM-GG não houve alterações significativas da FC entre tempos consecutivos de maturação. Os animais NC-GG também não apresentaram alterações entre os tempos consecutivos. As PPC e os valores de cor apresentaram apenas efeito do tempo *post mortem*. O alelo A do polimorfismo de nucleotídeo único no gene da CAST mostrou-se favorável em relação a uma menor força de cisalhamento da carne de bovinos machos Nelores. Foram utilizados 21 machos bovinos, que apresentaram temperamento divergente no primeiro manejo dos animais, com a utilização do índice de reatividade (IR), calculado pela média dos resultados de escore de tronco e velocidade de fuga foram criados dois grupos de reatividade: animais calmos e reativos, cuja genotipagem identificou homozigotos AA (n= 9) e heterozigotos AG (n= 12). Às 24h *post mortem*, os músculos *LL* foram retirados das meia-carcaças esquerdas para porcionamento em bifes, para a determinação das seguintes análises: cor, PPC, FC, índice de fragmentação miofibrilar (MFI) e atividade inibitória de calpastatina. Houve efeito de interação entre temperamento e genótipo ($P = 0,10$) para atividade inibitória caseinolítica de calpastatina. A FC apresentou efeito da interação entre temperamento e genótipo ($P = 0,11$). Aos 14 dias *post mortem* houve diferença entre calmos-AG e reativos-AG, enquanto os últimos apresentaram maior FC que os calmos-AA aos 28 dpm. O processo de amaciamento apresentou menor taxa e ou extensão para a carne dos reativos-AG. Quando comparado a FC dos genótipos dentro de cada classificação de temperamento nos tempos *post mortem*, os calmos-AG apresentaram diferenças nos tempos, 1, 7 e 14 dias. A única diferença observada na FC dos animais reativos foi entre o 1º e 28 dias *post mortem*. Os valores de MFI, PPC, a^* e b^* apresentaram efeito do tempo *post mortem* ($P < 0,001$). Os valores de L^* apresentaram efeito para temperamento ($P < 0,03$), genótipo ($P < 0,02$) e tempo *post mortem* ($P < 0,001$). Os resultados indicam que a associação entre temperamento dos bovinos com polimorfismo de nucleotídeo único no gene CAST com heterozigose AG causou impactos negativos no processo de amaciamento.

Palavras-chaves: Calpastatina, Castração, Proteólise, Temperamento

ABSTRACT

The polymorphism of the CAST gene interferes with meat tenderization of male Nelore cattle in different sexual conditions and reactivity

The aim of this study was to evaluate the association of the CAST gene in male Nelore cattle with the meat tenderization process, from animals of two sexual categories (immunocastrated and uncastrated) and divergent temperaments (calm and reactive). Fifty-one Nelore male bovines were used: 26 uncastrated (NC), 25 immunocastrated (IM). Genotyping of the animals was performed using conventional PCR and digestion of the amplification with restriction endonuclease Dde I, with the three SNP genotypes identified for the CAST gene: AA homozygotes (n= 19) and GG (n= 6) and AG heterozygotes (n= 26). The LL muscles were removed from the left half-carcasses, at 24h *post mortem*, for portioning into steaks for the following analyses: color, cooking losses (PPC), shear force (FC) and calpastatin inhibitory activity. There was an effect of genotype and *post mortem* time ($P < 0.05$) for the pH decline of the LL muscle. Calpastatin inhibitory activity was not influenced by sexual condition and genotype ($P > 0.05$). HR showed an effect of the interaction between sexual condition and genotype ($P < 0.05$) and *post mortem* time. At 7 and 14 days *post mortem* (dpm), IM-GG animals showed HR significantly higher than all other phenotypes, except for 7 dpm compared to NC-GG. When comparing the HR within each sexual condition and genotype at *post mortem* times, the HR of IM-AA animals showed differences for all aging times. For IM-GG animals, there were no significant changes in HR between consecutive aging times. The NC-GG animals also showed no changes between consecutive times. PPC and color values showed only the effect of *post mortem* time. The A allele of the single nucleotide polymorphism in the CAST gene was shown to favor a lower shear force in the meat of male Nelore cattle. Twenty-one bovine males were used, which presented divergent temperament in the first handling of the animals, using the reactivity index (RI), calculated by the average of the results of trunk score and flight speed, two reactivity groups were created: calm and reactive animals, whose genotyping identified AA homozygotes (n= 9) and AG heterozygotes (n= 12). At 24h *post mortem*, the LL muscles were removed from the left half-carcasses for portioning into steaks, for the determination of the following analyses: color, PPC, HR, myofibrillar fragmentation index (MFI) and calpastatin inhibitory activity. There was an interaction effect between temperament and genotype ($P= 0.10$) for the caseinolytic inhibitory activity of calpastatin. HR showed an effect of the interaction between temperament and genotype ($P= 0.11$). At 14 days *post mortem*, there was a difference between calm-AG and reactive-AG, while the latter had a higher HR than calm-AA at 28 dpm. The tenderization process showed a lower rate and/or extension for the AG-reactive meat. When comparing the HR of the genotypes within each temperament classification at *post mortem* times, the calm-AG showed differences at times, 1, 7 and 14 days. The only difference observed in the HR of reactive animals was between the 1st and 28th day *post mortem*. MFI, PPC, a* and b* values showed an effect of *post mortem* time ($P < 0.001$). L* values showed an effect for temperament ($P < 0.03$), genotype ($P < 0.02$) and *post mortem* time ($P < 0.001$). The results indicate that the association between bovine temperament and single nucleotide polymorphism in the CAST gene with AG heterozygosity caused negative impacts on the tenderization process.

Keywords: Calpastatin, Castration, Proteolysis, Temperament

1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem um papel muito importante na cadeia mundial de produção de proteína animal, principalmente na proteína de origem bovina. A pecuária brasileira tem confirmado seu protagonismo no mercado mundial de carne bovina. Levando em consideração que, no final do ano de 2019, iniciou-se um cenário econômico conturbado gerado pela pandemia do COVID-19, o Brasil conquistou novos mercados e avançou em regiões consolidadas. No ano de 2021, os embarques brasileiros atingiram US\$9,2 bilhões, crescimento de 8,4 % em relação a 2020. Baseando-se apenas na carne *in natura*, que compõe acima de 80 % do volume exportado em 2021, os valores negociados também bateram recorde de US\$5.170/tonelada, aumento de 18,2% em relação a 2020 (ABIEC, 2022).

Concomitante com esse cenário favorável do mercado cárneo brasileiro, estima-se que o consumo global de alimentos aumente substancialmente até 2050, com um crescimento significativo na demanda por produtos de origem animal (Keating et al., 2014; Turk, 2016). No entanto, essa demanda será guiada não apenas pela quantidade, mas também estima-se que pela qualidade dos produtos derivados de proteína animal exigida pelos consumidores (Grunert et al., 2004; Henchion, et al., 2017). Nessa perspectiva, dentre as características de carne bovina associadas à qualidade requerida pelo consumidor muitas dependem de vários fatores intrínsecos dos animais, dentre os quais pode se citar o genótipo, a condição sexual e a resposta ao estresse (Shackelford et al., 1995).

Bovinos de corte de raças zebuínas (*Bos taurus indicus*), em especial a raça Nelore, compõem 80% dos grupos genéticos do rebanho brasileiro. As variações na maciez da carne entre raças bovinas podem ser explicadas em boa parte pela genética do animal (46%), além do efeito do ambiente (54%) (Koochmaraie, 1995). A raça Nelore tem o maior destaque por apresentar potencial em características ligadas à produção animal, entretanto comparações de longa data entre animais *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus* tem apontado o primeiro grupo com maior inconsistência da maciez, o que torna a carne de qualidade inferior (Whipple et al., 1990), sendo apontado como um grupo que produz maciez variável e em boa parte insatisfatória (Bittencourt, 2020; Martins, 2020). Um dos principais fatores que podem influenciar a menor maciez da carne de zebuínos em relação aos taurinos, é a proteólise reduzida das proteínas miofibrilares associada à alta atividade de calpastatina nos músculos (Whipple et al., 1990; Camou et al., 2007).

A calpastatina é um inibidor tecidual natural de proteólise, incluindo aquela que ocorre *post mortem*, sendo um dos principais fatores associados à taxa e extensão de amaciamento da carne (Huff Lonergan et al., 2010). A participação elevada de genes de *Bos*

taurus indicus em cruzamentos com *Bos taurus taurus*, normalmente tem sido associada à diminuição da maciez da carne devido à maior atividade de calpastatina na carne de *Bos taurus indicus* e suas cruzas (Sensky et al., 2001).

Existem potenciais fatores de confundimento, uma vez que o temperamento animal é apontado como importante para determinação da maciez da carne (King et al., 2006), bem como a condição sexual (Morgan et al., 1993). O efeito negativo na maciez, em virtude do temperamento, pode estar associado à ativação de receptores beta-adrenérgicos localizados no sarcolema, desencadeando uma cascata de eventos intracelulares que em última instância podem fosforilar a calpastatina, alterando sua atividade inibitória e reduzindo a proteólise muscular (Cong et al., 1998; Navegantes, Baviera e Kettelhut, 2009). Por outro lado, a castração pode reduzir a atividade de calpastatina e incrementar o processo de amaciamento (Morgan et al., 1993), que tem sido relacionado com o impacto da castração no controle da impulsividade dos animais.

A identificação de potenciais genes candidatos e variantes causais responsáveis por regular os processos biológicos associados ao amaciamento de maneira dependente do estágio/tempo pode ser muito útil para o desenvolvimento de esquemas de seleção genética e para os estudos que envolvam identificação de fatores determinantes do potencial de amaciamento da carne. Além disso, a melhor compreensão dos genes e processos biológicos associados às diferenças de maciez em diferentes estágios *post mortem* pode ajudar a reforçar a contribuição diferencial das características enzimáticas e da composição corporal durante a maturação refrigerada da carne. Os estudos com biomarcadores podem fornecer suporte científico à indústria da carne e desenvolver estratégias para melhorar a qualidade da carne (Paredi et al., 2012; Ouali et al., 2013; Picard et al., 2015).

É neste sentido que o gene calpastatina (CAST) vem chamando a atenção para estudos de marcadores moleculares que possam ser utilizados para o melhoramento genético de bovinos de corte. O polimorfismo de nucleotídeo único (“SNP - single nucleotide polymorphism”) no gene CAST, patenteado por Barendse et al. (2002), está associado a um alelo baseado na troca de uma base com efeito favorável na maciez da carne bovina, com confirmação em animais *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* (Casas et al., (2006).

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar associação do gene CAST em bovinos machos Nelores com maciez da carne, proveniente de animais de duas categorias sexuais (imunocastrado e não castrado) e temperamento distintos. Além disso, entender a relação das condições sexuais e temperamento com atividade inibitória caseinolítica de calpastatina.

Referências

- ABIEC – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE. Beef Report – Perfil da Pecuária no Brasil 2022. Disponível em: <http://abiec.com.br/publicacoes/beefreport-2022/>. Acesso em: 05 jul. 2023.
- Barendse, W. J. 2002. DNA markers for meat tenderness. International patente application PCT/AU02/00122. International patent publication WO 02/064820 A1.
- Camou, J. P., Marchello, J.A., Thompson, V.F., Mares S.W., & Goll, D.E. (2007). Effect of postmortem storage on activity of μ - and m-calpain in five bovine muscles. *Journal of Animal Science*, 85, 2670-2681.
- Casas, E.; Winte, S. N.; Riley, D. O.; Smith, T. P. L.; Brenneman, R. A. (2006). Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. *Journal of Animal Science*, 83, 3-19.
- Cong, M., Thompson, V.F., Goll, D.E., Antin, P.B., (1998b). The Bovine Calpastatin gene promoter and a new N-terminal region of the protein are targets for cAMPdependent Protein Kinase activity. *J. Biol. Chem.* 273, 660–666.
- Grunert, K. G., Bredahl, L., & Brunsø, K. (2004). Consumer perception of meat quality and implications for product development in the meat sector - a review. *Meat Science*. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(03\)00130-X](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(03)00130-X)
- Henchion, M. M., McCarthy, M., & Resconi, V. C. (2017). Beef quality attributes: A systematic review of consumer perspectives. *Meat Science*. 48, 3, 112-121.
- Huff Lonergan, E., Zhang, W., & Lonergan, S. M. (2010). Biochemistry of post-mortem muscle - lessons on mechanisms of meat tenderization. *Meat Science*. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.05.004>
- Keating, B. A., Herrero, M., Carberry, P. S., Gardner, J., & Cole, M. B. (2014). Food wedges: Framing the global food demand and supply challenge towards 2050. *Global Food Security*. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2014.08.004>.
- King, D. A. et al. (2006). Influence of animal temperament and stress responsiveness on the carcass quality and beef tenderness of feedlot cattle. *Meat Science*, 74, 546-556.
- Koohmaraie, M. (1995). The biological basis of meat tenderness and potential genetic approaches for its control and prediction. *Proceedings of the Reciprocal Meat Conference*. 48, 69–75.
- Morgan, J.B., Wheeler, L. T. L., Koohmaraie, M., Crouset, J. D., & Savell, J.W. (1993). Effect of castration on myofibrillar protein turnover, endogenous proteinase activities, and muscle growth in bovine skeletal muscle. *Journal of Animal Science*, 71, 408-414.
- Navegantes, Baviera e Kettelhut, 2009. The inhibitory role of sympathetic nervous system in the Ca²⁺-dependent proteolysis of skeletal muscle. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 42: 21-28.

Ouali, A., Gagaoua, M., Boudida, Y., Becila, S., Boudjellal, A., Herrera-Mendez, C. H., & Sentandreu, M. A. (2013). Biomarkers of meat tenderness: present knowledge and perspectives in regards to our current understanding of the mechanisms involved. *Meat Science*, 95, 854-870.

Paredi G, Raboni S, Bendixen E, de Almeida AM, Mozzarelli A. (2012). Eventos moleculares “músculo para carne” e transformações tecnológicas: o insight da proteômica. *J Proteômica*. 75: 4275–89.

Picard B, Lebret B, Cassar-Malek I, Liaubet L, Berri C, Le Bihandual E,. (2015). Avanços recentes em tecnologias ômicas para gestão da qualidade da carne. *Meat Science*, 109, 18–26.

Sensky, P.L., Parr, T., Bardsley, R.G., & Buttery, P.J. (2001). Meat tenderisation – the role of calpains. *Proceedings of the British Society of Animal Science*. British Society of Animal Science, 11, 239-242.

Shackelford SD, Wheeler TL, Koohmaraie M. (1995). Relationship between shear force and trained sensory panel tenderness ratings of 10 major muscles from *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. *J Anim Sci.*, 73,3333–40.

Turk, J. (2016). Meeting projected food demands by 2050: Understanding and enhancing the role of grazing ruminants. *Journal of Animal Science*. <https://doi.org/10.2527/jas.2016-0547>

Whipple, G., Koohmaraie, M., & Dikeman, M.E. (1990). Evaluation of attributes that affect longissimus muscle tenderness in *Bos Taurus* and *Bos indicus* cattle. *Journal Animal Science*, 68, 2716-28.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estresse – Fisiologia do desafio à homeostase

Historicamente, o conceito de estresse vem sendo construído a partir da ideia de que trata-se de uma resposta biológica quando um indivíduo capta ou percebe uma ameaça (“estressor”) à sua homeostase (Selye, 1936). Outros estudos propuseram talvez uma das definições mais amplamente aceitas de estresse, como sendo o resultado de um evento ou condição externa (estressor) que coloca uma pressão sobre um sistema biológico (Moberg; Mench, 2000).

Os agentes estressores podem ser físicos como calor, ruído, transporte e privação ou restrição de alimentos, ou podem também ser primordialmente de ordem psicológica em situações envolvendo o desmame, isolamento social ou mistura, contenção e manipulação, e ainda medo (Chen et al., 2015), muito embora alguns dos exemplos tenham ambos os tipos de agentes estressores envolvidos, especialmente porque a resposta típica de estresse envolve a captação e/ou percepção de alteração ou ameaça à homeostasia. Outra forma de classificação tenta separar como endógenos, se forem de origem genética ou física do próprio organismo; ou exógenas, se surgirem do ambiente social e físico (Chen et al., 2015; Brown; Vosloo, 2017). Em geral, os agentes estressores provocam alterações comportamentais e metabólicas dentre outras alterações fisiológicas, como mudanças endócrinas, disparadas nos animais (Moberg, 1987; Mormède et al., 2007; Collier, et al., 2017), estimulando a ativação de mecanismos adaptativos como parte da condição de homeostase (Broom; Johnson, 1993).

As respostas fisiológicas são disparadas pela captação de estímulos pelas vias aferentes que transmitem sinal que caracterizará o estresse para várias partes do sistema nervoso central (SNC), incluindo o tálamo, o hipotálamo e o córtex. Vias eferentes são ativadas para dar origem a uma resposta típica de estresse (Collier, et al., 2017), definida principalmente pelo eixo simpático-adrenomedular (SAM) (Chen et al., 2015; Aich et al., 2007; Wong; Tank, 2007) e eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) (Lay et al., 1996; Mormède et al., 2007). A liberação de beta-endorfina pela hipófise liga os dois eixos (Chen et al., 2015). Enquanto o eixo SAM medeia respostas de estresse agudo, o eixo HHA medeia respostas agudas e crônicas (Lynch, 2010; Kumar, 2012), com os dois eixos de sinalização montando uma resposta fisiológica integrada ao estresse. O eixo SAM inicia a resposta de “fuga ou luta” que inclui uma resposta comportamental integrada ao perigo percebido ou estresse agudo, bem como respostas metabólicas e imunes (Mormède et al., 2007; Aich et al., 2007; Huang et al., 2013). Em contrapartida, o HHA inicia um braço da resposta endócrina (Minton, 1994; Mormède et al., 2007), com implicações comportamentais.

Na resposta aguda ao estresse, ativam-se receptores no corpo (Collier, et al., 2015), que acionam o eixo SAM (figura 1) para ativar a produção de duas catecolaminas, norepinefrina nos nervos simpáticos periféricos e epinefrina na medula adrenal. Esses hormônios desencadeiam uma resposta de fuga ou luta, na qual as frequências cardíaca e respiratória aumentam, assim como a pressão arterial, enquanto a atividade no trato gastrointestinal diminui (Aich et al., 2007). A epinefrina também induz o metabolismo da glicose ativando a proteína quinase AMPK e o transportador GLUT4 por meio de um aumento da insulina, influenciando também a termogênese, o metabolismo lipídico e a sinalização da insulina e regulando a produção de citocinas que participam das respostas imunes (Chen et al., 2015).

Quando os mecanismos adaptativos de um animal não conseguem mais lidar com um agente estressor, o eixo HHA produz metabólitos (Mormède et al., 2007; Kumar, 2012) que geram energia usada para desencadear respostas comportamentais, autonômicas, neuroendócrinas e imunes (Von Borell et al., 2007). O eixo HHA induz o hipotálamo a secretar hormônio liberador de corticotropina (“CRH - corticotropin releasing hormone”) e vasopressina (VP) (Mormède et al., 2007; Minton, 1994), que por sua vez induzem a hipófise a liberar hormônio adrenocorticotrópico (ACTH). O ACTH faz com que o córtex adrenal secrete glicocorticóides, principalmente cortisol (Chen et al., 2015).

O cortisol, secretado pelo estímulo estressor, liga-se às globulinas plasmáticas, especialmente à albumina e à globulina ligadora de corticosteróides (“CBG - corticosteroid binding globulin”) e é transportado pelo sistema circulatório (Mormède et al., 2007). A força dos efeitos do cortisol depende de quanto e por quanto tempo o cortisol é secretado, quão concentradas as globulinas de ligação estão no sangue periférico e os receptores estão no tecido-alvo e quanto metabólitos de glicocorticóides são decompostos (Burdick et al., 2011). Quando o hipotálamo e a hipófise anterior detectam altas concentrações de cortisol, pelo mecanismo de retroalimentação negativa, reduzem a liberação de VP, CRH e ACTH para mitigar o estímulo para secreção adicional de cortisol pelo córtex adrenal, controlando assim a resposta ao estresse, evitando respostas exacerbadas. O cortisol e outros glicocorticóides em bovinos regulam o equilíbrio entre anabolismo e catabolismo e, em condições de estresse, diminuem a expressão da lipoproteína lipase responsável pela lipólise em nível extracelular que permite a utilização pelas células de ácidos graxos hidrolisados, diminuem o metabolismo de carboidratos e a quantidade de leucócitos, basicamente linfócitos, no sangue periférico bovino, bem como alteram a expressão de genes relacionados à glicólise e à captação de glicose induzida por insulina (Chen et al., 2015; Collier, et al., 2017).

As respostas do eixo HHA e do SAM ao estresse são altamente concordantes. Em resposta à maioria dos agentes estressores, ambos os sistemas são ativados e têm a capacidade de afetar sinergicamente a resposta um do outro (Burdick et al., 2011), sendo que algumas respostas fisiológicas podem ser percebidas mais prontamente que outras. Neste sentido, deve-se considerar que a possibilidade de identificar e associar o quadro de estresse em bovinos mais reativos, deve incluir evidências das alterações fisiológicas como respostas da ativação de ambos os sistemas. Dessa forma, Petherick et al. (2002), relataram que animais reativos têm suas reações motivadas principalmente pelo medo, expressando comportamentos de alerta por um longo tempo, o que reflete no incremento energético de manutenção e na eficiência alimentar, afetando negativamente o ganho de peso. O aumento na liberação de hormônios adrenérgicos e corticosteróides interferem nos níveis de glicogênio e fosfocreatina muscular e conseqüentemente nas concentrações de ATP, lactato e íons hidrogênio. O lactato, que transporta íons hidrogênio para o meio intersticial, está associado ao declínio do pH *post mortem* (Warriss et al., 1998), uma vez a presença do primeiro conseqüentemente implica no acúmulo do segundo em nível tecidual, devido a ausência de transporte e balanço ácido-base em troca com o sangue, que irá interferir na qualidade final da carne (Leme, 2013).

Fatores estressantes de diferentes naturezas podem ter efeitos na regulação positiva da atividade inibitória da calpastatina, como após estresse alimentar por período prolongado de restrição alimentar, em que, foi apontada como possível causa da redução de fragmentação miofibrilar de músculo de rato acondicionado refrigerado até cinco dias *post mortem* (Leonardo et al., 2008). Na célula muscular, após a ativação dos receptores beta-adrenérgicos localizados no sarcolema, uma cascata de eventos intracelulares será desencadeada, sendo uma delas o aumento das concentrações de AMP cíclico, que por sua vez aumenta a atividade da proteína quinase, a qual fosforila a calpastatina, aumentando sua atividade inibitória e reduzindo proteólise (Navegantes, Baviera e Kettelhut, 2009). Portanto, é esperado que animais com tônus elevado do sistema simpático-adrenomedular (SAM), bem como maiores concentrações basais de cortisol no sangue, estarão suscetíveis a regulação positiva da atividade inibitória da calpastatina na musculatura estriada esquelética *in vivo* que terá impacto negativo no processo proteolítico *post mortem*. Tanto o tônus elevado (SAM) bem como cortisol resultante da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) são respostas concomitantes e interdependentes após evento ou exposição constante ao estresse, os quais os bovinos potencialmente experienciam e moldam responsividade diferencialmente durante ciclo produtivo.

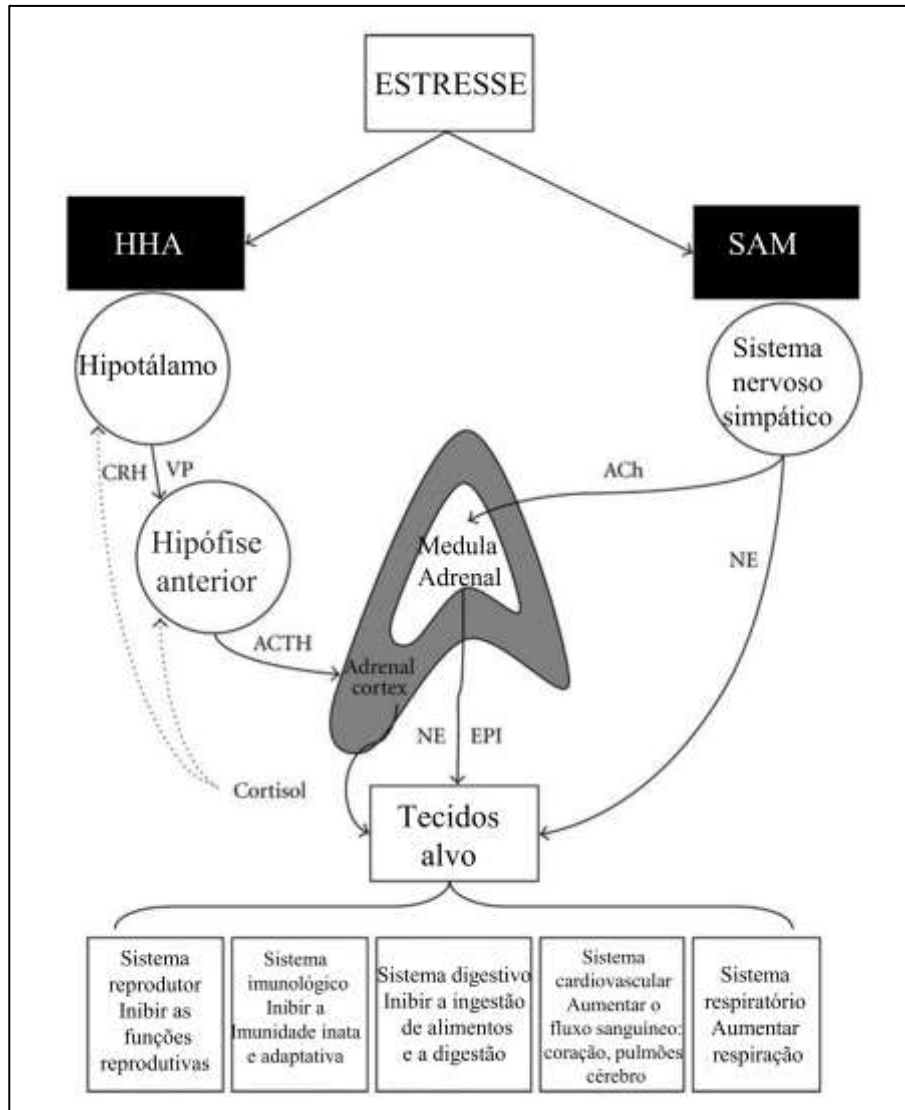


Figura 1- Representação esquemática do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e resposta do sistema simpático adrenomedular (SAM) ao estresse (Burdick et al., 2011).

2.2 Temperamento animal

A modificação da resposta dos eixos SAM e HPA à estressores, pode ser parcialmente explicada pela modificação da reatividade comportamental dos animais. Há alguma evidência de que os animais cronicamente estressados não reagem ao seu ambiente como os animais não estressados (Boissy et al., 2001; Broom et al., 1987). Uma vez que, exposições repetidas a eventos estressantes podem aumentar as respostas subsequentes do eixo HPA a eventos aversivos (Mormède et al., 2007).

Dessa forma, o temperamento vem sendo apontado como uma característica importante para o sistema produtivo de bovinos de corte que tem consequências práticas e econômicas, portanto, merecendo a atenção dos produtores e profissionais (Grandin; Deesing, 1998). O temperamento pode ser definido como o conjunto de alterações que ocorrem na

fisiologia com impacto no comportamento dos animais quando expostos ao contato humano (interação homem-animal), novos ambientes ou durante grandes mudanças em sua estrutura social (Cafe et al., 2011; Fordyce et al. 1982). O temperamento bovino não foi somente reconhecido com uma reação frente a presença humana, mas amplamente reconhecido como uma característica multifatorial (Rothbart; Evans; Ahadi, 2000; Graunke et al., 2013).

O comportamento dos bovinos pode ser abordado de acordo com a resposta que estes apresentem frente ao manejo, podendo ser classificado como: calmo/adequado, intermediário e reativos/excitável/temperamental (Burdick et al., 2010; Francisco et al., 2015). Essa abordagem decorre de uma simplificação útil de categorias de comportamentos identificadas como importantes na expressão do temperamento (Réale et al., 2007), sendo elas: 1) precaução/ousadia: reação do indivíduo em situações de risco que não envolvam novidade; 2) evitação/exploração: reação do indivíduo em situações que envolvam novidade; 3) atividade: nível de agitação do indivíduo em situações que não envolvam risco nem novidade; 4) agressividade: reação agonística do indivíduo contra membros da mesma espécie; 5) sociabilidade: reação, com exceção das agonísticas, ao membros da mesma espécie.

Portanto, o temperamento dos bovinos estará intimamente ligado à forma e a intensidade de manejo do sistema de produção em que eles se encontram (Figueiredo et al., 2005; Silveira et al., 2008; Argôlo et al., 2010), sendo dependente de situações ambientais e sociais, além de estímulos de novidade (Grignard et al., 2000). Além do manejo, dentre os fatores que compõem o temperamento, citam-se a raça, a idade e a condição sexual (Rech et al., 2008; Silveira et al., 2010).

Animais considerados com bom temperamento, ou seja, calmos, têm sido relacionados a melhor produtividade quando comparado com animais reativos (Cafe et al., 2011b; Turner et al., 2011). Além disso, animais muito reativos são indesejáveis por apresentarem fator de risco para os manejadores e para si próprios, podendo ainda gerar custos adicionais de produção (Fordyce et al., 1988; Grandin, 1993), devido ao aumento do tempo de trabalho, além da ocorrência de traumas frequentes observados na carcaça e carne de tais animais (Maffei, 2009).

2.2.1 Avaliação do temperamento animal

A avaliação do temperamento é preconizada por alguns como ferramenta para tomada de decisão objetivando aumentar a produtividade em bovinos de corte (Cooke, 2014), e pode ser realizada pela obtenção de indicadores comportamentais durante o manejo dos animais (Petherick et al., 2009). Existem diferentes métodos para a avaliação do temperamento dos bovinos, sendo os testes mais frequentemente utilizados nos estudos denominados *score de*

tronco e velocidade de fuga (Gruber et al., 2010; Francisco et al., 2015; Haskell; Simm; Turner, 2014). Alguns trabalhos relataram que os níveis de cortisol plasmático estavam relacionados com a rapidez com que um animal deixou o tronco (Fell et al., 1999; Curley, et al., 2008) Além disso, à medida que a velocidade de fuga aumentou, o lactato plasmático também aumentou (Gruber et al., 2010; Coombes et al., 2014). Os métodos serão descritos a seguir.

Escore de tronco: O método avalia o grau de perturbação ou de agitação dos animais contidos no tronco de contenção (ou na balança), atribuindo-se escores com base nos comportamentos dos animais enquanto mantidos presos no tronco, sendo que os valores extremos superiores representam animais reativos, enquanto valores extremos inferiores representam animais calmos (Fordyce et al., 1982; Grandin, 1993). A versão proposta por Fordyce et al. (1982) baseia-se na frequência e na intensidade de movimentação do animal dentro do tronco, variando de 1 a 7, e no grau de respiração audível dos animais, variando de 1 a 4. Já a versão apresentada por Grandin (1993), também avaliando o nível de movimentação, propôs uma adaptação, utilizando uma escala de cinco pontos. Sendo: (1) calmo, sem movimento, (2) um pouco inquieto, (3) se contorcendo, ocasionalmente forçando as paredes do tronco, (4) agitado, movimento contínuo e muito vigoroso e (5) saltando, torcendo o corpo e lutando violentamente. A redução de dois pontos em relação à escala do método de Fordyce et al. (1982) foi guiada pela expectativa de que um método com sete escores causaria dificuldades para diferenciá-los na prática.

Velocidade de fuga: esta é uma das medidas mais utilizadas e conhecidas para avaliação do temperamento de bovinos de corte, sendo caracterizada pela objetividade e praticidade, com possibilidade de ser mensurada automaticamente por meio de dispositivos eletrônicos. O teste consiste em medir a velocidade (m/s) com que o animal sai do tronco de contenção em direção a um espaço aberto, geralmente uma das divisórias do curral (Burrow et al., 1988). Nesse teste assume-se que bovinos com menor velocidade de fuga são aqueles com melhor temperamento, em oposição, considera-se que quanto maior a velocidade de fuga, mais reativos tendem a ser os bovinos (Burrow et al., 1988; Petherick et al., 2009).

Como diferentes aspectos do comportamento podem ser medidos por diferentes avaliações, é possível que uma pontuação combinada utilizando múltiplas avaliações possa permitir uma classificação de temperamento mais precisa. Estudos recentes têm utilizado uma média entre escore de tronco e velocidade de saída para atribuir uma pontuação de temperamento aos bovinos (Curley, et al., 2006). A partir desses dois métodos de avaliação de

temperamento, foi criado o índice de reatividade, combinando os dois métodos (King et al., 2006), de acordo com a formula:

$$IR = (ET + VF) / 2$$

Em que:

IR= Índice de reatividade

ET= Escore de tronco

VF= Velocidade de fuga

2.3 Condição sexual

O efeito da condição sexual tem se mostrado determinante de diferenças no crescimento e nas taxas de deposição dos diferentes tecidos corporais (Berg; Butterfield, 1976; Owens et al., 1995). Sendo assim, a característica sexual do animal influencia a composição do ganho de peso e a composição da carcaça. Animais de sexos diferentes chegam ao ponto de abate (baseado no grau de acabamento da carcaça) em pesos ou idades diferentes (Berg; Butterfield, 1976; Owens et al., 1995).

Os machos não castrados apresentam hormônios androgênicos que são responsáveis pela maior velocidade de crescimento muscular, com produção de carcaças maiores com menor quantidade de gordura, e melhor conversão alimentar (Restle et al., 1994; Restle et al., 1997; Restle et al., 1996). O desempenho superior representado pelo maior peso vivo, maior peso de carcaça, maior área muscular e melhores rendimentos de carcaça apresentados pelos bovinos não castrados é devido, estes possuem maior ação da testosterona, cuja função está relacionada a hipertrofia muscular (Lee et al., 1990).

A testosterona se liga aos receptores nos músculos e estimula o aumento da incorporação dos aminoácidos na proteína, aumentando assim a massa muscular sem um aumento concomitante no tecido adiposo (Dayton; White, 2008). O efeito de androgênios causa uma maior hipertrofia das fibras musculares, uma vez que machos não-castrados apresentam maiores áreas transversais das fibras quando comparados com animais castrados (Jiang; Ge, 2014; Wegner et al., 2000). Foram, associados com uma carcaça mais magra quando comparados em ponto de abate baseado em peso vivo e apresentarem maior reatividade que os castrados (Restle et al., 1996; Grandin; Dessing, 1998).

Entre as principais vantagens dos animais castrados, se refere ao manejo e a produtividade dos bovinos, pois ao tornar os animais mais dóceis também permite-se misturar os sexos com lotes com menor impacto na produção (Restle et al., 1994). A castração foi apontada como uma prática que reduz a atividade inibitória de calpastatina (Morgan et al.,

1993). Além disso, a castração aprimora o grau de qualidade da carne devido ao alto teor de gordura (Heaton et al., 2006).

No entanto, a maioria das castrações são realizadas pelo método cirúrgico, que pode acarretar uma série de transtornos decorrentes da realização deste procedimento, o que leva a concluir que o processo da castração física traz implicações que prejudicam temporariamente o crescimento e o desempenho dos bovinos, além da interferência de algumas correntes que julgam esta prática de ética questionável do ponto de vista do bem-estar animal (Bonneau; Enright, 1995), e que tem recebido atenção de consumidores. Desta forma, alternativas que propiciem o aproveitamento das boas características para a produção de carne apresentadas pelos machos não castrados cirurgicamente têm sido buscadas, como no caso da imunocastração, método alternativo à castração cirúrgica.

2.3.1 Imunocastração

A prática da castração de animais para abate vem sendo tradicionalmente realizada por motivos de manejo, econômicos e de aceitação de produto cárneo pelo consumidor. Além disso, alguns frigoríficos exigiam a castração dos animais, com a justificativa de favorecimento da uniformidade e melhora da qualidade da carcaça, além da conservação e do aspecto qualitativo da carne (Bretschneider, 2005). Existem diferentes tipos de castração, entre elas, a castração cirúrgica convencional, a castração química e a castração imunológica, também chamada de imunocastração. Todos esses tipos de castração consistem em impedir que ocorra a produção de hormônios androgênicos, que são os responsáveis pela manifestação das características indesejáveis no contexto de manejo em sistemas de terminação, tais como comportamentos agressivos e de caráter sexual (Zweiacher et al, 1979; Restle et al, 1996).

A utilização da imunocastração, que desde 1979 tem sido proposta como uma alternativa à castração cirúrgica em bovinos (Adams; Adams, 1992), pois reduz o comportamento agressivo dos machos (Price et al., 2003), e altera as características de carcaça e da carne (Amatayakul-Chantler et al., 2012) com impacto no bem-estar dos animais (Janett et al., 2012). A imunocastração é uma vacinação que proporciona a imunização contra o hormônio de liberação de gonadotropina (GnRH). O processo ocorre quando um antígeno do GnRH, é lançado na corrente sanguínea, estimulando a produção de anticorpos neutralizando o GnRH e, por consequência sua sinalização para secreção dos hormônios gonadotrópicos, inibindo a liberação de hormônios esteróides sexuais pelas gônadas (Adams, 1992; Janet et al., 2012). Em estudo realizado para avaliar os efeitos da vacinação na imunização contra o GnRH, no crescimento e função testicular em bezerro Holandeses, que receberam a vacina na

idade de 3 e 6 semanas de vida, os valores da concentração de testosterona foram sempre <0,5 ng/mL durante 22 semana de acompanhamento (Janet et al., 2012).

2.4 Transformação de músculo em carne

O processo de conversão do músculo em carne é complexo e envolve uma série de alterações no metabolismo celular e na estrutura proteica, caracterizando-se pela proximidade do esgotamento das reservas de trifosfato de adenosina (ATP), pela diminuição do pH ou acidificação, pela queda da temperatura da musculatura, pelo aumento da concentração de íons cálcio no citosol, pelo *rigor mortis*, entre outros (Lawrie, 2005). Duas fases se destacam ao longo da produção do tecido cárneo, sendo o estabelecimento do *rigor mortis* e o amaciamento da carne.

A primeira fase inicia-se logo após a morte do animal, e por consequência com a falência sanguínea, o aporte de oxigênio e o controle nervoso deixam de chegar à musculatura. Portanto, o músculo passa a recrutar gradativamente a via anaeróbia, para obter energia para um processo contrátil desorganizado; nesse processo há transformação de glicogênio em glicose, e como a glicólise estimulada concentra a rota anaeróbia, ocorre a geração de lactato e verifica-se também a queda do pH (Bendall, 1973), associada ao processo de contração no estabelecimento do *rigor mortis*. Nos primeiros momentos *post mortem*, o nível de ATP é mantido por conversão do ADP a ATP (fosfocreatina + ADP \Leftrightarrow creatina + ATP), mas quando a fosfocreatina é exaurida, inicia-se a queda do nível de ATP (Lametsch et al., 2002; Savabi et al., 1986). Como resultado, os prótons que são produzidos durante a hidrólise de ATP a ADP causam diminuição significativa do pH intracelular devido à liberação de íons H⁺, associada com redução do piruvato em lactato (Bate-Smith; Bendall, 1949), muito embora o lactato não seja fonte de acidificação e sim uma forma de transportar íons H⁺ para o líquido intersticial na tentativa de controlar o pH intracelular (Brooks, 2018). Com a diminuição da concentração de ATP, iniciam-se interações actino-miosina, em que o músculo começa uma fase de contração que continua até que o ATP desapareça. Após o desaparecimento quase total das reservas de ATP celular, o músculo não consegue mais relaxar e entra em contração irreversível, na qual a extensibilidade é nula, sendo chamada de *rigor mortis* (Bendall, 1973). Nessa fase verifica-se um encurtamento do sarcômero em músculos que não apresentam restrição física ao encurtamento durante o estabelecimento do *rigor mortis* (Koohmaraie; Doumit; Wheeler, 1996). Durante o processo ocorre a queda do pH de 7,0 para cerca de 5,4 a 5,8, e há perda da elasticidade do tecido muscular. A segunda fase corresponde a um potencial aumento gradual da maciez (amaciamento ou maturação), durante

o armazenamento refrigerado *post mortem*, mediado pela proteólise realizada por proteases naturais do músculo. Na proteólise *post mortem*, as mudanças são decorrentes da degradação de proteínas musculares, que são executadas por proteases que acabam por enfraquecer toda a estrutura da miofibrila, resultando em um aumento da maciez (Calkins, Seideman, 1988; Goll et al., 1992; Taylor et al., 1995; Piao et al., 2015; Veiseth-Kent et al., 2010). Existem proteases endógenas, que incluem as caspases, catepsinas e proteassomas, e o sistema calpaína, que são sistemas proteolíticos envolvidos na degradação de proteínas na fibra muscular, no entanto o sistema das calpaínas, especialmente a μ -calpaína, tem sido apontada de forma recorrente ao longo dos anos como responsável pela maior parte da proteólise *post mortem*, sendo inibida pelo seu inibidor natural calpastatina, tendo papel destacado no amaciamento da carne (Koohmaraie, 1992; Delgado et al., 2001; Geesink, 2006; Huff-Lonergan, 2014; Oliveira et al., 2019).

2.5 Sistema proteolítico calpaína e calpastatina

2.5.1 Calpaínas

As calpaínas são uma grande família de proteases cisteínicas dependentes de Ca^{2+} intracelular. Numerosos estudos mostraram que a atividade proteolítica de calpaína é responsável pelo amaciamento da carne (Sentandreu et al., 2002; Koohmaraie e Geesink, 2006). Portanto, esse complexo enzimático é considerado o principal sistema de protease endógena que contribui para a proteólise *post mortem* e amaciamento da carne (Koohmaraie e Geesink, 2006; Bernard et al., 2007; Neath et al., 2007). Devido, ao sistema cumprir com os critérios básicos: 1) as proteases devem ser endógenas às células musculares esqueléticas; 2) devem ser capazes de mimetizar alterações em miofibrilas *in vitro* em condições ótimas; 3) essas proteases estão disponíveis para proteínas do citoesqueleto e miofibrilares no tecido (Goll et al., 1983; Koohmaraie, 1996).

Os principais membros deste sistema, associados com amaciamento, são a μ -calpaína (calpaína 1) e a m-calpaína (calpaína 2), receberam o nome de acordo com a concentração molar de Ca^{2+} requerida para a sua atividade, sendo da ordem micromolar de cálcio para a μ -calpaína e milimolar de cálcio para a m-calpaína (Goll et al., 1989). A μ - e m-calpaína são heterodímeros compostos por duas subunidades, com pesos moleculares de aproximadamente 80 kDa e 28 kDa cada. A subunidade maior (subunidade de 80kDa), apresenta uma ligeira diferença entre a μ - e a m- calpaína, sendo a subunidade grande da μ -calpaína com aproximadamente 81.889 Da, e da m-calpaína 79.900 Da. A subunidade menor (28 kDa) é idêntica entre as duas calpaínas e codificada por um gene único, desempenha um papel importante na regulação da atividade da molécula (Ohno et al., 1990). A ativação da μ - e m-

calpaína também leva a uma autoproteólise e este evento diminui a necessidade da quantidade de Ca^{2+} requerida para atingir a metade da atividade máxima da μ -calpaína de 3 a 50 μM para 0,5 a 2,0 μM de Ca^{2+} e de 400 a 800 μM para 50 a 150 μM de Ca^{2+} para a m-calpaína. Também reduz o requerimento de Ca^{2+} para ligar a calpastatina de 40 μM para 0.042 μM de Ca^{2+} à μ -calpaína, e de 250 a 500 μM para 25 μM de Ca^{2+} na ligação à m-calpaína (Goll et al., 2003).

Antes do *post mortem* as calpaínas encontram-se localizadas em organelas subcelulares no interior do sarcoplasma (Goll et al., 2003). Durante a transformação do músculo em carne ocorre a migração das calpaínas para as regiões do disco Z e da banda I das miofibrilas (Raynaud et al. 2005). Devido à sua localização na fibra muscular durante a transformação do músculo em carne, tem sido relatado que a sua atuação está ligada a degradação das proteínas do citoesqueleto (titina e nebulina), dos filamentos intermediários (desmina) e das proteínas que contribuem para estabilidade da fibra muscular (troponinas e tropomiosina) (Goll et al, 2003; Neti et al., 2009). Dentre as calpaínas, estudos têm demonstrado que a μ -calpaína tem seu papel na proteólise no post-mortem mais acentuada que a m-calpaína, sendo mais importante no processo de amaciamento da carne (Hopkins; Thompson, 2002; Geesink, et al., 2006; Kemp et al, 2010). Neste sentido, a taxa e a extensão da autólise da μ -calpaína está diretamente relacionada ao enfraquecimento da estrutura miofibrilar, parte chave no processo de amaciamento da carne no período *post mortem* (Rowe et al., 2004). A produção de fragmentos das proteínas estruturais pela proteólise *post mortem* está positivamente relacionada com a extensão da proteólise (Huff-Lonergan et al., 1996). A medição da degradação destas proteínas tem sido relacionada com a maciez da carne decorrente da atuação das calpaínas.

Em bovinos já foram encontradas 10 isoformas da calpaína, sendo duas bem caracterizadas, a μ -calpaína e a m-calpaína, que são nomeados em referência à quantidade necessária de cálcio para serem ativadas. Em média a μ -calpaína requer entre 5 e 65 μM de Ca^{2+} , enquanto que a m-calpaína requer entre 300 e 1000 μM de Ca^{2+} (Li et al., 2009; Varricchio et al., 2013).

Além da necessidade de níveis de cálcio para serem ativados, as enzimas calpaínas precisam estar em uma faixa de pH ótimo para realizarem a proteólise, sendo que alguns estudos mostraram que as μ -calpaínas são ativadas quando o pH cai de 6,8 para aproximadamente 5,7; enquanto que as m-calpaínas são ativadas em pH em torno de 5,7 (Lonergan et. al., 2010). Outra importância do pH na atividade das calpaínas é que devido a alterações nos seus níveis, o substrato alvo das calpaínas tenham alterações em sua estrutura,

tornando os mais acessíveis para a sua atuação, aumentando assim a proteólise (Lonergan et al., 2010). Estudos demonstraram que o pH e a temperatura apresentam efeitos significativos na redução da atividade da μ -calpaína 4 horas *post mortem*, indicando sua maior ativação tanto pela rápida glicólise e ou lenta queda de temperatura, pois a calpaína é mais sensível a variação de pH e temperatura do que a calpastatina nas primeiras horas pós-abate, que pode ter influência no amaciamento (Hwang & Thompson, 2001).

2.5.2 Calpastatina

Inibidor exclusivo das calpaínas, a calpastatina foi descoberta nos anos 70 durante o processo de purificação das calpaínas (Rowe et al., 2004). Um único gene codifica a calpastatina em bovinos produzindo várias isoformas variando de 17,5 a 84 kDa (Salamino et al., 1994) por transcrições alternativas e diversos promotores presentes em vários tecidos. A isoforma de calpastatina predominante identificada no músculo esquelético de bovinos possui por volta de 74 kDa e migra para uma posição entre 115 a 125 kDa em gel de poliacrilamida (Samanta et al., 2010; Takano, et al., 1986). Possui os domínios XL e L antes de quatro domínios com capacidade inibitória, dando à molécula de calpastatina a capacidade de inibir até quatro moléculas de calpaína (Takano, et al. 1986).

Além de inibidora, a calpastatina se constitui em substrato e é quebrada pela ação das calpaínas, mas mesmo fragmentada possui atividade inibitória. A fragmentação da calpastatina presente no músculo esquelético é relacionada à quebra pela ação das calpaínas e os fragmentos gerados são semelhantes aos fragmentos gerados pela degradação *in vitro* da calpastatina purificada do músculo *Longissimus dorsi* (Samanta et al., 2010). A regulação desse sistema acontece por várias vias, como através da via do AMPc, fosforilação, acetilação e proteínas de choque térmico (Cong et al., 1998; Navegantes, Baviera e Kettelhut, 2009).

Vários estudos têm demonstrado que a atividade da calpastatina na inibição das calpaínas geram carnes com maior força de cisalhamento, decorrente da diminuição da proteólise das proteínas miofibrilares no *post mortem* (Goll et al., 2003; Kemp et al., 2010). Foi relatado que a diferença da maciez entre animais *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus* é devido a quantidade de calpastatina pós-rigor, sendo que o aumento da proporção de *Bos taurus indicus* na composição genética leva a uma diminuição na maciez (Shackelford et al., 1995; Rubensam et al., 1998; Ferguson et al., 2001). Além disso, foi descrito por Wheeler, Cundiff e Koch (1994) que em animais *Bos taurus indicus* é encontrado níveis menores de μ -calpaína. Devido ao rebanho brasileiro ser constituído em sua maioria por animais *Bos taurus indicus*, o conhecimento de animais que possuam menor quantidade de calpastatina e maior

de calpaína no *post mortem* pode ser utilizada como ferramenta de seleção para a melhoria da maciez.

No contexto molecular, os genes codificadores da μ -calpaína (CAPN1), m-calpaína (CAPN2) e da calpastatina (CAST) estão localizados, respectivamente, nos cromossomos 29 (Smith et al., 2000), 16 e 7 (Bishop et al., 1993) de bovinos. O gene CAPN1 bovino foi mapeado em posição de QTL do BTA29, região onde estudos relatam resultados positivos para a características correlacionadas com maciez da carne (Smith et al., 2000; Casas et al., 2005). Devido à fisiologia proteolítica e sua atuação nas vias metabólicas, os produtos da transcrição destes genes são considerados candidatos funcionais para características de qualidade de carne em animais de produção

Diante do exposto sobre o sistema proteolítico calpaína/calpastatina, podemos supor que os problemas de maciez da carne em animais *Bos taurus indicus* é devido, em grande parte, a menor expressão da calpaína e maior da calpastatina. Isto torna o estudo da expressão gênica e a quantificação das proteínas importante para o entendimento da influência deste complexo na qualidade final da carne dos animais da subespécie, entre os quais os da raça Nelore.

2.6 Fatores que influenciam a maciez da carne

2.6.1 Temperamento e maciez

Interações entre fatores genéticos e ambientais têm sido descritas como capazes de afetar a formação e a expressão do temperamento dos animais ao longo do tempo (Burrow, 1997; Grandin; Dessing, 1998;). De maneira geral, considera-se que animais de raças zebuínas (*Bos taurus indicus*) são mais temperamentais que os de raças taurinas (*Bos taurus taurus*) (Hearnshaw; morris, 1984; Voisinet et al., 1997a; Fordyce et al., 1988a; Piovezan et al., 2013). Nesse sentido, em estudos com progênie de vacas Brahman com touros de raças continentais (Limousin e Charolês) foram mais reativos do que quando comparados com os filhos de touros britânicos (Angus, Hereford e Shorthorn), sugerindo que o Limousin e o Charolês combinaram efeitos negativos do temperamento quando cruzados com raça Brahman, ou simplesmente apresentaram piores temperamentos assim como os animais zebuínos (Burrow; Corbet 2000).

Não obstante, os resultados de estudos considerando as diferenças intrínsecas no temperamento dos animais baseados na composição genética merecem cautela em sua interpretação uma vez que fatores ambientais como a interação homem-animal e o sistema de criação são capazes de alterar o temperamento dos animais, tornando-os mais ou menos reativos (Boissy; Bouissou, 1988; Becker; Lobato, 1997; Schwartzkopf-Genswein et al.,

1997, Cooke et al., 2009; Titto et al., 2010). Nesse sentido, o temperamento excitável já foi relatado nas raças de *Bos taurus taurus*, particularmente em bovinos jovens (Morris et al., 1994). Portanto, temperamentos excitáveis têm sido associados positivamente com reações de estresse neuroendócrino, independentemente do tipo de raça, categoria de idade e sistema de produção (Cookie, 2014). Não obstante, os bovinos têm uma concentração basal de cortisol de 15 a 25 nmol/L (5,44 a 9,06 ng/mL), que pode aumentar rapidamente para 60 a 200 nmol/L (21,75 a 72,50 ng/mL), dependendo do nível de estresse e das respostas individuais do animal (Chen et al. 2015).

O temperamento animal pode influenciar a maciez da carne, sendo que animais com temperamento mais reativo podem afetar as características de qualidade da carcaça e sensorial da carne (Burrow; Dillon, 1997; Cafe et al., 2011; Fell et al., 1999; Fordyce et al., 1988; King et al., 2006; Coutinho et al., 2017; Souza et al., 2019). Os dois últimos trabalhos apontam para uma relação de reatividade com maior atividade de calpastatina pós-rigor ou com sua fragmentação, resultando em carne com menor amaciamento. O impacto negativo na maciez da carne em animais reativos pode estar associado à maior responsividade ao estresse gerado por práticas rotineiras de manejo, como carga e descarga, transporte e o novo ambiente no frigorífico (Lensink et al., 2000). Normalmente esse estresse está associado a redução nos níveis de glicogênio muscular *in vivo*, devido ao gasto de energia mediante ao exercício físico ou estresse psicológico, o que pode, por sua vez, resultar em pH final considerado alto e tem um efeito significativo na força de cisalhamento da carne (Petherick et al., 2002; Apple et al., 2005; Cafe et al., 2011). Entretanto, alguns trabalhos têm observado que o estresse antes do abate afeta a maciez mesmo sem alteração do pH (King et al., 2006; Warner et al., 2007). Deste modo, não se pode desconsiderar o processo proteolítico como importante atuante na determinação da maciez quando há diferenças no temperamento.

Alguns estudos mostraram a relação entre animais mais reativo e carne menos macia, em que, os bifes das carcaças de bovinos reativos tinham maiores valores de força de cisalhamento do que os das carcaças de animais calmos (Voisinet et al., 1997). O efeito negativo na maciez da carne de animais reativos, pode ocorrer devido à alteração no amaciamento *post mortem*, resultado de uma maior estimulação dos receptores dos agonistas β -adrenérgicos (BAA) pelas catecolaminas (Gruber et al., 2010; Sensky et al., 1996). Animais mais excitáveis estão associados a maior tônus simpático e conseqüente maior estimulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, resultando em carne bovina com menor maciez (Gruber et al., 2010; Sensky et al., 1996; Coutinho et al., 2017).

2.6.2 Efeito da condição sexual sobre a maciez da carne

Já é bem estabelecido na literatura, que a condição sexual dos animais possui efeito nas características relacionadas à qualidade de carne (Gagaoua et al., 2015; Lima Júnior, 2011; Clemens et al., 1973). Estudos mostram também que animais não castrados podem apresentar maiores valores de pH final quando comparado com castrados (Gómez et al., 2017; Marti et al., 2013), relacionado com comportamento mais inquieto e irritabilidade em estresse, com evidências de prejuízos para maciez (Seideman et al., 1982). A taxa e extensão do declínio do pH é um dos fatores mais importantes que alteram a qualidade da carne, pois tem influência direta sobre a maciez da carne. Quando o músculo apresenta uma queda do pH gradual e sutil, com o pH final ficando acima de 5,8, pode ocorrer o aumento da incidência de carnes escuras, firmes e secas (DFD). Uma queda reduzida no pH está, geralmente, associada com as reservas limitadas de glicogênio, restringindo assim a capacidade muscular para realizar a glicólise *post mortem* (Scheffler; Park; Gerrard, 2011). Ademais, além do efeito anabolizante, a testosterona possui um efeito secundário sobre o temperamento dos animais, causando ao macho não castrado, uma maior susceptibilidade ao estresse pré-abate, produzindo carne com valor de pH elevado, cortes escuros e com pior maciez (Lee al., 1990).

Outra possível razão para diferença na maciez da carne entre animais não castrados e castrados, é devido o pH ser afetado também pelo rápido resfriamento das carcaças, uma vez que animais não castrados, geralmente, apresentam menor cobertura de gordura subcutânea (Blanco et al., 2020; Cancian et al., 2013; Kirkland et al., 2006) e com isso as carcaças resfriam mais rapidamente fazendo com que haja uma redução na queda do pH além de poder ocasionar o encurtamento das fibras pelo frio, reduzindo a maciez da carne (Huff Lonergan et al., 2010).

A variação da maciez entre as diferentes condições sexuais, pode estar relacionado com a maior ação direta da testosterona na fibra muscular, resultando em hipertrofia muscular, que por sua vez pode diminuir a maciez da carne em comparação ao animal castrado. Embora a ação da testosterona possa envolver diversos mecanismos que resultam na hipertrofia muscular (Chen, Zajac & MacLean, 2005), um dos processos pode envolver a alteração dos níveis de cálcio sarcoplasmático que pode ser estimulado em miotubos pela testosterona (Estrada et al., 2003), sendo que tal alteração foi associada com ação de fatores de crescimento para provocar a hipertrofia muscular (Semsarian et al., 1999). O aumento de cálcio pode também ser determinante para uma ação das calpaínas na degradação de receptores de androgênios, que pode ser impedida pela calpastatina, sendo um modelo testado em caso de células tumorais da próstata responsivas à androgênios (Pelley et al., 2006). A

deprivação de androgênios nesse mesmo modelo experimental causou uma expressão elevada de m-calpaína (Liu, Mendes; Berkman, 2014), demonstrando uma inter-relação entre sinalização por androgênios e o controle da estabilidade de seus receptores, que envolve o sistema das calpaínas.

Portanto, machos não castrados podem apresentar maior atividade de calpastatina, causando a inibição das calpaínas, afetando negativamente o processo proteolítico e por consequência a maciez (Morgan et al 1993; Wheeler et al 1990). De acordo com Andreo et al. (2013), a carne de bovinos Nelore imunocastrados foi mais macia que a de animais não castrados, possivelmente justificada pelo maior amaciamento provocado pela ação das calpaínas em animais imunocastrados. Em outro estudo, pesquisadores também encontraram carne mais macia nos animais castrados em relação aos não castrados (Rodrigues; Andrade 2004).

2.6.3 Efeito dos componentes raciais na maciez

Existem também diferenças fisiológicas entre espécies com suas raças que podem ser suficientes para resultar em alteração da qualidade do produto cárneo. O componente racial impacta na maciez de carne bovina (Alves et al., 2005; Muchenje et al., 2008). As variações na maciez da carne entre raças bovinas podem ser explicadas em boa parte pela genética do animal (46%), além do efeito do ambiente (54%) (Koochmaraie, 1995). Diferença entre animais *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus* tem sido identificada, com o primeiro grupo apresentando maiores problemas com inconsistência da maciez, o que torna a carne de qualidade inferior (Whipple et al., 1990). Historicamente, a carne dos zebuínos (*Bos taurus indicus*) era identificada como dura devido ao abate tardio dos animais decorrentes do sistema extensivo de terminação em pasto quando comparados com as raças precoces de bovinos britânicos ou europeus terminados em sistema intensivo (Alves; Mancio, 2007). Esta menor maciez da carne dos zebuínos poderia ser justificada pela alta correlação positiva entre a idade mais avançada de abate dos animais e o número de ligações cruzadas termoestáveis do colágeno dos músculos, favorecendo a dureza da carne (Listrat; Hocquette, 2005).

Outro dos fatores que podem influenciar a menor maciez da carne de zebuínos em relação aos taurinos, é a proteólise reduzida das proteínas miofibrilares associada à alta atividade de calpastatina nos músculos (Whipple et al., 1990; Camou et al., 2007). A participação crescente de genes de *Bos taurus indicus* em cruzamentos com *Bos taurus taurus*, normalmente tem sido associada à diminuição da maciez da carne devido à maior atividade de calpastatina na carne de *Bos indicus* e suas cruzas (Sensky et al., 2001). Observações da atividade da calpastatina realizadas por Pringle et al. (1997), detectaram

aumento da atividade da calpastatina e redução da atividade da calpaína, com o aumento da proporção *Bos taurus indicus* (Brahman) usadas nos cruzamentos. As raças também diferem quanto às curvas de crescimento dos tecidos e, conseqüentemente, ao menor ou maior acúmulo de gordura, ou ainda, quanto ao peso e espessura dos músculos ou cortes cárneos a um determinado peso de carcaça. Essas características são interligadas aos atributos visuais e organolépticos da carne (Jeleníková et al., 2008).

2.6.3.1 Marcador molecular no gene da calpastatina na maciez

Vários estudos têm sido realizados em bovinos de corte para avaliar o efeito de polimorfismos conhecidos, bem como para prospectar novos marcadores em genes candidatos associados a características de interesse econômico. É neste sentido que a calpastatina vem chamando a atenção para estudos de marcadores moleculares que possam ser utilizados para o melhoramento genético de bovinos de corte. A enzima calpastatina é codificada pelo gene *CAST* localizado no cromossomo 7 (Bishop et al., 1993), a sequências de nucleotídeos desse gene estão depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) sob os números de acesso AF159246.

A calpastatina, proteína inibidora das calpaínas, é a principal reguladora da atividade proteolítica no *post mortem* (Koochmaraie, 1988). As sequências helicoidais da calpastatina impedem as calpaínas de se ligarem às membranas (Mellgren et al., 1989), e os quatro domínios da calpastatina são capazes de inibir quatro moléculas de calpaínas. No músculo vivo, a ação elevada da calpastatina resulta na redução da degradação das proteínas (Morgan et al., 1993).

Estudo realizado por Barendse (2002) identificaram um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) caracterizado pela transição de uma adenina para uma guanina no 3'UTR do gene *CAST* (AF159246:g.2959A>G). Nesse sentido, Schenkel et al. (2006) associou os genótipos do marcador do gene da calpastatina (UOGCAST1) com a maior maciez da carne, quando o alelo favorável C substitui o alelo G. No Brasil, alguns estudos encontraram associações significativas do marcador da calpastatina com a maciez da carne de bovinos Nelore (Carvalho et al., 2017; Pinto et al., 2010). Por ser um inibidor específico das calpaínas, o aumento da atividade da calpastatina é correlacionado com a redução da maciez da carne (Koochmaraie et al., 1995; Pringle et al., 1997). Portanto, dispor do conhecimento de polimorfismos genéticos que controlam as características musculares e suas expressões pode trazer um melhor entendimento da fisiologia muscular e das características de qualidade da carne (Hocquete et al., 2007).

Referências

- Adams, T. E.; Adams, B. M. (1992). Feedlot performance of steers and bulls actively immunized against gonadotropin-releasing hormone. *Journal of Animal Science*, 70, 1691 - 1698.
- Aich, P.; Jalal, S.; Czuba, C.; Schatte, G.; Herzog, K.; Olson, D.J.H.; Ross, A.R.S.; Potter, A.A.; Babiuk, L.A.; Griebel, P. (2007). Comparative Approaches to the Investigation of Responses to Stress and Viral Infection in Cattle. *Omics J. Integr. Biol*, 11, 413–434.
- Alves, D. D., & Mancio, A. B. (2007). Maciez da carne bovina: uma revisão. *Revista da FZVA*, 14, 193-216
- Alves, D.; & Mancio, A. B. (2005). Maciez da carne bovina. *Ciência Animal Brasileira*, 6, 163 149.
- Amatayakul-Chantler, S. et al. (2012). Brown Swiss bulls in a feedlot with the *Bos indicus* aging of meat. *Journal of Food Science*, 67, 635-638.
- Andreo, N. et al. (2013). Influência da imunocastração (Bopriva®) no ganho de peso, características de carcaça e qualidade de carne de bovinos Nelore. *Semina: Ciências Agrárias*, 34, 4121-413.
- Argôlo, L. S. et al. (2010). Comportamento e temperamento em ruminantes. *PUBVET*, Londrina, 4, 118, Art. 795.
- Barendse, W. J. 2002. DNA markers for meat tenderness. International patente application PCT/AU02/00122. International patent publication WO 02/064820 A1.
- Bate-Smith, E. C., & Bendall, J. R. (1949). Factors determining the time course of rigor mortis. *The Journal of Physiology*, 110, 47-65.
- Becker, B. G.; Lobato, J. F. P.(1997). Effect of gentle handling on the reactivity of Zebu crossed calves to humans. *Applied Animal Behaviour Science*, 53, 219– 224.
- Bendall, J.R. (1973). Post-mortem changes in muscle. In: BOURNE, G.H. *The structure and function of muscle*. New York: Academic Press. p.244-309.
- Berg, R. T., & Butterfield, R. M. (1976). *New concepts of cattle growth*. Sydney: Sydney University Press, 240 p.
- Berg, R. T., & Butterfield, R. M. (1976). *New concepts of cattle growth*. Sydney: Sydney University Press, 240 p.
- Bernard, C., I. Cassar-Malek, M. L. Cunff, H. Dubroeuq, G. Renand and J. F. Hocquette. (2007). New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 5229-5237.

Bishop, M. D.; Koohmaraie, M.; Killefer, J.; Kappes, S. (1993). Rapid communication: restriction fragment length polymorphisms in the bovine calpastatin gene. *Journal of Animal Science*, 71, 2277.

Boissy, A.; Bouissou M. F. (1988). Effects of early handling on heifers' subsequent reactivity to humans and to unfamiliar situations. *Applied Animal Behaviour Science*, 20, 259-73.

Bonneau, M.; Enright, W. J. (1995). Immunocastration in cattle and pigs. *Livestock Production Science*, 42, 193-200.

Boissy, A., Veissier, I., & Roussel, S. (2001). Behavioural reactivity affected by chronic stress: an experimental approach in calves submitted to environmental instability. *Animal Welfare*, 10(S1), S175-S185.

Bretschneider, G. (2005). Effects of age and method of castration on performance and stress response of beef male cattle: A review. *Livest. Prod. Sci.* 97:89–100.

Broom, D. M. (1987). Applications of neurobiological studies to farm animal welfare. In *Biology of Stress in Farm Animals: An Integrative Approach: A seminar in the CEC programme of coordination research on animal welfare, held on April 17–18, 1986, at the Pietersberg Conference Centre, Oosterbeek, The Netherlands* (pp. 101-110). Springer Netherlands.

Brooks G. A. (2018). The Science and Translation of Lactate Shuttle Theory. *Cell metabolism*, 27(4), 757–785.

Brown, E.J.; Vosloo, A. (2017). The involvement of the hypothalamopituitary-adrenocortical axis in stress physiology and its significance in the assessment of animal welfare in cattle. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 84.

Burdick, N.C.; Randel, R.D.; Carroll, J.A.; Welsh, T.H. (2011). Interactions between Temperament, Stress, and Immune Function in Cattle. *Int. J. Zool.*, 2011, 1–9.

Burrow, H. M.; Corbet, N. J. (2000). Genetic and environmental factors affecting temperament of zebu and zebu-derived beef cattle grazed at pasture in the tropics. *Australian Journal of Agricultural Research*, 51, 155–162,

Burrow, H. M.; Dillon, R. D. (1997). Relationships between temperament and growth in a feedlot and commercial carcass traits of *Bos indicus* crossbreds. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 37, 407-411.

Burrow, H. M.; Dillon, R. D. (1997). Relationships between temperament and growth in a feedlot and commercial carcass traits of *Bos indicus* crossbreds. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, v. 37, 407–411.

Burrow, H.; Seifert, G.; Corbet, N. (1988). A new technique for measuring temperament in cattle. *Proc Aust Soc Anim Prod*, 17. 155-168.

Cafe, L. M., D. L. et al. (2011). Cattle temperament: Persistence of assessments and associations with productivity, efficiency, carcass and meat quality traits. *Journal of Animal Science*, Champaign, 89, 1452-1465.

Cafe, L. M., D.L. Robinson, D.M. Ferguson, G.H. Geesink, P.L. (2011b). Greenwood Temperament and hypothalamic-pituitary-adrenal axis function are related and combine to affect growth, efficiency, carcass, and meat quality traits in Brahman steers. *Domestic Animal Endocrinology*, 40, 230-240

Calkins, C.R., & Seideman, S.C., (1988). Relationships among calcium-dependent protease, cathepsins B and H, meat tenderness and the response of muscle to aging. *Journal of Animal Science*, 66, 1186-1193.

Camou, J. P., Marchello, J.A., Thompson, V.F., Mares S.W., & Goll, D.E. (2007). Effect of postmortem storage on activity of μ - and m-calpain in five bovine muscles. *Journal of Animal Science*, 85, 2670-2681.

Casas, E.; Winte, S. N.; Riley, D. O.; Smith, T. P. L.; Brenneman, R. A. (2005). Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. *Journal of Animal Science*, 83, 3-19.

Carvalho, M.E G. Gasparin, M.D. Poleti, A.F. Rosa, J.C.C. Balieiro, C.A. Labate, L.L. Coutinho. (2014). Heat shock and structural proteins associated with meat tenderness in Nellore beef cattle, a *Bos indicus* breed. *Meat Science*, 96, 1318-1324.

Chen, Y.; Arsenault, R.; Napper, S.; Griebel, P. (2015). Models and Methods to Investigate Acute Stress Responses in Cattle. *Animals*, 5, 1268–1295.

Clemens, E. et al. (1973). Fatty acid composition of bulls and steers as influenced by age and dietary energy level. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 37, p. 1326-1331.

Collier, R.J.; Gebremedhin, K.G. (2015). Thermal Biology of Domestic Animals. *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, 3, 513–532.

Collier, R.J.; Renquist, B.J.; Xiao, Y. (2017). A 100-Year Review: Stress physiology including heat stress. *J. Dairy Sci.*, 100, 10367–10380.

Coombes, S.V. G.E. Gardner, D.W. Pethick, P. (2014). McGilchrist The impact of beef cattle temperament assessed using flight speed on muscle glycogen, muscle lactate and plasma lactate concentrations at slaughter. *Meat Science*, 98, 815-821.

Cooke, R. F.; Arthington, J. D.; Austin, B. R.; Yelich, J. V. (2009). Effects of acclimation to handling on performance, reproductive, and physiological responses of Brahman-crossbred heifers. *Journal of Animal Science*, 87, 3403–3412.

Cooke, R. F.; Schubach, K. M.; Marques, R. S.; Peres, R. F. G.; Silva, L. G. T.; Carvalho, R. S.; Cipriano, R. S.; Bohnert, D. W.; Pires, A. V.; Vasconcelos, J. L. M. (2017). Effects of temperament on physiological, productive, and reproductive responses in *Bos indicus* beef cows. *Journal of Animal Science*, 95, 1-8.

Coutinho, M.A.S. Ramos, PM; Silva, SL; Martello, LS; Pereira, Delgado. EF. (2017). Divergent temperaments are associated with beef tenderness and the inhibitory activity of calpastatin. *Meat Science* 134: 61-67.

Curley, D.A. Neuendorff, A.W. Lewis, J.J. Cleere, T.H. Welsh, R.D. (2008). Randel Functional characteristics of the bovine hypothalamic–pituitary–adrenal axis vary with temperamento *Hormones and Behavior*, 53, 20-27.

De Tullio, R., Aversa, M., Salamino, F., Pontremoli, S. and Melloni, E. (2000). ‘Differential degradation of calpastatin by μ - and m-calpain in Ca^{2+} -enriched human neuroblastoma LAN-5 cells’, *FEBS Letters*, 475, 17–21.

Delgado, E. F., Geesink, G. H., Marchello, J. A., Goll, D. E. and Koohmaraie, M. (2001). ‘Properties of myofibril-bound calpain activity in longissimus muscle of callipyge and normal sheep’, *Journal of Animal Science*, 79, 2097–2107.

Dransfield, E. (1999). Meat tenderness - The mu-calpain hypothesis. In: *International congress of meat science and technology*, 45., 1999, Yokohama. *Proceedings...* Yokohama, 1999. p. 220-228.

England, Eric M.; matarneh, Sulaiman K.; Oliver, Emily M.; ApaoblazA, Ariel; Scheffler, Tracy L.; SHI, Hao; Gerrard, David E. (2016). Excess glycogen does not resolve high ultimate pH o oxidative muscle. *Meat Science*, 114, 95–102.

Estrada, M., Espinosa, A., Müller, M., & Jaimovich, E. (2003). Testosterone stimulates intracellular calcium release and mitogen-activated protein kinases via a G protein-coupled receptor in skeletal muscle cells. *Endocrinology*, 144(8), 3586–3597.

Fell L.R. et al. (1999). Associations between temperament, performance and immune function in cattle entering a comercial. feedlot. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 39, 795- 802.

Ferguson, D. M.; Bruce, H. L.; Thompson, J. M.; Egan, A. F.; Perry, D.; Shorthose, W. R. (2001). Factors affecting beef palatability - farmgate to chilled carcass. *Animal Production Science*, 41, 7, 879-891.

Figueiredo, L.G.; Pereira Eler, J.; Barreto Mourão, G., Sterman Ferraz, J.B.; Carvalho Balieiro, J.C.; Chicaroni De Mattos. (2005). Análise genética do temperamento em uma população da raça Nelore. *Livestock Research for Rural Development*, 17, 1-7.

Fordyce, G.; Goddard, M. E.; Seifert, G. W. (1982). the measurement of temperament in cattle and the effect of experience and genotype. *animal production in australia*, 14, 329–332.

Fordyce, G.E.; Dodt, R.M.; Wythes, J.R. (1988). Cattle temperaments in extensive beef herds *Journal of Animal Science*, Champaign, 93, 5419-5429.

Francisco, C,L. F.D. Resende, J.M.B. Benatti, A.M. Castilhos, R.F. Cooke, A.M. Jorge. (2015). Impacts of temperament on Nellore cattle: Physiological responses, feedlot performance, and carcass characteristics, *Journal of Animal Science*, 93, 5419-5429.

Gagaoua, M. et al. (2015). Understanding early post-mortem biochemical processes underlying meat color and pH decline in the Longissimus thoracis muscle of young blond d'Aquitaine bulls using protein biomarkers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, 63, 6799-809, 2015.

Geesink, G.H., Kuchay, S., Chishti, A.H., & Koochmaraie, M. (2006). μ -Calpain is essential for postmortem proteolysis of muscle proteins. *Journal of Animal Science*, 84, 2834-2840.

Goll D. E.; Thompson V. F.; Li, H.; Wei, W.; Cong, J. (2003). The calpain system. *American Physiology Society Revision*, 83, 731–801.

Goll, D. E., R. M. Robson and M. H. Stromer. (1984). Skeletal muscle, nervous system, temperature regulation, and special senses. In: *Duke's physiol. domestic anim* (Ed. M. J. Swensen). Ithaca, N.Y: Cornell University Press. pp. 548-580.

Goll, D. E., V. F. Thompson, H. Li, W. Wei and J. Cong. (2003). The calpain system. *Physiol. Rev.* 83:731-801.

Goll, D.E., Thompson, V. F., & Taylor, R. G. I. (1992). Role of the calpain system in muscle growth. *Biochimie*, 74, 225-237.

Gómez, J. F. M.; Netto, A. Saran; Antonelo, D. S.; Silva, J.; Sene, G. A.; Silva, H. B.; DIAS, N. P.; Leme, P. R.; Silva, S. L. (2017). Effects of immunocastration on the performance and meat quality traits of feedlot-finished *Bos indicus* (Nellore) cattle. *Animal Production Science*, 59, 183–190, 2017.

Grandin, T.(1993). Behavioral agitation during handling of cattle is persistent over time. *Applied Animal Behaviour Science*, Amsterdam, 36, 1-9.

Grandin, T.; Deesing, M. J. (1998). Genetics and behavior during handling, restraint and herding. In: GRANDIN, T. (Ed.), *Genetics and the Behavior of Domestic Animals*, 1998, Academic Press, San Diego, California, USA, 113-144.

Graunke, K. L. (2013). Describing temperament in an ungulate: a multidimensional approach. *Plos One*, San Francisco, 8, 574-579.

Gregory, N.G.; Grandin, T.(1998). *Animal welfare and meat science*. Wallingford: CABI Publ., 1997. 298 p.

Grignard, L. et al. (2000). The social environment influences the behavioural responses of beef cattle to handling. *Applied Animal Behaviour Science*, 68, 1-11.

Gruber, S.I, J.D. Tatum, T. Engle, E. Chapman, P.L. Belk, K. E., & Smith, G. C. (2010). Relationships of behavioral and physiological symptoms of preslaughter stress to beef Longissimus muscle tenderness *Journal of Animal Science*, 88, 1148-1159.

Haskell, M. J.; Simm, G.; Turner, S. P. (2014). Genetic selection for temperament traits in dairy and beef cattle. *Frontiers in Genetics*, 5 368-378.

Hearnshaw, H.; Morris, C. A. (1984). Genetic and environmental effects on a temperament score in beef cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*, 5, 723–733.

Hedrick, H. B.; Thompson, G. B.; Krause, G. F. (1969). Comparison of feedlot performance and carcass characteristics of half-sib bulls, steers and heifers. *Journal of animal science*, 29, 687–694.

Hocquette, J.F.; Lehnert, S.; Barendse, W.; Cassar-Malek, I.; Picard, B. (2007). Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality. *Animal*, 1, 159–173.

Hopkins, D. L.; Thompson, J. M. (2002). Factors contributing to proteolysis and disruption of myofibrillar proteins and the impact on tenderisation in beef and sheep meat. *Crop and Pasture Science*, 53, 149-166.

Huang C.J., Webb H.E., Zourdos M.C., Acevedo E.O. (2013). Cardiovascular reactivity, stress, and physical activity. *Front. Physiol.* 2013;4:314.

Hwang, I., H.; Thompson, J. M. (2001). The interaction between pH and temperature decline early postmortem on the calpain system and objective tenderness in electrically stimulated beef longissimus dorsi muscle. *Meat Science*, v.58, 167- 174.

Huff-Lonergan, E. (2014). Tenderizing mechanisms: enzymatic. *Encyclopedia of Meat Sciences*, 3, 438-442.

Huff-Lonergan, E., T. Mitsuhashi, D. D. Beekman, F. Parrish Jr, D. G. Olson and R. M. Robson. (1996). Proteolysis of specific muscle structural proteins by mu-calpain at low pH and temperature is similar to degradation in postmortem bovine muscle. *J. Anim. Sci.* 74:993-1008.

Janett F, Gerig T, Tschuor AC, Amatayakul-Chantler S, Walker J, Howard R, (2012). Effect of vaccination against gonadotropin-releasing factor (GnRF) with bopriva® in the prepubertal bull calf. *Anim Reprod science.* (2012) 131:72–80.

Jeleníková, J., Pipek, P., & Staruch, L. (2008). The influence of ante-mortem treatment on relationship between pH and tenderness of beef. *Meat Science*, 80, 870-874.

Jiang, H.; Ge, X. (2014). Meat science and muscle biology symposium-mechanism of growth hormone stimulation of skeletal muscle growth in cattle. *Journal of Animal Science*, 92: 21–29, 2014.

Kanawa, R., Ji, J.-R., & Takahashi, K. (2002). Inactivity of μ -calpain throughout postmortem aging of meat. *Journal of Food Science*, 67(2), 635-638.

Kemp, C. M., P. L. Sensky, R. G. Bardsley, P. J. Buttery and T. Parr. 2010. Tenderness-An enzymatic view. *Meat Sci.* 84:248-256.

Kemp, C. M.; Sensky, P. L.; Bardsley, R. G.; Buttery, P. J.; Parr, T. (2010). Tenderness - An enzymatic view. *Meat Science*, 84, 248-256.

King, D. A. et al. (2006). Influence of animal temperament and stress responsiveness on the carcass quality and beef tenderness of feedlot cattle. *Meat Science*, 74, 546-556.

Koohmaraie, M. (1988). The role of endogenous proteases in meat tenderness. In: *Reciprocal Meat Conference*, 41., 1988, Wyoming. Proceedings... Champaign: AMSA, 1988. p. 89-100.

Koohmaraie, M. (1992). The role of Ca (2+)-dependent proteases (calpains) in *post mortem* proteolysis and meat tenderness. *Biochimie*, 74, 239–245.

Koohmaraie, M. (1995). The biological basis of meat tenderness and potential genetic approaches for its control and prediction. *Proceedings of the Reciprocal Meat Conference*. 48, 69–75.

Koohmaraie, M., & Geesink, G. H. (2006). Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat Science*, 74, 34–43.

Koohmaraie, M., Doumit, M. E., & Wheeler, T. L. (1996). Meat toughening does not occur when rigor shortening is prevented. *Journal of Animal Science*, 74, 2935–2942.

Kumar, B. Stress and its impact on farm animals. *Front. Biosci.* 2012, E4, 1759–1767.

Lametsch, R., Roepstorff, P., & Bendixen, E. (2002). Identification of protein degradation during post-mortem storage of pig meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5508–5512.

Lawrie, R. (2005). *Ciência da Carne*. 6 ed. Porto Alegre: Artmed. 384p.

Lay, D.C.; Friend, T.H.; Randel, R.D.; Jenkins, O.C.; Neuendor, D.A.; Kapp, G.M.; Bushong, D.M. (1996) Adrenocorticotrophic hormone dose response and some physiological effects of transportation on pregnant Brahman cattle. *J. Anim. Sci.* 74, 1806.

Lee, C. Y. et al. (1990). Growth and hormonal response of intact and castrate male cattle to trembolone acetate and estradiol. *Journal of Animal Science*, Champaign, 68, 2682- 2689.

Leme, T. M. C. Bem-estar e qualidade de carne de ovinos submetidos à suplementação com o cromo orgânico e diferentes manejos pré-abate. 2013. 123 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

Lensink, B.J., Fernandez, X., Boivin, X., Pradel, P., Le Neindre, P., and Veissier, I. (2000). The impact of gentle contacts on ease of handling, welfare, and growth of calves, and quality of veal meat. *Journal of Animal Science* 78, 1219-1226.

Leonardo, E.F. et al. (2008). Differential growth retardation and myofibrillar fragmentation in rats submitted to feed restriction and realimentation. *Scientia Agricola* 65(2): 122-129.

- Liu, T., Mendes, D. E., & Berkman, C. E. (2014). Prolonged androgen deprivation leads to overexpression of calpain 2: implications for prostate cancer progression. *International journal of oncology*, 44(2), 467–472.
- Li, Y.; Arnold, J. M.; Pampillo, M.; Babwah, A. V.; Peng, T. (2009). Taurine prevents cardiomyocyte death by inhibiting NADPH oxidase-mediated calpain activation. *Free Radical Biology and Medicine*, 46, 51-61.
- Lima, D. M. J. et al. (2011). Alguns aspectos qualitativos da carne bovina: uma revisão. *Acta Veterinaria Brasilica*, Mossoró, 5, 351-358.
- Listrat, A., & Hocquette J.F. (2005). Analytical limits of total and insoluble collagen content measurement and of type I and III collagens analysis by electrophoresis in bovine muscles. *Meat Sciences*, 68, 127-136.
- Lonergan, E. H.; Zhang, W.; Lonergan, S. M. (2010). Biochemistry of post-mortem muscle - Lessons on mechanisms of meat tenderization. *Meat Science*, 86, 184-195.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. (1951). 'Protein measurement with the Folin phenol reagent.', *The Journal of biological chemistry*, 193, 265–275.
- Luchiari Filho, A. (2000). *Pecuaria da carne bovina*. São Paulo: 134p.
- Lynch, E.; Earley, B.; McGee, M.; Doyle, S. (2010). Effect of abrupt weaning at housing on leukocyte distribution, functional activity of neutrophils, and acute phase protein response of beef calves. *BMC Vet. Res.*, 6, 39.
- Maffei, W.E. (2009). Reatividade animal. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38, 81-92.
- Margulis, B. A. and Welsh, M. (1991). 'Isolation of hsp70-binding proteins from bovine muscle', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 178, 1–7.
- Marti, S.; Realini, C. E.; Bach, A.; Pérez-Juan, M.; Devant, M. (2013). Effect of castration and slaughter age on performance, carcass, and meat quality traits of Holstein calves fed a high-concentrate diet. *Journal of Animal Science*, 91, 1129–1140.
- Mellgren, R.L; Lane, R.D; Mericle, M.T. (1989). The binding of large calpastatin to biologic membranes is mediated in part by interaction of an amino terminal region with acidic phospholipids. *Biochemica et Biophysica Acta*, Amsterdam, v. 999, 71-77.
- Minton, J.E. (1994). Function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the sympathetic nervous system in models of acute stress in domestic farm animals. *J. Anim. Sci.*, 72, 1891–1898.
- Moberg, G.P.; Mench, J.A. (2000). *The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare*, 1st ed.; CABI Pub: Wallingford, CT, USA, 309–377, ISBN 978-0-85199-359-1.

- Monin, G., & Quali, A. (1991). Muscle differentiation and meat quality. In: RALSTON, L. (Ed.) *Developments in meat science*. Elsevier applied Science, 13, 89-138.
- Morgan, J.B., Wheeler, L. T. L., Koochmarai, M., Crouset, J. D., & Savell, J.W. (1993). Effect of castration on myofibrillar protein turnover, endogenous proteinase activities, and muscle growth in bovine skeletal muscle. *Journal of Animal Science*, 71, 408-414.
- Mormède, P.; Andanson, S.; Aupérin, B.; Beerda, B.; Guémené, D.; Malmkvist, J.; Manteca, X.; Manteuel, G.; Prunet, P.; van Reenen, C.G. (2007). Exploration of the hypothalamic–pituitary–adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiol. Behav*, 92, 317–339.
- Muchenje, V., Dzama, K., Chimonyo, M., Raats, J.G., & Strydom, P.E. (2008). Meat quality of Nguni, Bonsmara and Aberdeen Angus steers raised on natural pasture in the Eastern Cape. *Meat Science*, 79, 20–28.
- Muller, L., Restle, J. (1983). Carcass characteristics of steers and young bulls. In: *European congress of meat researcher workers, 29, 1983, Parma. Proceedings*. Parma: CERCA, 1983., 530-535.
- Navegantes, Baviera e Kettelhut, 2009. The inhibitory role of sympathetic nervous system in the Ca²⁺-dependent proteolysis of skeletal muscle. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 42: 21-28.
- Neath, K. E., A. N. Del Barrio, R. M. Lapitan, J. R. V. Herrera, L. C. Cruz, T. Fujihara, S. Muroya, K. Chikuni, M. Hirabayashi and Y. Kanai. (2007). Protease activity higher in postmortem water buffalo meat than Brahman beef. *Meat Sci*. 77:389-396.
- Neti, G. Novak, S. M.; Thompson, V. F.; Goll, D. E. (2009). Properties of easily releasable myofilaments: are they the first step in myofibrillar protein turnover?. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 296, 1383-1390.
- Ohno, S., S. Minoshima, J. Kudoh, R. Fukuyama, Y. Shimizu, S. Ohmi-Imajohs, N. Shimizu and K. Suzuki. (1990). Four genes for the calpain family locate on four distinct human chromosomes. *Cytogenet. Genome Res*. 53:225-229.
- Owens, F. N., Donald, R., David, S., & Secrist, S. W. Coleman (1995). Review of some aspects of growth and development of feedlot cattle. *Journal of Animal Science*, 73, 3152–3172.
- Pelley, R. P., Chinnakannu, K., Murthy, S., Strickland, F. M., Menon, M., Dou, Q. P., Barrack, E. R., & Reddy, G. P. (2006). Calmodulin-androgen receptor (AR) interaction: calcium-dependent, calpain-mediated breakdown of AR in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer research*, 66(24), 11754–11762.
- Petherick, J. C. (2002). Productivity, carcass and meat quality of lot-fed *Bos indicus* cross steers grouped according to temperament. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, East Melbourne, 42, 389-398.

Petherick, J. C.; Doogan, V. J.; Holroyd, R. G.; Olsson, P.; Venus, B. K. (2009). Quality of handling and holding yard environment, and beef cattle temperament: Relationships with flight speed and fear of humans. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 120, 18- 27.

Piao, M. Y., Jo, C., Kim, H. J., Lee, H. J., Kim, H. J., Ko, J. Y., & Baik, M. (2015). Comparison of carcass and sensory traits and free amino acid contents among quality grades in loin and rump of Korean cattle steer. *Journal of Animal Science*, 28, 1629–1640.

Pinto, L.F.B. J.B.S. Ferraz, F.V. Meirelles, J.P. Eler, F.M. Rezende, M.E. Carvalho, R.C.G. Silva. (2010). Association of SNPs on CAPN1 and CAST genes with tenderness in Nellore cattle *Genetics and Molecular Research*, 9, 1431-1442

Piovezan, U.; Cyrillo, J. N. S. G.; Paranhos Da Costa, M. J. R. (2013). Breed and selection line differences in the temperament of beef cattle. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, 35, 207–212.

Price, E. O. et al. (2003). Aggressive behavior is reduced in bulls actively immunized against immunocastration of gonadotropin-releasing hormone vaccine Bopriva provides improved in northern queensland. 1. Factors affecting temperament. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 28, 683-687

Pringle, T.D.; Williams, S.E.; Lamb, B.S.; Johnson, D.D.; West, R.L. (1997). Carcass characteristics, the calpain proteinase system, and aged tenderness of Angus and Brahman crossbred steers. *Journal of Animal Science*, Albany, v. 75, p. 2955-2961.

Raynaud, F.; Fernandez, E.; Coulis, G.; Aubry, L.; Vignon, X.; Bleimling, N.; Gautel, M.; Benyamin, Y.; Ouali, A. (2005). Calpain 1–titin interactions concentrate calpain 1 in the Z-band edges and in the N2-line region within the skeletal myofibril. *Febs Journal*, 272, 2578-2590.

Réale, D.; Reader, S.M.; Sol, D.; McDougall, P.T.; Dingemanse, N.J. (2007). Integrating animal temperament within ecology and evolution. *Biological Reviews*, Hoboken, 82, 291-318.

Restle, J.; Grassi, C.; Feijó, G. L. D. (1994). Características de carcaça de bovinos de corte inteiros ou castrados em diferentes idades. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 29, 1603-1607

Restle, J.; Grassi, C.; Feijó, G. L. D. (1996). Características das carcaças e da carne de bovinos inteiros ou submetidos a duas formas de castração em condições de pastagem. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 25, 334-344.

Rodrigues, V. C.; Andrade, I., (2004). Características físico-químicas da carne de bubalinos e de bovinos castrados e inteiros. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, 33, 1839-1849.

Rothbart, M. K.; Evans, D. E.; Ahadi, S. A. (2000). Temperament and personality: origins and outcomes. *Journal of Personality and Social Psychology*, Washington, 78, 122-135.

Rowe LJ, Maddock KR, Lonergan SM, Huff-Lonergan E. (2004). Oxidative environments decrease tenderization of beef steaks through inactivation of μ -calpain. *J Anim Sci.* 82, 3254–66.

Rowe, L.J.; Maddock, K.R.; (2004). Lonergan SM, Huff-Lonergan E. Oxidative environments decrease tenderization of beef steaks through inactivation of μ -calpain. *J Anim Sci.*, 82, 3254–66.

Rubensam, J. M.; Felicio, P. E.; Termignoni, C. (1998). Effects of the *Bos indicus* genotype on calpastatin activity and texture of beef from steers slaughtered in the south of Brazil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 18, 405-409.

Salamino, F.; De Tullio, R.; Michetti, M.; Mengotti, P.; Melloni, E.; Pontremoli, S.; (1994). Modulation of calpastatin specificity in rat tissues by reversible phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*, 199, 1326–32.

Samanta, K., Kar, P., Chakraborti, T., Shaikh, S. and Chakraborti, S. (2010). ‘Characteristic properties of endoplasmic reticulum membrane m-calpain, calpastatin and lumen m-calpain: A comparative study between membrane and lumen m-calpains’, *Journal of Biochemistry*, 147, 765–779.

Savabi, F., Geiger, P. J., & Bessman, S. P., (1986) Myokinase and contractile function of glycerinated muscle fibers. *Biochem. Med. Metab. Biol*, 35, 227–238.

Schenkel, F. S.; Miller, S. P.; Jiang, Z.; Mandell, I. B.; Ye, X.; Li, H.; Wilton, J. W. (2006). Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *Journal of Animal Science*, 84, 291-299.

Scheffler, Tracy L.; Park, Sungkwon; Gerrard, David E. (2001). Lessons to learn about postmortem metabolism using the AMPK γ 3R200Q mutation in the pig. *Meat Science*, 89, 244–250.

Schwartzkopf-Genswein, K. S.; Stookey, J. M.; Janzen, E. D.; Mckinnon, J. (1997). Effects of branding on weight gain, antibiotic treatment rates and subsequent handling ease in feedlot cattle. *Canadian Journal of Animal Science*, 77, 361-367.

Seideman, S. C H., Cross, R., Oltjen, & Schanbacher, B. D.. (1982). Utilization of the intact male for red meat production. *Journal of Animal Science*, 55, 826-840.

Selye, H. A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. (1936). *Nature*, 32, 138-147.

Semsarian, C.; Wu, M.; Ju, Y.; Marciniac, T.; Yeoh, T.; Allen, D.; Harvey, R.; Graham, R.M. (1999). Skeletal muscle hypertrophy is mediated by a Ca²⁺-dependent calcineurin signalling pathway. *Nature* 400:576–580.

Sensky , PL , Parr , T. , Bardsley , RG e Buttery , PJ (1996) . Relação entre a concentração plasmática de epinefrina e a atividade do sistema enzimático calpaína no músculo longissimus suíno . *Journal of Animal Science* 74 : 380-387 .

Sensky, P.L., Parr, T., Bardsley, R.G., & Buttery, P.J. (2001). Meat tenderisation – the role of calpains. *Proceedings of the British Society of Animal Science*. British Society of Animal Science, 11, 239-242.

Sentandreu, M. A, Coulis, G., & Ouali, A. (2002). Role of muscle endopetidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends in Food Science & Technology*, 13, 400-421.

Shackelford SD, Wheeler TL, Koohmaraie M. (1995). Relationship between shear force and trained sensory panel tenderness ratings of 10 major muscles from *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. *J Anim Sci.*, 73,3333–40.

Silveira, I.D.B.; Fischer, V.; Wiegand, M.M. (2008).Temperamento de bovinos de corte: métodos de medida em diferentes sistemas produtivos. *Archivos de Zootechnia*, 57, 321- 332.

Smith, T. P. L.; Casas, E.; Rexroad, C. E.; Kappes, S. M. and Keele, J. W. 2000. Bovine CAPN1 maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat tenderness. *Journal of Animal Science* 78:2589-2594.

Souza, G. M., Coutinho, M. A. D. S., Ramos, P. M., de Oliveira, G. M., Lonergan, S. M., & Delgado, E. F. (2019). Tough aged meat presents greater expression of calpastatin, which presents postmortem protein profile and tenderization related to Nellore steer temperament. *Meat science*, 156, 131–138.

Takano, E., Maki, M., Hatanaka, M., Mori, H., Zenita, K., Sakihama, T., Kannagi, R., Marti, T., Titani, K. and Murachi, T. (1986) 'Evidence for the repetitive domain structure of pig calpastatin as demonstrated by cloning of complementary DNA', *FEBS Letters*, 208, 199–202.

Taylor, R.G.; Geesink, G.H.; & Thompson, V.F. (1995). Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization? *Journal of Animal Science*, 73, 1351.

Thompson, J. M. (2002). Managing meat tenderness. *Meat Science*, 62, 295-308.

Titto, E.A.L., Titto, C.G., Gatto, E.G., Noronha, C.M.S., Mourão, G.B., Nogueira Filho, J.C.M., Pereira, A.M.F., (2010). Reactivity of Nellore steers in two feedlot housing systems and its relationship with plasmatic cortisol. *Livest. Sci.* 129, 146-150.

Tupling, A. R., Gramolini, A. O., Duhamel, T. A., Kondo, H., Asahi, M., Tsuchiya, S. C., Borrelli, M. J., Lepock, J. R., Otsu, K., Hori, M., MacLennan, D. H. and Green, H. J. (2004) 'HSP70 binds to the fast-twitch skeletal muscle sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA1a) and prevents thermal inactivation', *Journal of Biological Chemistry*, 279, 52382–52389.

Turner, S.P.; Navajas, E.A.; Hyslop, J.J.; Ross, D.W.; Richardson, R.I.; Prieto, N.; Bell, M.; Jack, M.C.; Roehe, R. (2011). Associations between response to handling and growth and meat quality in frequently handled beef cattle. *Journal of Animal Science*, Champaign, 89, 4239-4248.

Varricchio, E.; Russolillo, M. G.; Maruccio, L.; Velotto, S.; Campanile, G.; Paolucci, M.; Russo, F. (2013). Immunological detection of m-and μ -calpains in the skeletal muscle of Marchigiana cattle. *European Journal of Histochemistry*, 57, 10-15.

Veiseth, E.; Shackelford, S. D.; Wheeler, T. L.; Koohmaraie, M. (2001). Effect of postmortem storage on mu-calpain and m-calpain in ovine skeletal muscle. *Journal of Animal Science*, 79, 1502–1508.

Veiseth-Kent, E., Hollung, K., & Ofstad, R. (2010). Relationship between muscle microstructure, the calpain system and shear force in bovine Longissimus dorsi muscle. *Journal of Animal Science*, 88, 34-51.

Voisinet, B.D. et al., (1997). Bos indicus-cross feedlot cattle with excitable temperaments have tougher meat and a higher incidence of borderline dark cutters. *Meat Science* 46(4): 367-377.

Von Borell, E.; Dobson, H.; Prunier, A. (2007). Stress, behaviour and reproductive performance in female cattle and pigs. *Horm. Behav.*, 52, 130–138.

Wang, K. (1982) . Purification of titin and nebulin', *Methods in Enzymology*, 85, 264–274.

Warner, R.D.; Ferguson, D.M.; Cottrell, J.J.; Knee, B.W. (2007). Acute stress induced by the preslaughter use of electric prodders causes tougher beef meat. *Animal Production Science*, Clayton, 47, 782-788.

Warris, P. D. (1998). The effect of stocking density in transit on the carcass quality and welfare of slaughter pigs: results from analysis of blood and meat samples. *Meat Science*, Amsterdam, 50, 447-456.

Warriss, P. D.; Brown, S. N.; Rolph, T. P.; Kestin, S. C. (1990). Interactions between the beta-adrenergic agonist salbutamol and genotype on meat quality in pigs. *Journal of Animal Science*, Champaign, 68, 3669 – 3676.

Wegner, J.; Albrecht, E.; Fiedler, I.; Teuscher, F.; Papstein, H. J.; Eder, k. (2000). Growth- and breed-related changes of muscle fiber characteristics in cattle. *Journal of Animal Science*,. 78, 1485–1496, 2000.

Wheeler, T. L.; Cundiff, L. V.; Koch, R. M. (1994). Effect of marbling degree on beef palatability in Bos taurus and Bos indicus cattle. *Journal of Animal Science*, 72, 3145-3151.

Wheeler, T. L.; Davis, J. W.; Cross, H. R.; Lund, D. K.; Smith, S. B. (1990). Mechanism associated with the variation in meat from Brahman and Hereford cattle. *Journal of Animal Science*, 68, 4206-1990.

Whipple, G., Koohmaraie, M., & Dikeman, M.E. (1990). Evaluation of attributes that affect longissimus muscle tenderness in Bos Taurus and Bos indicus cattle. *Journal Animal Science*, 68, 2716-28.

Wong, D.L.; Tank, A.W. (2007). Stress-induced catecholaminergic function: Transcriptional and post-transcriptional control. *Stress*, 10, 121–130.

Zweiacher, E. R. et al. (1979). Effects of methods and time of castration of feeder calves. *Journal of Animal Science*, 49, 5-9.

3. BOVINOS NELORE IMONOCASTRADO COM SNP CAST HOMOZIGOTO DESFAVORÁVEL PARA TEXTURA DA CARNE REDUZEM A TAXA DE AMACIAMENTO

Resumo

O objetivo do estudo foi realizar associação entre SNP do gene CAST e maciez do músculo *Longissimus lumborum* em bovinos da raça Nelore, em duas condições sexuais. Foram utilizados 51 animais machos, sendo: 26 não-castrados (NC) e 25 imunocastrados (IM). Os animais foram alojados em confinamentos experimentais. Os animais imunocastrados receberam vacina de imunocastração (Anti-GnRH). Os animais foram genotipados para SNP do gene CAST em três grupos: 1) homozigoto A; 2) idem G ou 3) heterozigoto AG. No momento da sangria do animal foi realizada a coleta de sangue para determinação de lactato plasmático. O pH e a temperatura foram mensurados diretamente no músculo *Longissimus lumborum* (LL) nos seguintes tempos: 1, 3, 6, 9 e 24h *post mortem*. O músculo LL foi retirado das meia-carcaças esquerdas dos animais, as 24h *post mortem*, para porcionamento em bifes para a determinação das seguintes variáveis: cor, perdas por cozimento (PPC), força de cisalhamento (FC) e atividade inibitória de calpastatina. Houve efeito de genótipo e tempo *post mortem* ($P < 0,05$) para o declínio de pH do músculo *Longissimus lumborum*. O declínio de temperatura do músculo *Longissimus lumborum* apresentou efeito da interação entre condição sexual, genótipo e tempo *post mortem* ($P < 0,05$). As concentrações de lactato plasmático e atividade inibitória de calpastatina não foram influenciadas pela condição sexual ou genótipo ($P > 0,05$). A FC apresentou efeito da interação entre condição sexual e genótipo ($P < 0,05$), e do tempo *post mortem*. Aos 7 e 14 dias *post mortem*, os animais IM-GG apresentaram FC significativamente superior a todos os outros fenótipos. Aos 28 dias de maturação, a única diferença identificada foi entre IM-AA e IM-GG. Na comparação da FC dentro de cada condição sexual e genótipo nos tempos *post mortem* a FC dos animais IM-AA e IM-AG apresentaram diferenças para todos os tempos de maturação, exceto para IM-AG entre os dois tempos finais de maturação. Para os animais IM-GG não houve alterações entre tempos consecutivos de maturação. A FC para os animais NC nos genótipos AA e AG não apresentaram diferenças da maciez após 14 dias de maturação. Os animais NC-GG também não apresentaram alterações entre os tempos consecutivos. As PPC e os valores de cor não apresentaram efeito para condição sexual e genótipo e nem para interação entres esses dois fatores ($P > 0,05$), houve efeito do tempo *post mortem* para essas variáveis. Nosso estudo sugere que alelo A do polimorfismo de CAST tem impacto favorável para amaciamento com redução continuada da força de cisalhamento durante a maturação da carne de bovinos machos Nelores.

Palavras-chave: Condição sexual, Força de cisalhamento, pH

Abstract

The aim of the study was to establish an association between the SNP of the CAST gene and the tenderness of the *Longissimus lumborum* muscle in Nelore cattle, in two sexual conditions. Fifty-one male animals were used: 26 uncastrated (NC) and 25 immunocastrated (IM). The animals were housed in experimental feedlots. Immunocastrated animals received immunocastration vaccine (Anti-GnRH). The animals were genotyped for CAST gene SNP in three groups: 1) homozygous A; 2) ditto G or 3) heterozygous AG. When the animal was bled, blood was collected to determine plasma lactate. The pH and temperature were measured directly in the *Longissimus lumborum* (LL) muscle at the following times: 1, 3, 6, 9 and 24h *post mortem*. The LL muscle was removed from the left half-carcasses of the animals, 24h *post mortem*, for portioning into steaks to determine the following variables:

color, cooking losses (PPC), shear force (FC) and calpastatin inhibitory activity. There was an effect of genotype and *post mortem* time ($P < 0.05$) for the pH decline of the *Longissimus lumborum* muscle. The temperature decline of the *Longissimus lumborum* muscle showed an effect of the interaction between sexual condition, genotype and *post mortem* time ($P < 0.05$). Plasma lactate concentrations and calpastatin inhibitory activity were not influenced by sexual condition or genotype ($P > 0.05$). HR showed an effect of the interaction between sexual condition and genotype ($P < 0.05$), and *post mortem* time. At 7 and 14 days *post mortem*, IM-GG animals showed significantly higher HR than all other phenotypes. At 28 days of aging, the only difference identified was between IM-AA and IM -GG. When comparing the HR within each sexual condition and genotype at *post mortem* times, the HR of IM-AA and IM-AG animals showed differences for all aging times, except for IM-AG between the two final aging times. For IM-GG animals there were no changes between consecutive aging times. The FC for the NC animals in the AA and AG genotypes did not show differences in tenderness after 14 days of aging. The NC-GG animals also showed no changes between consecutive times. PPC and color values showed no effect for sexual condition and genotype, nor for the interaction between these two factors ($P > 0.05$), there was an effect of *post mortem* time for these variables. Our study suggests that the A allele of the CAST polymorphism has a favorable impact on tenderization with continued reduction in shear force during the aging of meat from male Nellore cattle.

Keywords: Sexual condition, pH, Shear force

3.1 Introdução

A demanda por carne de alta qualidade tem despertado a atenção da cadeia de carne em diversos países, estimulando a indústria na busca por adequações para consistentemente produzir e fornecer carne que tenha os atributos sensoriais desejados pelo consumidor, dentre outros aspectos de qualidade, e garantir o consumo contínuo de produtos cárneos (Henchion et al. 2014). As características associadas à qualidade requerida pelo consumidor são dependentes de vários fatores como a estrutura muscular, genótipo, condição sexual, alterações *post mortem* nos tecidos musculares, efeitos do estresse no pré-abate, pH muscular, processamento e armazenamento dos produtos (Joo et al., 2013).

Dentre as características sensoriais, a maciez apresenta a maior variabilidade (Koohmaraie, 1992), sendo mensurada apenas após o abate, no entanto ocupando lugar de destaque para definição das expectativas que influenciam a aquisição da carne e satisfação de consumidores (Behrends et. al., 2005; Koohmaraie, 1992). A atividade da calpaína está relacionada à degradação da proteína miofibrilar, e uma atividade mais alta da μ -calpaína está associada ao aumento da maciez, enquanto a calpastatina tem um efeito inibitório na atividade da calpaína e, portanto, está relacionada com a regulação da proteólise *post mortem* (Huff Lonergan et al., 2010).

Marcadores moleculares em genes candidatos associados a características de interesse, como o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) que faz a troca de uma guanina por uma

adenina na região 3' não traduzida do gene da calpastatina (CAST), patenteado por Barendse et al. (2002), podem ser de grande utilidade para identificação de animais com alto valor genético para maciez e o processo de seleção pode ser realizado em animais mais jovens, mesmo antes do nascimento. (King, et al 2006). A substituição do alelo G para A, na região não traduzida 3'UTR do RNAm de CAST, associa o alelo A com carne mais macia (Barendse et al., 2002; Natrass et al., 2014).

A condição sexual do animal tem sido relacionada com a maciez da carne, pois animais não castrados apresentam maior atividade de calpastatina em comparação com animais castrados, causando a inibição das calpaínas, afetando negativamente o processo proteolítico e por consequência a maciez (Morgan et al 1993; Wheeler et al 1990). sobre a calpastatina, aumentando sua atividade (Wulf et al., 1996; O'Connor et al., 1997), portanto, o estudo dos genes e a quantificação da calpastatina, associado a categorias sexuais distintas, se faz importante para o entendimento dessas relações com maciez da carne.

Com base nestas informações, a hipótese inicial da presente pesquisa foi que o Polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) do gene CAST com presença do homozigoto A em bovinos da raça Nelore tem associação positiva com maciez, apresentando menor atividade inibitória de calpastatina independentemente da condição sexual (não castrado ou imunocastrado); Portanto, o objetivo do estudo foi realizar associação entre SNP/CAST, atividade inibitória de calpastatina pós-rigor e maciez do músculo *Longissimus lumborum*, em duas condições sexuais.

3.2 Material e Métodos

Animais

Foram utilizados 51 machos bovinos da raça Nelore, sendo: 26 não-castrados (NC) e 25 imunocastrados (IM) apresentando três genótipos para polimorfismo de nucleotídeo único no gene CAST: AA, AG e GG (tabela 1). Os animais possuíam peso médio inicial de 350 ± 30 kg e idade média de 18 meses, provenientes do rebanho experimental do Campus da USP de Pirassununga. Os animais foram alojados em dois confinamentos experimentais de acordo com o peso inicial (bloco), sendo que um grupo de 17 animais foram distribuídos em baias contendo portões eletrônicos (Calan Gates) que permitem o controle individual da alimentação, enquanto os outros 34, foram alojados em baias individuais. Os animais foram submetidos a um período de adaptação, às instalações e às dietas por 14 dias. Os animais foram alimentados diariamente (*ad libitum*) com uma dieta contendo 85% de concentrado e 25% de volumoso (silagem de milho). O consumo foi registrado individualmente, com base no oferecido e nas sobras.

Imunocastração

Os animais imunocastrados receberam duas doses da vacina de imunocastração (Anti-GnRH; Bopriva®, Pfizer Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil). A primeira dose foi aplicada, por pessoa capacitada para realizá-la de forma adequada e segura, 30 dias antes do início do confinamento e a segunda no início do confinamento, conforme recomendação do fabricante.

Extração do DNA

A genotipagem foi realizada através da coleta de pelos com bulbo capilar, que foram retirados da cauda dos animais, durante o primeiro manejo, na entrada do confinamento. Os pelos foram imediatamente acondicionados em um envelope de papel, previamente identificado.

A extração do DNA foi realizada a partir de 5 bulbos capilares (triplicatas) com aproximadamente de 0,5 cm dos pelos em microtubos de 1,5 ml. Após o corte dos bulbos, adicionou-se 50µl de solução de lise (200 mM NaOH). Os microtubos foram incubados a 95°C por 10 minutos, para que ocorra a quebra das membranas celulares e consequentemente a dispersão do DNA celular. As amostras foram submetidas a centrifugação à 13000 RPM por 10 segundos, visando separar o DNA das organelas e proteínas presentes no interior das células que, após a quebra celular, estarão dispersas na solução. Na próxima etapa, adicionou-se 50µl de solução neutralizante (200 mM HCl; 100 mM Tris-HCl ph 8,5), homogeneizando bem, essa solução tem o objetivo de parar a atividade de quebra da primeira solução e neutralizar o pH de toda a reação. Após a realização de todas as etapas de extração as alíquotas foram armazenadas em freezer (-20°C). A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

Análise de PCR

Para a amplificação para a detecção dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) foi realizada pela técnica de PCR convencional, utilizando-se iniciadores (primers). A avaliação dos SNPs foi realizada por digestão com enzimas de restrição que reconhecem sítios específicos no DNA.

O polimorfismo CAST/Dde I envolveu a amplificação de um fragmento de 25 nmoles DNA, 23 bases usando forward 5'CTCACGTGTTCTTCAGTGTTCTG3' e reverse primer 5'CAACCCAAAGAAACATCAAACACAGT3', seguido pela digestão da endonuclease de restrição DdeI, essa reconhece a restrição do sítio 5'C'TNAG 3' (Invitrogen, EUA), localizado no cromossomo 7.

As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 25 µL contendo 3 uL de amostra de DNA, 10 uL de mix de PCR BIO (PCR- Biosystems m), 10 uL de água ultrapura e 1 uL de cada iniciador CAST. Posteriormente, as amostras foram para fase de amplificação em termoclicador (Bio-Rad), a desnaturação inicial a 95 °C por 3 min, a amplificação foi realizada em 30 ciclos a 95 °C por 30 s 1 min, 58 °C por 1 min (CAST/DdeI) e 72°C por 1 min, seguido por uma etapa de extensão final a 72°C por 5 min. Posteriormente os produtos de PCR foram separados e observados por eletroforese em gel de agarose 1,5%.

Foram utilizados 5 uL de produto da PCR para a digestão com endonuclease de restrição Dde I em um volume final de 9 µL contendo 1,2 uL tampão, 0,2 uL de endonuclease de restrição Dde I, 2,6 ul de água ultra pura. A digestão foi realizada em termociclador 37°C por 3 horas. Fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose low melt 3,5 %, utilizando marcador molecular de 50 pb. A eletroforese ocorreu por 40 min a 90v, após a corrida do gel, estes foram fotografados em fotodocumentador (Bio-Rad). A partir da genotipagem foram encontrados três genótipos: homozigotos AA ou GG, e heterozigotos AG (tabela 1).

Tabela 1- Números de animais por condição sexual para cada genótipo

Variáveis	AA	AG	GG	Total
IM	10	12	3	25
NC	9	14	3	26
Total	19	26	6	51

IM= Imunocastrado; NC= Não castrado

Abate

O ponto final de acabamento dos animais para o abate foi determinado pela espessura de gordura subcutânea, obtida por ultrassom na região do *Longissimus lumborum* entre a 12ª e 13ª costelas. Dessa forma, os animais que atingiram a cobertura mínima de 5 mm de espessura de gordura, foram destinados ao abate. Os abates aconteceram no abatedouro experimental do campus USP – Pirassununga, o qual funciona sob inspeção estadual e está localizado a 400 m do confinamento. Os animais foram transportados de caminhão, pela manhã, do confinamento ao abatedouro após jejum alimentar de 12h e com acesso livre à água. Ao todo, foram 6 datas de abate (tabela 2), sendo que foram abatidos os seguintes números de animais: 7, 8, 8, 12, 12 e 4 por data, até completar todos os 6 abates. Para os dados de declínio de pH e temperatura não foram utilizados os animais do abate 6.

Tabela 2- Distribuição dos animais de acordo com a condição sexual e genótipo em relação as datas de abate.

Condição sexual	IM			NC			Total
	AA	AG	GG	AA	AG	GG	
Abate 1	1	3	-	-	2	1	7
Abate 2	2	2	-	-	3	1	8
Abate 3	1	1	2	1	3	-	8
Abate 4	3	2	1	5	1	-	12
Abate 5	2	4	-	2	4	-	12
Abate 6	1	-	-	1	1	1	4
Total							51

IM=Imunocastrado; NC= Não castrado

Coleta de amostra

Lactato plasmático

No momento da sangria do animal foi realizada a coleta de sangue com auxílio de copo plástico descartável. Parte do sangue foi então transferido para tubos de coleta de 4 ml, os quais possuíam fluoreto de sódio e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Os tubos foram devidamente identificados, homogeneizados e transferidos a uma caixa com gelo. Após o término do abate, realizou-se a centrifugação a 2000 x g por 20 min, posteriormente o plasma foi transferido para microtubos, os quais foram armazenados em freezer convencional (-20 °C) até o momento das análises.

As amostras do plasma congeladas foram analisadas no Laboratório de Metabolismo Animal do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP, Piracicaba-SP. Foi utilizado kit enzimático comercial para a determinação das concentrações de lactato (Lactato Enzimático–Labtest Diagnóstica S.A), por espectrofotometria de ponto final, utilizando-se filtro de absorvância específico por protocolo em sistema automático para bioquímica (Modelo SBA 200 – CELM).

pH e temperatura

Os valores de pH e temperatura foram mensurados diretamente no músculo Longissimus lumborum (LL) utilizando pHmetro portátil Hanna (modelo HI99163). O pH foi determinado nos seguintes tempos: tempos 1, 3, 6, 9 e 24h *post mortem*. Simultaneamente foi realizada a aferição da temperatura com auxílio de termômetro portátil do tipo espeto (Multi-thermometer).

Coleta de amostras do músculo Longissimus lumborum

Amostras do músculo *Longissimus lumborum* (LL), foram coletadas aproximadamente 1h *post mortem*, as quais foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Às 24h *post mortem*, o músculo *Longissimus lumborum* foi retirado das meia-carcaças esquerdas dos animais para porcionamento em frações menores destinadas a maturação, sendo que uma pequena porção de cada músculo foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido.

O músculo LL foi porcionado em 4 bifés de 2,5 cm de espessura e outros 4 bifés de 1 cm de espessura, sendo todos destinados a maturação por 1, 7, 14 e 28 dias, Todos os bifés foram embalados à vácuo e maturados em câmara de resfriamento (1 a 4 °C). Após cada tempo de maturação, os bifés de 2,5 cm do músculo LL foram imediatamente utilizados à determinação da força de cisalhamento.

Os bifés de menor espessura, após cada tempo de maturação, foram congelados em nitrogênio líquido. Todas as amostras em nitrogênio líquido foram transferidas para armazenamento em ultrafreezer (- 80 °C), até o momento das análises. Tais amostras foram utilizadas para determinação de atividades enzimáticas.

Análises laboratoriais

Cor

Ao final de cada período de maturação, as amostras foram retiradas das embalagens a vácuo e foram expostas ao oxigênio por 30 minutos. Posteriormente, foi realizada uma avaliação objetiva da cor da carne usando o sistema CIELab (CIE, 1986), com o auxílio de um espectrofotômetro portátil, modelo CM2500d (Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japão) com iluminante padrão D65, ângulo de observação de 10° e a abertura do obturador de 30 mm.

Os valores de L* (luminosidade), a* (intensidade do vermelho) e b* (intensidade do amarelo) de cada amostra foram obtidos através da média de três leituras aleatórias.

Perda de peso por cocção (PPC).

Para essa análise foram utilizados bifés 2,5cm de espessura. As amostras foram pesadas e em seguida assadas em forno elétrico industrial (Modelo F130/L – Fornos Elétricos Flecha de Ouro Ind. e Com. Ltda., São Paulo, Brasil), equipado com um termostato a 170° C. Ao atingir a temperatura interna de 40° C as amostras foram viradas e permaneceram no forno até atingir a temperatura interna de 71°C. Em seguida, as amostras permaneceram em temperatura ambiente até resfriarem, quando foram novamente pesados após cozimento para determinação das perdas por cocção. A PPC foi determinada pela diferença do peso antes e depois do cozimento.

Força de cisalhamento (FC)

O procedimento foi executado de acordo com as recomendações da American Meat Science Association - AMSA (1995). No mesmo dia em que cada tempo de maturação se concluiu, os respectivos bifos daquele tempo foram retirados das embalagens à vácuo e destinados ao cozimento. Cada bife foi posicionado sob uma grelha acoplada a uma bandeja de alumínio, e com um sensor de temperatura espetado em seu centro geométrico. O cozimento foi feito em forno elétrico industrial (Modelo F130/L – Fornos Elétricos Flecha de Ouro Ind. e Com. Ltda., São Paulo, Brasil) equipado com um termostato a 170° C). Quando os bifos atingiram a temperatura interna de 40 °C foram virados e cozidos até a temperatura interna atingir 71 °C. Retirados do forno, foram transferidos para resfriar sob temperatura ambiente, sendo embalados em plástico e colocados em refrigerador.

No dia seguinte, no mínimo seis e no máximo oito cilindros de 1,27 cm de diâmetro foram retirados de cada bife, seguindo o alinhamento das fibras musculares. Os cilindros foram submetidos a cisalhamento em equipamento do tipo Warner-Bratzler, sendo o valor máximo de força requerido para corte, registrado. A média aritmética da força considerando todos os cilindros foi calculada para representar o respectivo bife, sendo expressa em Newtons (N).

Atividade inibitória caseinolítica de calpastatina

A atividade inibitória de calpastatina total foi realizada pelo método proposto por Koohmaraie et al. (1995), com algumas modificações. Foram utilizadas 8 gramas do músculo *Longissimus lumborum* 24 horas post mortem, que foram homogeneizadas em 50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8,3. O tampão de extração também continha inibidores proteolíticos: 100 mg/L de ovomucóide, 2 mM PMSF e 6 mg/L de leupeptina. Posteriormente, o homogeneizado foi centrifugado a 24.652 ×g por 180 min. Em seguida, o sobrenadante foi dialisado em tampão de Tris 40 mM, EDTA 5 mM, pH 7,3, durante 18 horas. Após a diálise, o extrato foi aquecido a 95°C por 30 minutos. Posteriormente ao aquecimento as amostras foram resfriadas em gelo e seguiram para centrifugação a 24.652 ×g por 30 min. Posteriormente sobrenadante foi carregado em coluna de 15×120 cm preenchida com DEAE Sephacel. Após o carregamento, as colunas foram lavadas com Tris 40 mM, NaCl 25 mM em pH 7,5. A eluição foi com Tris 40 mM, NaCl 200 mM, em pH 7,5. Após, foi realizado um ensaio de atividade inibitória com auxílio de espectrofotômetro (Shimadzu 1800), o qual baseia-se nas alterações na leitura de absorbância a 278 nm após adição de substrato (caseína) e semi-purificado de m-calpaína (utilizou-se m-calpaína pulmonar purificada por DEAE-Sephacel e fenil sepharose como fonte de m-calpaína). Quando a mudança de 1 unidade de

absorbância ocorrer, o resultado será considerado proporcional a 1 unidade de atividade enzimática inibitória.

Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizados (datas de abate) em arranjo fatorial 2 x 3, sendo duas condições sexuais (imunocastrados (IM) e não castrados (NC) e três genótipos (AA, AG e GG). As variáveis: declínio de pH e temperatura cor, força de cisalhamento e perdas por cozimento foram analisadas como medidas repetidas no tempo foram analisadas como medidas repetidas no tempo utilizando-se o procedimento MIXED do pacote estatístico SAS. Conforme modelo: $Y_{ijkl} = \mu + b_i + F_{1j} + F_{2k} + (F_{1F2})_{jk} + W_i + (F_{1W})_{jl} + (F_{2W})_{kl} + (F_{1F2W})_{jkl} + e_{ijkl}$. Onde, Y_{ijk} = variável resposta; μ = média geral; b_i = efeito do bloco; F_{1j} = efeito do fator 1 (condição sexual: IM vs. NC); F_{2k} = efeito fator 2 (genótipo: AA, AG e GG); F_{1F2jk} = efeito da interação F1 x F2; W_i = efeito do tempo post mortem; F_{1Wjl} = efeito da interação F1 x tempo post mortem; F_{2Wkl} = efeito da interação F2 x tempo post mortem; $F_{1F2Wjkl}$ = efeito da interação F1 x F2 x tempo post mortem; e_{ijkl} = erro residual. Para efeito de comparação de médias, foi utilizado o método dos quadrados mínimos (LSMEANS), com nível de significância de 5%.

As variáveis de atividade inibitória caseinolítica de calpastina e concentração de lactato plasmático, foram analisadas como variáveis não repetidas, utilizando o seguinte modelo estatístico: $Y_{ijk} = \mu + b_i + F_{1j} + F_{2k} + (F_{1F2})_{jk} + e_{ijk}$. Onde, Y_{ijk} = variável resposta; μ = média geral; b_i = efeito do bloco; F_{1j} = efeito do fator 1 (condição sexual: IM vs. NC); F_{2k} = efeito fator 2 (genótipos: AA, GG e AG); F_{1F2jk} = efeito da interação F1 x F2. Para efeito de comparação de médias, foi utilizado o método dos quadrados mínimos (LSMEANS), com nível de significância de 5%.

3.3 Resultados

3.3.1 Declínio do pH e temperatura do músculo *Longissimus Lumborum* e concentração de lactato plasmático

Houve efeito de genótipo ($P < 0,05$) para o declínio de pH do músculo *Longissimus lumborum* (figura 1B), os genótipos AA e AG apresentaram valores iguais, GG diferiu de AA, na média geral os animais GG apresentam os maiores valores de pH. Contudo, todos os genótipos apresentaram os valores de pH finais às 24 horas *post mortem* dentro da faixa normal entre 5,3 e 5,8. Como esperado houve efeito do tempo *post mortem* (figura A), todos os tempos foram diferentes.

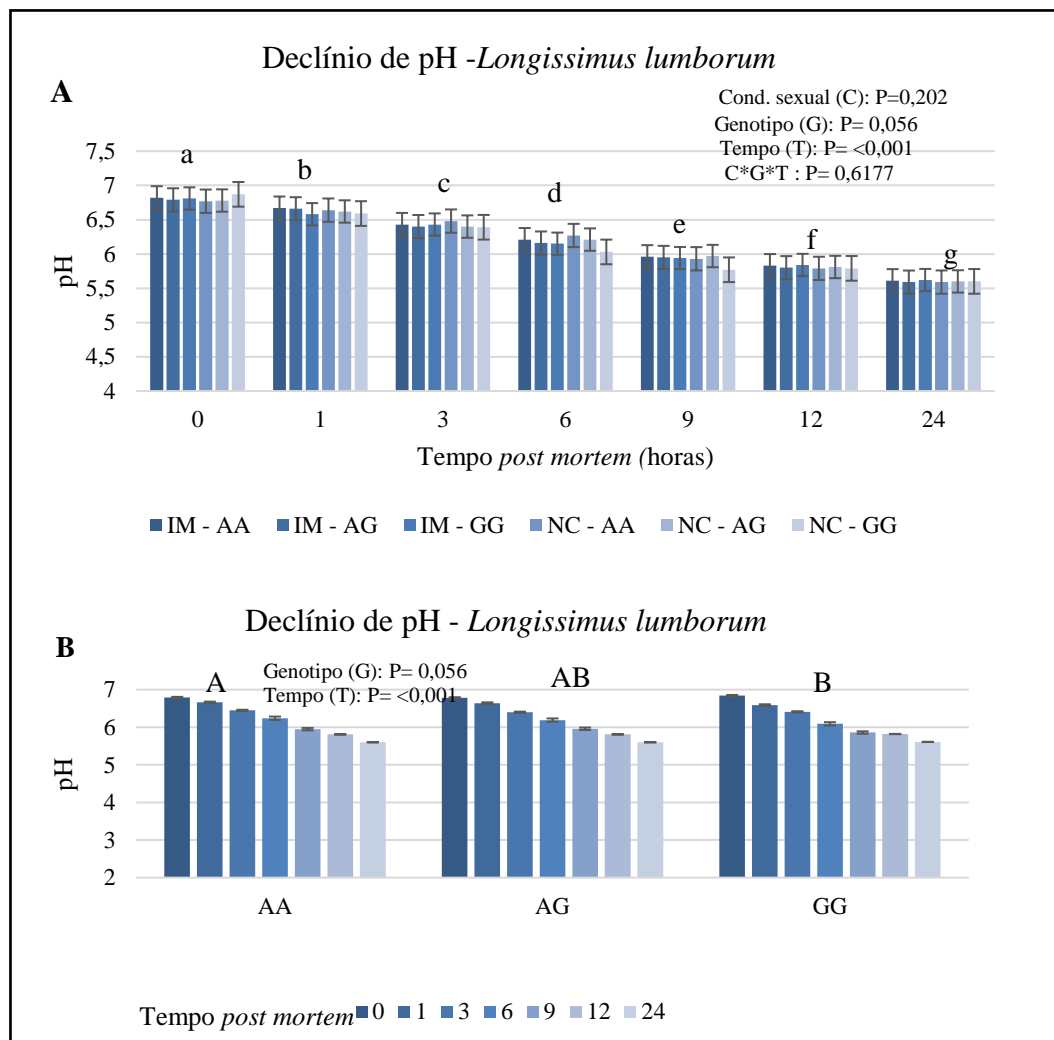


Figura 1- Declínio do pH do músculo *Longissimus lumborum* em carcaças bovinas acondicionadas em câmara fria (4-5 °C) provenientes de animais pertencentes a duas categorias sexuais (IM = imunocastrados e NC = não-castrados) em três genótipos para polimorfismo de nucleotídeo único no gene CAST (AA, AG e GG). A- Valores de pH nos tempos *post mortem*; B- Valores de pH em cada genótipo. ^{a,b} Letras minúsculas, denotam diferenças entre os tempos *post mortem*. ^{A,B} Letras maiúsculas, denotam diferenças para genótipos.

O declínio de temperatura do músculo *Longissimus lumborum* (figura 2) apresentou efeito da interação entre condição sexual, genótipo e tempo *post mortem* ($P < 0,05$). A diferença observada foi entre os tempos *post mortem*, mas não apresentando diferença dentro dos tempos entre as condições sexuais e genótipos.

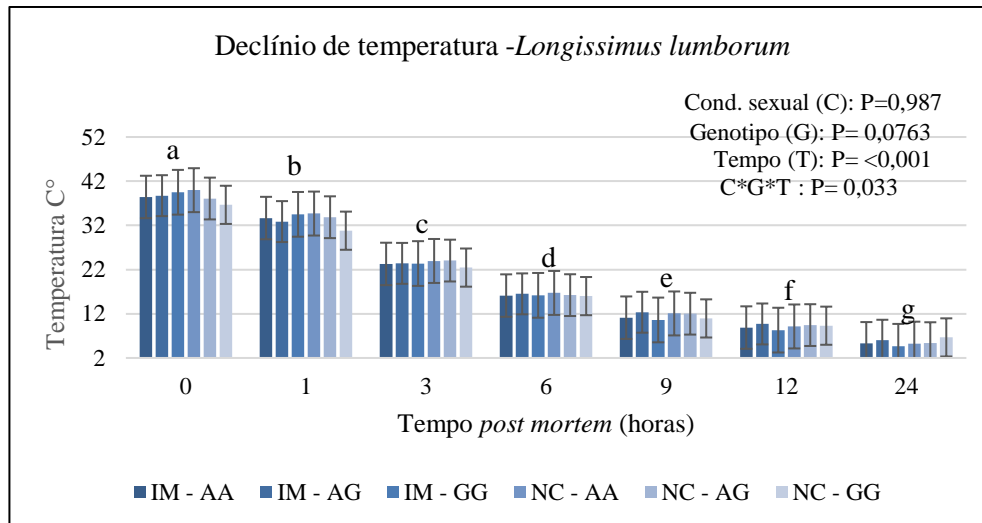


Figura 2- Declínio da temperatura do músculo *Longissimus lumborum* em carcaças bovinas acondicionadas em câmara fria (4-5 °C) provenientes de animais pertencentes a duas categorias sexuais (IM = imunocastrados e NC = não-castrados) em três genótipos para polimorfismo de nucleotídeo único no gene CAST (AA, AG e GG).^{a,b} Letras diferentes, denotam diferenças para interação C*G*T. C= condição sexual; G= genótipo; T= tempo *post mortem* para temperatura.

As concentrações de lactato plasmático (figura 3) não foram influenciadas pela condição sexual e genótipo, bem com a interação entres esses fatores ($P > 0,05$).

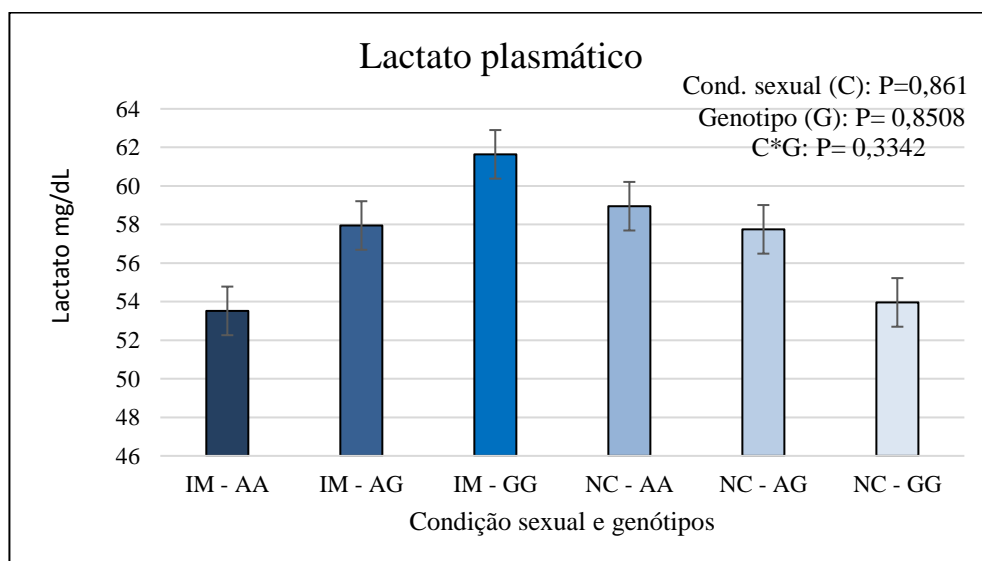


Figura 3- Concentração lactato plasmático (mg/dL) de bovinos Nelore em duas condições sexuais (IM = imunocastrados e NC = não-castrados) em três genótipos para polimorfismo de nucleotídeo único no gene CAST (AA, AG e GG).

3.3.2 Atividade inibitória caseinolítica de calpastatina e força de cisalhamento

A atividade inibitória de calpastatina total não foi influenciada pela condição sexual e genótipo, bem com a interação entres esses fatores ($P > 0,05$, figura 4).

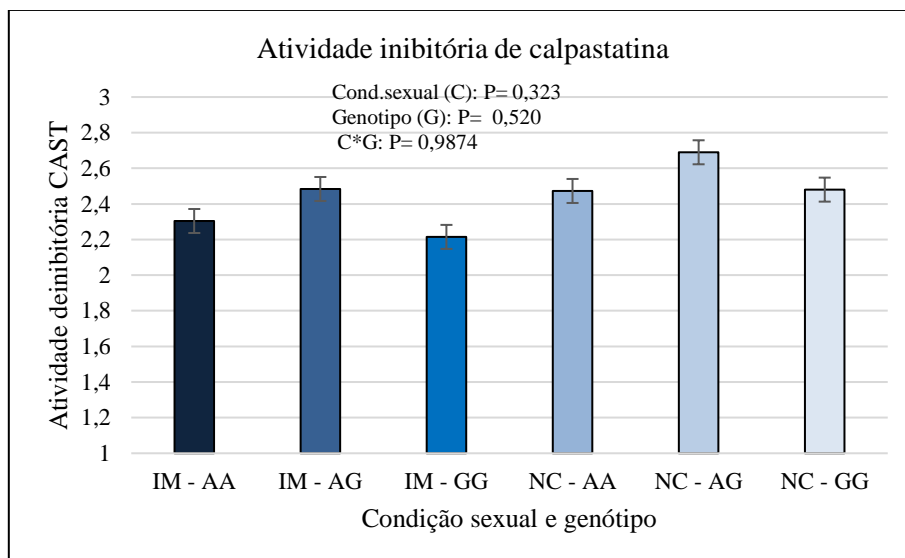


Figura 4- Atividade inibitória de calpastatina do músculo *Longissimus lumborum* 24 horas *post mortem* de bovinos de duas categorias sexuais (IM = imunocastrados e NC = não-castrados) em três genótipos para polimorfismo de nucleotídeo único no gene CAST (AA, AG e GG). Calpastatina total como unidade de atividade por grama de tecido.

A FC apresentou efeito da interação entre condição sexual e genótipo ($P < 0,05$), e como esperado também, houve efeito do tempo *post mortem* (figura 5). Na comparação da FC entre as condições sexuais e genótipo dentro de cada tempo *post mortem*, não houve diferença no início do processo de maturação (figura 5 A) entre os fatores estudados. Aos 7 e 14 dias *post mortem*, os animais IM-GG apresentaram FC significativamente superior a todos os outros fenótipos (figuras 5B e 5C), exceto na comparação com os animais NC-GG aos 7 dias. Aos 28 dias de maturação, a única diferença identificada foi entre IM- AA e IM -GG (figura 5D).

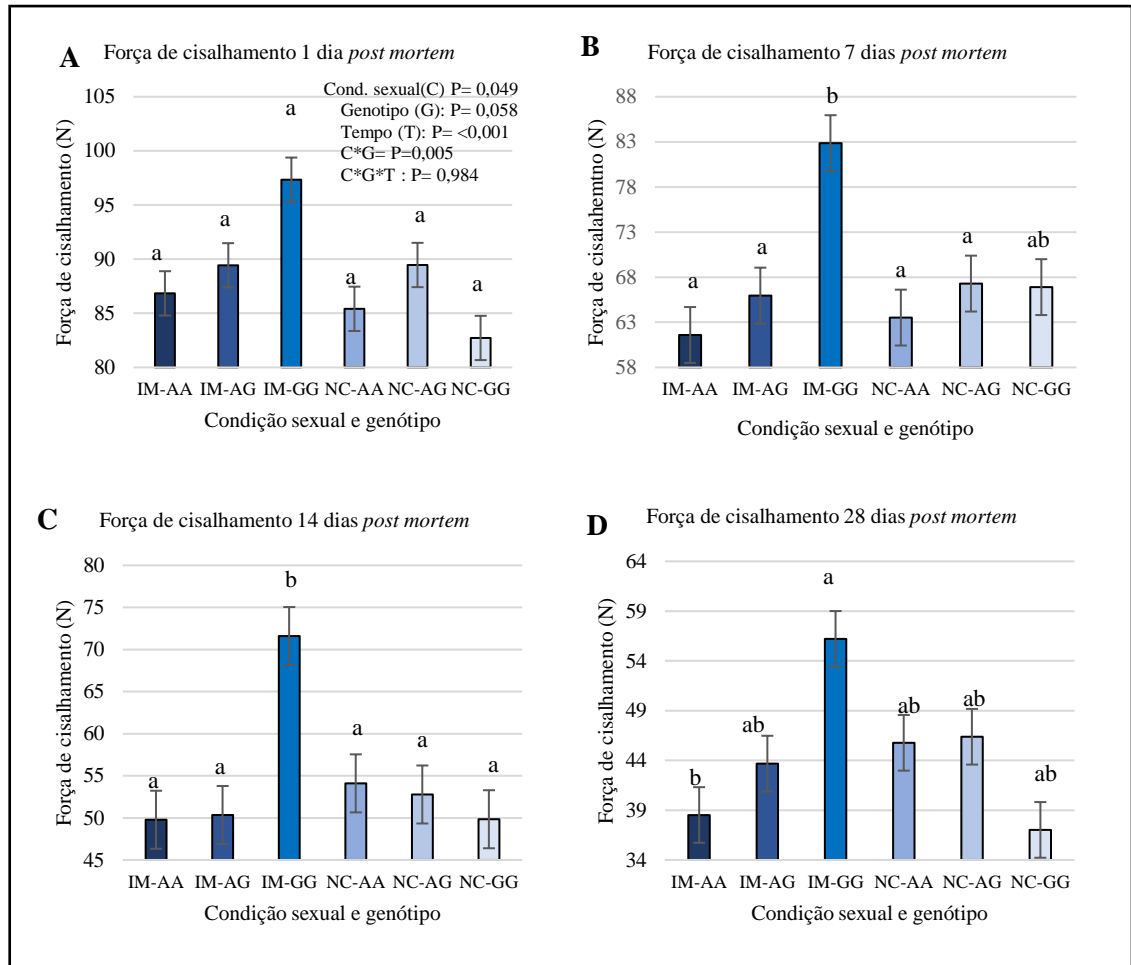


Figura 5-Comparação da força de cisalhamento do músculo *Longissimus lumborum* nos tempos *post mortem* em bovinos de duas categorias sexuais (IM = imunocastrados e NC = não-castrados) em três genótipos para polimorfismo de nucleotídeo único no gene CAST (AA, AG e GG). A- FC 1 dia *post mortem*; B- FC 7 dias *post mortem*; C- 14 dias *post mortem*; D- 28 dias *post mortem*. *a,b= letras diferentes, denotam diferenças em cada tempo *post mortem*.

A comparação da FC dentro de cada condição sexual e genótipo nos tempos *post mortem* estão apresentados na figura 6. Os valores de FC dos animais IM-AA (figura 6A) apresentaram diferenças para todos os tempos de maturação. Os IM-AG (figura 6B) apresentam o mesmo comportamento dos IM-AA, porém, não houve diferença entre os dois tempos finais, 14 e 28 dias. Para os animais IM-GG (figura 6C) não houve alterações entre tempos inicial e intermediários de maturação, com diferença significativa na FC identificada apenas na comparação entre o 1º e 28º dia *post mortem*.

A FC para os animais NC nos genótipos AA e AG não apresentaram diferenças da maciez após 14 dias de maturação (figuras 6D e 6E). Os animais NC-GG também não apresentaram alterações entre os tempos *post mortem* consecutivos na fase intermediária de maturação (figura 6F).

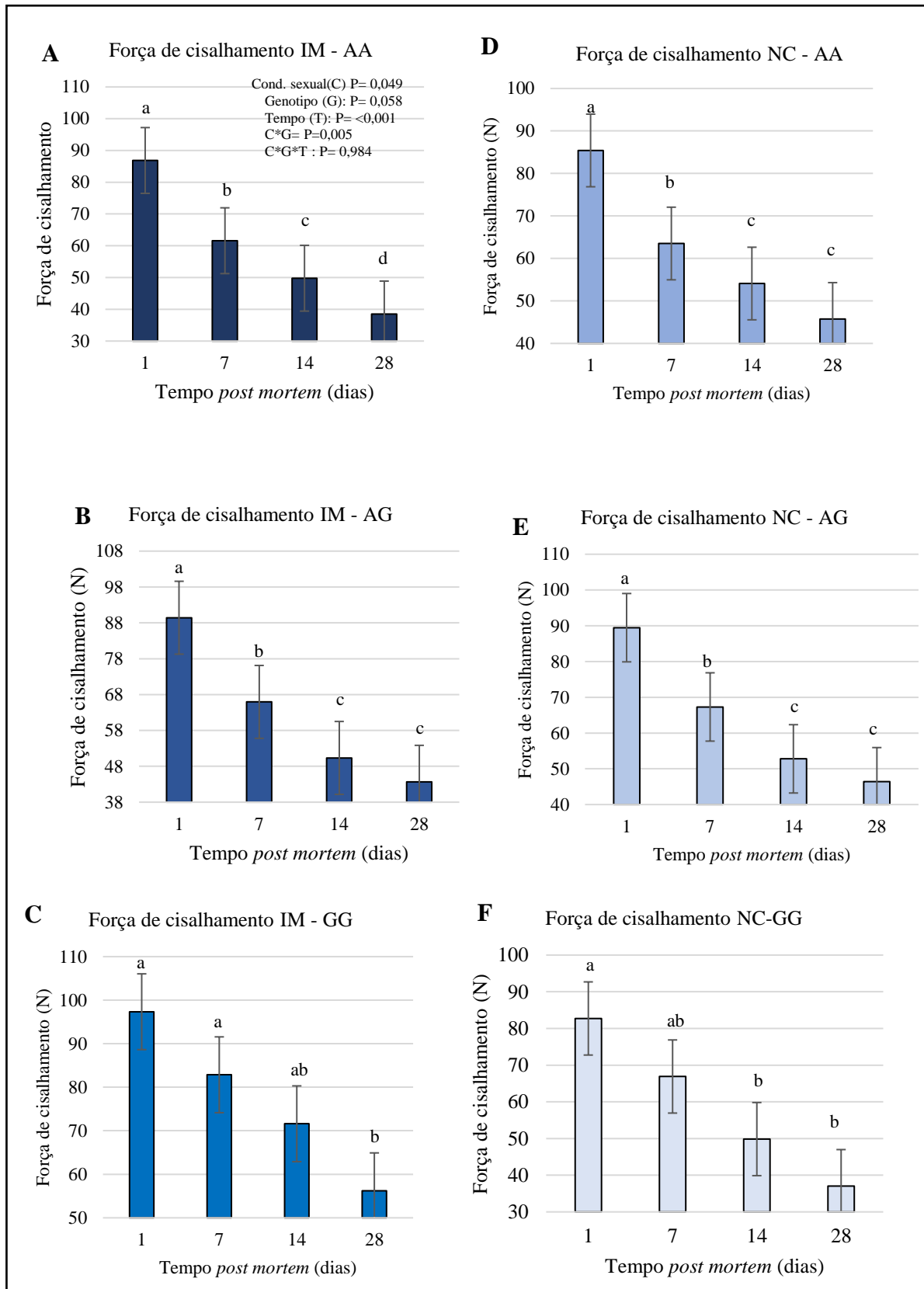


Figura 6- Força de cisalhamento do músculo *Longissimus lumborum* dentro de cada categorias sexuais (IM = imunocastrados e NC = não-castrados) em três genótipos para polimorfismo de nucleotídeo único no gene CAST (AA, AG e GG) nos tempos *post mortem*. A= FC dos animais IM-AA; B= FC dos animais IM-AG; C= FC dos animais IM-GG; D= FC dos animais NC -AA; E= FC dos animais NC-AG; F= FC dos animais NC-GG. ^{a,b}= letras diferentes, denotam diferenças entre os tempos *post mortem*.

3.3.3 Valores de perdas por cozimento e cor

As PPC (figura 7) não apresentaram efeito para condição sexual e genótipo e nem para interação entres esses dois fatores ($P > 0,05$). Houve efeito do tempo *post mortem* ($P < 0,05$), as PPC 1 dia *post mortem* foi diferente dos demais tempos. As médias aos 7, 14 e 28 dias de maturação não apresentaram diferença.

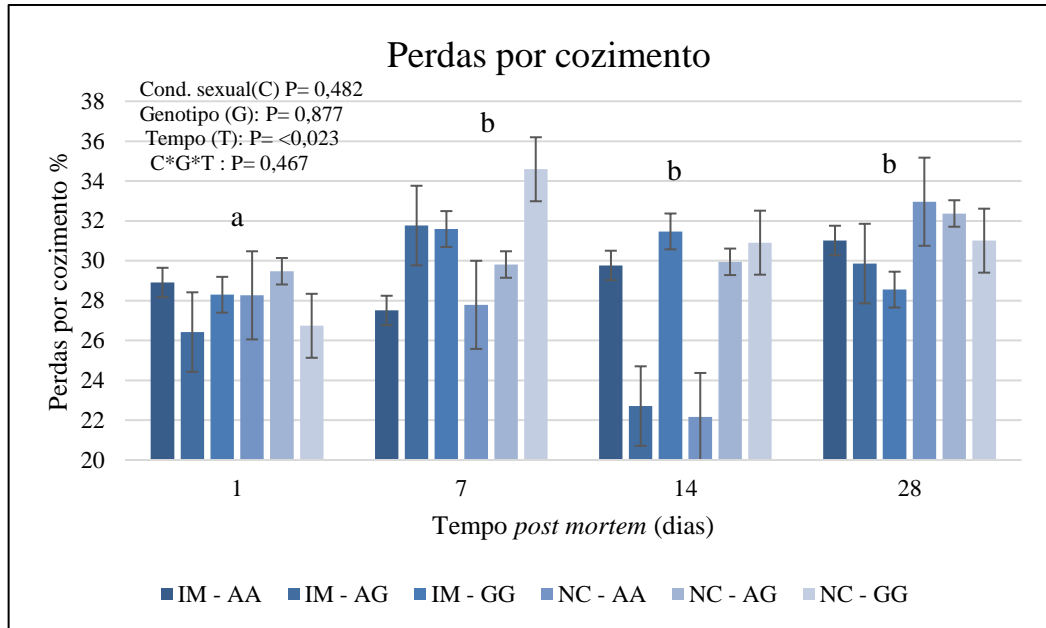


Figura 7-Perdas por cozimento do músculo *Longissimus lumborum* de bovinos Nelore em duas condições sexuais (IM = imunocastrados e NC = não-castrados) em três genótipos para polimorfismo de nucleotídeo único no gene CAST (AA, AG e GG). ^{a,b}= letras diferentes, denotam diferenças entre os tempos *post mortem*.

Não houve efeito da condição sexual e genótipo, bem como a interação entres esses fatores ($P > 0,05$) para os valores de cor (figura 8), apresentando diferença apenas para tempo *post mortem*. Os valores de L^* (figura 7A) para os tempos 1, 7 e 14 dias de maturação apresentaram médias diferentes, os valores de 14 e 28 dias não diferiram. Para os valores de a^* (figura 7B), as médias de 1 e 7 dias *post mortem* foram diferentes, e não houve diferença entre os tempos de 14 e 28 dias. Os valores de b^* (figura 7C) diferiam em todos os tempos de maturação.

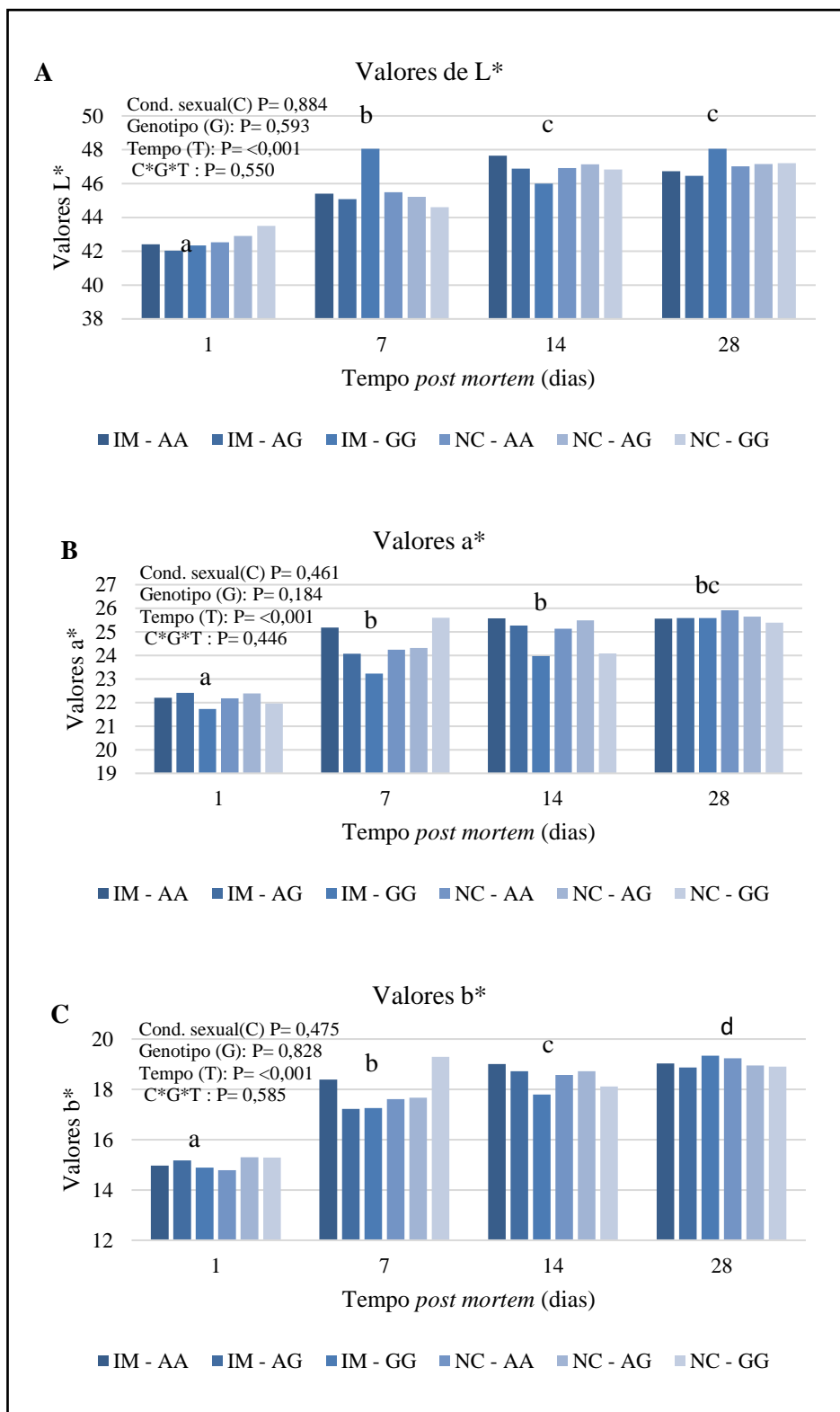


Figura 8- Valores de cor do músculo *Longissimus lumborum* de bovinos Nelore em duas condições sexuais (IM = imunocastrados e NC = não-castrados) em três genótipos para polimorfismo de nucleotídeo único no gene CAST (AA, AG e GG). A= Valores de L*; B= valores de a*; C= valores de b*. *a,b= letras diferentes, denotam diferenças entre os tempos post mortem.

3.4 Discussão

A taxa e extensão do declínio do pH é um dos fatores mais importantes que alteram a qualidade da carne, pois tem influência na maciez da carne, bem como pode alterar a retenção de água e parâmetros da cor. O declínio do pH do músculo *Longissimus lumborum* foi influenciado pelos genótipos e pelo tempo *post mortem* (figura 1A e 1B), na média geral de todos os tempos. O músculo LL de animais GG apresentaram os maiores valores de pH, corroborando uma possível associação entre polimorfismo de nucleotídeo único no gene da CAST e pH no músculo *Longissimus thoracis et lumborum*, relatada em bovinos *Bos taurus* mestiços, em que carcaças com genótipo GG apresentaram pH 48 horas *post mortem* mais elevado em relação aos bovinos do genótipo AA ou AG (Reardon et al., 2010). As diferenças descritas devem ser interpretadas com precaução, uma vez que os valores estão dentro da faixa aceitável e normal (MLA, 2007), que não teria influência em alterações biológicas significativas na estrutura muscular e da carne. Especialmente porque no presente estudo, o pH apresentou uma queda considerada normal para todos os genótipos e condições sexuais, com todos os grupos atingindo o pH às 24 horas *post mortem* na faixa entre 5,3 e 5,8 considerada normal para carne bovina (Muchenje et al., 2009; Thompson, 2002).

A ausência de alterações no pH da carne dos animais em diferentes condições sexuais, NC ou IM, pode ter sido resultado das condições experimentais, com componentes como pequena distância de trânsito dos animais para o abate e condições de menor movimentação e mistura de animais em curral de espera. Reforçando essa hipótese, a concentração de lactato plasmático (figura 3) também não foi influenciada pela condição sexual, embora os valores acima de 36 a 40 mmol/dL demonstram aceleração do metabolismo anaeróbico em resposta ao manejo, observado como valores de referência no manejo de bovinos Nelore (Lima et al., 2018), mas não em nível que pudesse indicar um tônus simpático suficientemente diferenciado como resposta ao evento estressante. O aumento das catecolaminas circulantes por alteração do tônus simpático resulta em taxa de glicogenólise e níveis sanguíneos de lactato aumentados (Bond et al 2004), sendo um indicador da condição de ansiedade do animal durante o pré-abate (Stockman et al., 2012). Possivelmente, o pH muscular mais elevado relatado em bovinos Nelores e cruzado Nelore não castrados em relação a animais castrados (Miguel et al., 2014; Moreira et al., 2018) envolve uma resposta mais exacerbada dos animais não castrados quando submetidos a um estresse pré-abate suficiente para, dentre outros fatores, levar à redução significativa das reservas de glicogênio muscular, resultando em uma baixa queda no pH nos músculos *post mortem* (Ponnampalam, et al., 2017). Além

disso, as diferenças quanto ao pH entre estudos também têm o componente de comparação de diferentes condições sexuais, sendo as diferenças relatadas em comparação entre animais não castrados e animais castrados cirurgicamente.

A taxa de resfriamento do músculo *Longissimus lumborum*, apresentou efeito da interação entre condição sexual, genótipo e tempo *post mortem* (figura 2), a diferença observada foi entre os tempos *post mortem*, mas não havendo diferença dentro dos tempos entre as condições sexuais e genótipos. As diferenças em taxa de resfriamento foram anuladas pelo ponto final para abate baseado em cobertura mínima de 5 mm de gordura subcutânea, impedindo taxas de resfriamento mais rápidas devido a menor cobertura de gordura subcutânea obtida em animais não castrados (Blanco et al., 2020; Cancian et al., 2013), e sua associação com uma redução na queda do pH, com impacto negativo na maciez da carne pelo encurtamento excessivo dos sarcômeros s pelo frio (Huff Lonergan; Zhang; Lonergan, 2010). O declínio da temperatura para os diferentes genótipos para CAST é uma informação importante pela relação da temperatura e pH com o processo de amaciamento e atividade de calpastatina, como serão discutidos a seguir.

No presente estudo, a atividade inibitória caseinolítica de calpastatina total 24 horas *post mortem* obtida pode ser considerada compatível com níveis elevados encontrados em *Bos taurus indicus* comparado a *Bos taurus taurus* (Whipple et al., 1990) ou em Triceps braquial comparado com Longissimus (Oliveira et al., 2019), que caracterizam condições com limitação para o processo proteolítico e/ou de amaciamento durante o processo de maturação, resultando em carne que não pode ser qualificada, com base na força de cisalhamento, como carne macia.

No entanto, não houve associação entre o polimorfismo de nucleotídeo único no gene CAST avaliado e a atividade inibitória caseinolítica de calpastatina total (figura 4). O resultado não corrobora uma possível redução da atividade inibitória da calpastatina associada a uma substituição de G para A, na região não traduzida 3'UTR do RNAm de CAST, embora tal substituição pelo alelo A tenha sido identificado nas carnes mais macias em uma população de bovinos *Bos taurus taurus* (Barendse, 2002), ou mesmo em grupos que envolvem *Bos taurus indicus* (Nastrass, et al., 2014; Raynaud, et al., 2005). O polimorfismo genético relacionado à CAST têm sido alvo de muita pesquisa a fim de melhorar a qualidade da carne bovina, na literatura o SNP CAST já foi descrito como relacionado à maciez de carne (Page et al., 2002).

A atividade inibitória caseinolítica de calpastatina total também não diferiu entre animais não castrados e imunocastrados (figura 4). A elevação da atividade da calpastatina em

diferentes condições sexuais relatadas parecem envolver a comparação entre animais de níveis divergentes de androgênios circulantes, como a observada no músculo *Longissimus* de bovinos *Bos taurus taurus* não castrados ou de bovinos castrados e implantados com androgênios sintéticos (Koohmaraie, 1992), com conseqüentemente reduz a degradação muscular. A maior atividade de calpastatina, pode estar relacionada que testosterona presente em bovinos não castrado, tem uma ação anabólica provocando o aumento a atividade da calpastatina, objetivando diminuir a degradação proteica e favorecendo a deposição muscular (Jiang; Ge, 2014; Wegner et al., 2000). Muito embora a atividade inibitória de calpastatina não tenha diferido para os diferentes fenótipos (condição sexual x polimorfismo no gene da CAST), houve efeito da interação entre condição sexual e genótipo para força de cisalhamento (figura 5). Os animais IM-GG apresentaram força de cisalhamento significativamente superior a todos os outros grupos nos tempos intermediários de maturação 7 e 14 dias (figura 5B e C). Dessa forma, parece existir um atraso no processo de amaciamento do LL desses animais. No grupo IM-GG não foram identificadas diferenças significativas quando comparados os tempos de maturação consecutivos, a partir de 7 dias *post mortem* (figura 6). Além disso, o grupo NC-GG não diferiu do IM-GG aos 7 dias *post mortem*. Os resultados parecem corroborar o impacto negativo do homozigoto G, identificado no SNP/CAST estudado, para a maciez da carne (Casas et al., 2006; Van Eenennaam et al., 2007; Johnston; Allais et al., 2011).

Os animais IM-AA apresentaram resultados melhores que os IM-GG, em termos de taxa e extensão no processo de amaciamento. A vantagem do genótipo AA nesta comparação específica corrobora parcialmente a sua associação positiva com maciez em bovinos de corte Nelore (*Bos taurus indicus*) e Nelore x *Bos taurus taurus* (Curi et al., 2009), embora os autores tenham comparado com animais AG, na mesma condição sexual (não castrados).

Quanto os animais não castrados, a taxa de amaciamento pareceu mais lenta nos momentos intermediários de maturação, especialmente no tocante ao homozigoto para o alelo desfavorável.

Os resultados demonstraram uma interação entre condição sexual e genótipo, com força de cisalhamento mais elevada para IM-GG em relação aos grupos AG e AA nos tempos intermediários de maturação, exceto para o RC-GG aos 7 dias *post mortem*, e uma força de cisalhamento mais elevada do IM-GG em relação ao IM-AA ao final de 28 dias de maturação, bem como a ausência de diferenças para as outras combinações de condição sexual e genótipo. Nesse contexto, a associação desfavorável do alelo G é confirmada, enquanto o impacto da condição sexual parece refutar um possível impacto negativo da não castração em

relação à imunocastração. O impacto de ambos fatores não foi refletido na atividade inibitória caseinolítica de calpastatina, que tem sido relatada como obviamente impactada pelo polimorfismo no gene CAST e de alguma forma alterada pelo nível de testosterona. No tocante ao polimorfismo no gene CAST, uma das explicações baseia-se em observações indicando que alterações na expressão podem ser devidas a uma diferenciação do perfil de variantes de calpastatina, que modifica a dinâmica de inibição das calpaínas (Natrass et al., 2014), com alteração na proteólise *post mortem*, incluindo a própria degradação da calpastatina *post mortem*, com impacto no perfil de fragmentos da calpastatina pós rigor, que pode sua vez pode alterar o processo de amaciamento mesmo sem alterar a medida *in vitro* da atividade inibitória caseinolítica da calpastatina (Souza et al., 2019), especialmente em sistemas biológicos com elevada atividade de calpastatina.

Por outro lado, a possibilidade da redução da expressão da calpastatina como um dos efeitos da castração e por consequência melhorando amaciamento da carne (Zhang et al., 2010) parece parcialmente refutada ao menos pela técnica de imunocastração. Novamente surpreendente é o desempenho negativo quanto ao amaciamento da imunocastração associada com o homozigoto G. Os hormônios esteróides, como testosterona, têm efeitos precoce e rápido no aumento do cálcio intracelular muscular, ativação de proteínas Ca^{2+} -dependentes e cascatas de segundos mensageiros (Wehling, 1997; Estrada et al., 2000). A deprivação de androgênios pode causar um aumento da expressão e atividade de m-calpaína em células tumorais de próstata (Liu, Mendes; Berkman, 2014), efeito semelhante ao provocado pela injeção de testosterona em músculo (Estrada et al., 2003). Ambas situações parecem envolver o sistema das calpaínas na estabilidade dos receptores de androgênios, sendo que a ação da calpastatina favorece a estabilidade dos receptores (Pelley et al., 2006). Portanto, a castração (deprivação de androgênios) pode se beneficiar de um mecanismo de maior ativação das calpaínas, desde que a atividade inibitória de calpastatina não seja muito alta, o que é particularmente improvável para o grupo IM-GG, embora a sua atividade inibitória caseinolítica pós rigor não tenha sido alterada (ver discussão acima). Sob condições de aumento sustentado de Ca^{2+} , a proteólise da calpaína torna-se excessiva e seus alvos sofrem extensa degradação, desde que não promova a formação do complexo calpaína-calpastatina que inibirá a atividade da calpaína (Wang et al., 2021) e assim reduzindo a maciez da carne. Nesse sentido, Walker et al. (2010), mostrou que novilhos, quando comparados às novilhas, tiveram uma tendência a ter níveis mais elevados de mRNA do receptor agonistas β -adrenérgicos no *Longissimus thoracis*. A análise da sequência identificou vários motivos transcripcionais na região promotora do gene CAST bovino (Raynaud et al., 2005), enquanto

experimentos mostraram que eles são regulados diferencialmente em resposta a agonistas β -adrenérgicos (Cong et al., 1998a; Cong et al., 1998b). Dessa forma, Labrie (2011) relatou um aumento nos níveis de receptores de andrógenos em resposta a baixos níveis de andrógenos devido à castração. Pode-se deduzir que a castração também pode resultar em um aumento nos níveis de mRNA do receptor agonistas β -adrenérgicos, que pode levar à transcrição diferencial da calpastatina de maneira tecido-específica (Mberena et al., 2016).

Assim como no presente estudo, Xin et al. (2013) também não encontrou associação entre SNP/CAST e PPC (figura 6) na carne de touros jovens *Bos taurus taurus*. No entanto, Reardon et al. (2010) descobriram que o polimorfismo no gene CAST estava associado ao valor do pH às 48 horas *post mortem*, que eles usaram como medida de capacidade de retenção de água. Além disso, as PPC não foram influenciadas pela condição sexual. Nesse sentido, Miguel et al. (2014) estudando os efeitos de diferentes condições sexuais (não castrado, castrado cirurgicamente e imunocastrado) nos atributos de qualidade da carne em bovinos Nelore, também não encontrou diferença para PPC entre as categorias sexuais, resultados semelhantes do presente estudo.

A condição sexual dos animais e os genótipos não influenciaram os valores de cor (L^* , a^* e b^*), apresentaram diferença apenas para tempo *post mortem* (figura 7). Túlio et al (2013) relataram que o processo de maturação pode afetar a cor da carne porque a estrutura celular sofre proteólise, conseqüentemente diminuindo a capacidade de retenção de água da carne e contribuindo para maior reflexão (Huff-Lonergan; Lonergan, 2005). Em concordância com nossos resultados, Amatayakul-Chantler et al. (2012) também não encontraram diferenças nos valores de L^* e a^* da carne de bovinos cruzados (*Bos taurus indicus* \times *Bos taurus taurus*) não castrados e imunocastrados mantidos a pasto. No presente estudo o gene CAST não teve efeitos sobre os valores de cor, porém, Reardon et al. (2010), encontraram associação entre um marcador no gene CAST (CAST 257) e a cor da carne no 2 dia *post mortem* em bovinos mestiços irlandeses. os autores relatam que os polimorfismos em genes relacionados à atividade da μ -calpaína podem afetar as características de cor da carne, direta ou indiretamente, devido a calpastatina pode influenciar glicólise e a diminuição do pH e, portanto, pode influenciar a cor da carne.

3.5 Conclusão

O alelo A do polimorfismo de nucleotídeo único no gene da CAST mostrou-se favorável em relação a um processo de amaciamento pela redução da força de cisalhamento da carne de bovinos machos Nelores durante a maturação. A imunocastração parece não ser determinante para melhorar a maciez da carne de animais da raça Nelore.

Referências

- Allais S, Journaux L, Levéziel H, Payet-Duprat N, Raynaud P, Hocquette JF, Lepetit J, Rousset S, Denoyelle C, Bernard-Capel C. (2011). Effects of polymorphisms in the calpastatin and Unknown node type: font -calpain genes on meat tenderness in 3 French beef breeds. *J Anim Sci.* 89 :1–11.
- Amatayakul-Chantler, S. et al. (2012). Brown Swiss bulls in a feedlot with the *Bos indicus* aging of meat. *Journal of Food Science*, 67, 635-638.
- Barendse, W. J. 2002. DNA markers for meat tenderness. International patente application PCT/AU02/00122. International patent publication WO 02/064820 A1.
- Behrends, J. M., Goodson, K.J., Koochmarai, M., Shackelford, S.D., Wheeler, T.L., Morgan, W.W., Reagan, J.O., Gwartney, B.L., Wise, J.W., J.W. & Savell, J.W. (2005). Beef customersatisfaction: USDA quality grade and marination effects on consumer evaluations of top round steaks. *Journal of Animal Science*, 83, 662-670.
- Blanco M, Ripoll G, Delavaud C, Casasús I (2020). Performance, carcass and meat quality of young bulls, steers and heifers slaughtered at a common body weight. *Livestock Science*, 240: 104156.
- Bond, JJ, Can LA, Warner RD. (2004). The effect of exercise stress, adrenaline injection and electrical stimulation on changes in quality attributes and proteins in Semimembranosus muscle of lamb. *J Meat Sci* 68, 469-477.
- Cancian, P. H., Gomes, R. D. C., Manicardi, F. R., Ianni, A. C., Bonin, M. D. N., & Leme, P. R. (2014). Correlations of visual scores, carcass traits, feed efficiency and retail product yield in Nellore cattle. *Scientia Agricola*, 71, 17-22.
- Casas, E.; Winte, S. N.; Riley, D. O.; Smith, T. P. L.; Brenneman, R. A. (2006). Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. *Journal of Animal Science*, 83, 3-19.
- Cong, M., Goll, D.E., Antin, P.B., (1998a). cAMP responsiveness of the bovine calpastatin gene promoter. *Biochim. Biophys. Acta* 1443, 186–192.
- Cong, M., Thompson, V.F., Goll, D.E., Antin, P.B., (1998b). The Bovine Calpastatin gene promoter and a new N-terminal region of the protein are targets for cAMPdependent Protein Kinase activity. *J. Biol. Chem.* 273, 660–666.
- Curi RA, Chardulo LAL, Mason M, Arrigoni M, Silveira AC, De Oliveira H. (2009). Effect of single nucleotide polymorphisms of CAPN1 and CAST genes on meat traits in Nellore beef cattle (*Bos indicus*) and in their crosses with *Bos taurus* *Anim Genet.* 40 :456–462
- Estrada, M., Espinosa, A., Müller, M., & Jaimovich, E. (2003). Testosterone stimulates intracellular calcium release and mitogen-activated protein kinases via a G protein-coupled receptor in skeletal muscle cells. *Endocrinology*, 144(8), 3586–3597.

Estrada, M.; Liberona, J.L.; Miranda, M.; Jaimovich, E. (2000). Aldosterone- and testosterone-mediated intracellular calcium response in skeletal muscle cell cultures. *Am J Physiol*, 279:E132–E139

Henchion, M. et al. (2014). Meat consumption: Trends and quality matters. *Meat Science*, 98, 561–568.

Huff-Lonergan, E., Lonergan, S.M. (2005). Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Science*, 71, 194-204.

Huff-Lonergan, E., Zhang, W., & Lonergan, S. M. (2010). Biochemistry of postmortem muscle lessons on mechanisms of meat tenderization. *Meat Science*, 86, 184–195.

Jiang, H.; Ge, X. (2014). Meat science and muscle biology symposium-mechanism of growth hormone stimulation of skeletal muscle growth in cattle. *Journal of Animal Science*, 92: 21–29, 2014.

Joo, S.T., Kim, G.D., Hwang, Y.H., & Ryu, Y.C. (2013). Control of fresh meat quality through manipulation of muscle fiber characteristics. *Meat Science*, 95, 828-836.

Johnston DJ, Graser HU.(2010). Estimated gene frequencies of GeneSTAR markers and their size of effects on meat tenderness, marbling, and feed efficiency in temperate and tropical beef cattle breeds across a range of production systems. *J Anim Sci.*;88:1917.

King, D. A. et al. (2006). Influence of animal temperament and stress responsiveness on the carcass quality and beef tenderness of feedlot cattle. *Meat Science*, 74, 546-556.

Koohmaraie, M. (1992). The role of Ca (2+)-dependent proteases (calpains) in *post mortem* proteolysis and meat tenderness. *Biochimie*, 74, 239–245.

Labrie, F., 2011. Blockade of testicular and adrenal androgens in prostate cancer treatment. *Nat. Rev. Urol.* 8, 73–85.

Liu, T., Mendes, D. E., & Berkman, C. E. (2014). Prolonged androgen deprivation leads to overexpression of calpain 2: implications for prostate cancer progression. *International journal of oncology*, 44(2), 467–472.

Lima M. L. P., Negrão J. A., de Paz C. C. P., Trindade P. H. E., and Grandin T. (2018). Exit speed score and serum lactate can be used as tools to assess improved cattle handling practices. *Livestock Res. Rural Dev.* 30: 8.

Mberena, C.H.H; G. Lietz, I. Kyriazakis, O.A.E. Sparagano (2016). The effects of gender and muscle type on the mRNA levels of the calpain proteolytic system and beef tenderness during post-mortem aging. *Livestock Science*, 123-130.

Miguel G.Z., Faria M.H., Roça R.O., Santos C.T., Suman S.P., Faitarone A.B.G., Delbem N.L.C., Girao L.V.C., Homem J.M., Barbosa E.K., et al. (2014). Immunocastration improves carcass traits and beef color attributes in Nellore and Nellore×Aberdeen Angus crossbred animals finished in feedlot. *Meat Science*, 96, 884–891.

Meat e Livestock Australia -MLA (2007). Meat Standards Australia Annual Outcomes Report 2006-07, Meat and Livestock Australia, Sydney, November.

Moreira AD, Siqueira GR, Lage JF, Benatti JMB, Moretti, MH, Miguel GZ, Oliveira IM, Resende FD (2018). Castration methods in crossbred cattle raised on tropical pasture. *Animal Production Science*, 58:1307–1315.

Morgan, J.B., Wheeler, L. T. L., Koohmaraie, M., Crouset, J. D., & Savell, J.W. (1993). Effect of castration on myofibrillar protein turnover, endogenous proteinase activities, and muscle growth in bovine skeletal muscle. *Journal of Animal Science*, 71, 408-414.

Muchenje, V., Dzama, K., Chimonyo, M., Raats, J.G., & Strydom, P.E. (2009). Meat quality of Nguni, Bonsmara and Aberdeen Angus steers raised on natural pasture in the Eastern Cape. *Meat Science*, 79, 20–28.

Nattrass, G.S. et al. (2014). A post-transcriptional mechanism regulates calpastatin expression in bovine skeletal muscle. *Journal of Animal Science* 92: 443-455.

O'Connor, S. F., Tatum, J.D.; Wulf, D.M. et al. (1997). Genetic effects on beef tenderness in *Bos indicus* composite and *Bos taurus* cattle. *Journal of Animal Science*, 75; 1822-1830.

Oliveira LG, Delgado EF, Steadham EM, Huff-Lonergan E, Lonergan SM.(2019). Association of calpain and calpastatin activity to postmortem myofibrillar protein degradation and sarcoplasmic proteome changes in bovine *Longissimus lumborum* and *Triceps brachii*. *Meat Sci* 2019; 155: 50-60.

Page, J. K., Wulf, D. M., & Schwotzer, T. R. (2002). A survey of beef muscle color and pH. *Journal of animal science*, 79(3), 678–687.

Pelley, R. P., Chinnakannu, K., Murthy, S., Strickland, F. M., Menon, M., Dou, Q. P., Barrack, E. R., & Reddy, G. P. (2006). Calmodulin-androgen receptor (AR) interaction: calcium-dependent, calpain-mediated breakdown of AR in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer research*, 66(24), 11754–11762.

Ponnampalam, E.N.; Hopkins, D.L.; Bruce, H.; Li, D.; Baldi, G.; Bekhit, A.E.D. (2017). Causes and contributing factors to “dark cutting” meat: current trends and future directions; a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 16: 400–430.

Raynaud, P., Jayat-Vignoles, C., Laforêt, M.-P., Levéziel, H., Amarger, V., (2005). Four promoters direct expression of the calpastatin gene. *Arch. Biochem. Biophys.* 437, 69–77.

Reardon, W., Mullen, A. M., Sweeney, T., & Hamill, R. M. (2010). Association of polymorphisms in candidate genes with colour, water-holding capacity, and composition traits in bovine *M. longissimus* and *M. semimembranosus*. *Meat Science*, 86, 270–275.

Souza, G. M., Coutinho, M. A. D. S., Ramos, P. M., de Oliveira, G. M., Lonergan, S. M., & Delgado, E. F. (2019). Tough aged meat presents greater expression of calpastatin, which presents postmortem protein profile and tenderization related to Nellore steer temperament. *Meat science*, 156, 131–138.

Stockman, C.A.; McGilchrist, P.; Collins, T.; Barnes, A.L.; Miller, D.; Wickham, S.L.; Greenwood, P.L.; Café, L.M.; Blache, D.; Wemelsfelder, Fleming, P.A. (2012). Qualitative Behavioural Assessment of Angus steers during pre-slaughter handling and relationship with temperament and physiological responses. *Applied Animal Behavior Science*, 142; 125 – 133.

Thompson, J. M. (2002). Managing meat tenderness. *Meat Science*, 62, 295-308.

Tullio, R. R., Nassu, R. T., Berndt, A., Diesel, T. A., Silva, M. L. P., & Alencar, M. M. (2013). Meat quality from beef cattle of different genetic groups finished on feedlot or pasture. In: *International Congress of Meat Science and Technology, 59th. Izmir. Proceedings...* Izmir: ICOMST, 2013. 1 CD-ROM.

Van Eenennaam A.L., Li J., Thallman R.M., Quaas R.L., Dikeman M.E., Gill C.A., Franke D.E., Thomas M.G. (2007). Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. *J. Anim. Science*, 85:891–900.

Walker, D.K., Titgemeyer, E.C., Baxa, T.J., Chung, K.Y., Johnson, D.E., Laudert, S.B., Johnson, B.J., (2010). Effects of ractopamine and sex on serum metabolites and skeletal muscle gene expression in finishing steers and heifers. *J. Anim. Sci.* 88, 1349–1357.

Wang, K.; Huo, W.; Gu, T.; Bao, Q.; Cao, Z.; Zhang, Y.; Zhang, Y.; Xu, Q.; Chen, G. (2021). Quantitative phosphoproteomic analysis unveil the effect of marketable ages on meat quality in geese. *Food Chem*, 361, 130093

Wegner, J.; Albrecht, E.; Fiedler, I.; Teuscher, F.; Papstein, H. J.; Eder, k. (2000). Growth- and breed-related changes of muscle fiber characteristics in cattle. *Journal of Animal Science*,. 78, 1485–1496, 2000.

Wheeler, T. L.; Davis, J. W.; Cross, H. R.; Lund, D. K.; Smith, S. B. (1990). Mechanism associated with the variation in meat from Brahman and Hereford cattle. *Journal of Animal Science*, 68, 4206-1990

Whipple, G., Koohmaraie, M., & Dikeman, M.E. (1990). Evaluation of attributes that affect longissimus muscle tenderness in *Bos Taurus* and *Bos indicus* cattle. *Journal Animal Science*, 68, 2716-28.

Wehling M. (1997). Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu Rev Physiol* 59:365–393

Wulf, D. M., Tatum, J. D., Green, R. D., Morgan, J. B., Golden, B. L., & Smith, G. C. (1996) Genetic influences on beef longissimus palatability in Charolais- and Limousinsired steers and heifers. *Journal of Animal Science*, 74, 2394-2405.

Zhang, Y.-Y., Zan, L.-S., Wang, H.-B., Xin, Y.-P., Adoligbe, C.M., Ujan, J.A., (2010). Effect of sex on meat quality characteristics of Qinchuan cattle. *Afr. J. Biotechnol.* 9, 4504–4509.

4. POLIMORFISMO NO GENE DA CALPASTATINA EM BOVINOS NELORE ALTERA O AMACIAMENTO DA CARNE EM ANIMAIS COM TEMPERAMENTO- REATIVO

Resumo

O objetivo do estudo foi realizar associação entre SNP/CAST e maciez do músculo *Longissimus lumborum*, em bovinos da raça Nelore com temperamentos divergentes. Foram utilizados 21 machos bovinos da raça Nelore. A determinação do temperamento, ocorreu no primeiro manejo dos animais, no início do período de confinamento, para esta avaliação, foram associados dois testes de reatividade: escore de tronco (ET) e velocidade de fuga (VF). ET: foi determinado logo na entrada do animal no tronco de contenção, utilizando uma escala de quatro pontos. VF: foi determinada de acordo com a velocidade com que o animal deixou o tronco de contenção em uma distância conhecida (5,40 metros). Para a determinação do índice de reatividade (IR) foi calculado pela média dos resultados de escore de tronco e velocidade de fuga, de acordo com a fórmula: $IR = (ET + VF) / 2$. A partir dos resultados de reatividade animal, foram criados dois grupos de reatividade: animais calmos e animais reativos. Os animais foram genotipados para SNP do gene CAST em dois grupos: homozigoto AA e heterozigoto AG. No momento da sangria do animal foi realizada a coleta de sangue para determinação de lactato plasmático. O pH e a temperatura foram mensurados diretamente no músculo *Longissimus lumborum* (LL) nos seguintes tempos: 1, 3, 6, 9 e 24h *post mortem*. O músculo LL foi retirado das meia-carcaças esquerdas dos animais, às 24h *post mortem*, para porcionamento em bifes para a determinação das seguintes variáveis: cor, perdas por cozimento (PPC), força de cisalhamento (FC), índice de fragmentação miofibrilar (MFI) e atividade inibitória de calpastatina. O declínio de pH foi influenciado pelo temperamento animal ($P = 0,020$) e tempo *post mortem* ($P < 0,001$). O declínio da temperatura teve efeito do tempo *post mortem*. Houve efeito de interação entre temperamento e genótipo ($P < 0,106$) para atividade inibitória de calpastatina. A FC apresentou efeito da interação entre temperamento e genótipo ($P = 0,11$). Não foram observadas diferenças entre os fenótipos nos tempos 1 e 7 dias de maturação. Aos 14 dias *post mortem* houve diferença entre calmos-AG e reativos-AG. Quando comparado a FC dos genótipos dentro de cada classificação de temperamento nos tempos *post mortem*, para os calmos-AG houve diferenças nos tempos, 1, 7 e 14 dias. A maior diferença observada na FC dos animais reativos foi entre o 1º e 28 dias *post mortem*. O MFI foi influenciado pelos tempos *post mortem*. Os valores de cor de L* apresentaram efeito para temperamento ($P < 0,03$), genótipo ($P < 0,02$) e tempo *post mortem* ($P < 0,001$). Os valores de a* e b* e PPC apresentando apenas efeito do tempo *post mortem* ($P < 0,001$). Os valores de lactato plasmático não foram influenciados pelo temperamento animal e genótipo. A associação entre temperamento dos bovinos com polimorfismo de nucleotídeo único no gene CAST com heterozigose AG causou impactos negativos no processo de amaciamento em animais reativos que apresentaram amaciamento mais lento

Palavras-chaves: Calpastatina, força de cisalhamento, Temperamento

Abstract

The objective of the study was to establish an association between SNP/CAST and tenderness of the *Longissimus lumborum* muscle in Nelore cattle with different temperaments. Twenty-one Nelore bovine males were used. The determination of temperament occurred in the first handling of the animals, at the beginning of the confinement period. For this evaluation, two reactivity tests were associated: trunk score (ET) and escape velocity (VF). ET: was determined as soon as the animal entered the containment trunk, using

a four-point scale. PV: was determined according to the speed with which the animal left the containment trunk in a known distance (5.40 meters). To determine the reactivity index (RI) it was calculated by averaging the trunk score and escape velocity results, according to the formula: $RI = (ET + VF) / 2$. From the animal reactivity results, two reactivity groups were created: calm animals and reactive animals. The animals were genotyped for SNP of the CAST gene into two groups: homozygous AA and heterozygous AG. When the animal was bled, blood was collected to determine plasma lactate. The pH and temperature were measured directly in the *Longissimus lumborum* (LL) muscle at the following times: 1, 3, 6, 9 and 24h *post mortem*. The LL muscle was removed from the left half-carcasses of the animals, at 24h *post mortem*, for portioning into steaks to determine the following variables: color, cooking losses (PPC), shear force (FC), myofibrillar fragmentation index (MFI) and calpastatin inhibitory activity. The pH decline was influenced by animal temperament ($P=0.020$) and *post mortem* time ($P < 0.001$). The temperature decline had an effect of *post mortem* time. There was an interaction effect between temperament and genotype ($P < 0.106$) for calpastatin inhibitory activity. HR showed an effect of the interaction between temperament and genotype ($P=0.11$). No differences were observed between the phenotypes at 1 and 7 days of aging. At 14 days *post mortem* there was a difference between calm-AG and reactive-AG. When comparing the HR of the genotypes within each temperament classification at *post mortem* times, for the calm-AG there were differences at times, 1, 7 and 14 days. The greatest difference observed in the HR of reactive animals was between the 1st and 28th day *post mortem*. The MFI was influenced by *post mortem* times. L* color values had an effect for temperament ($P < 0.03$), genotype ($P < 0.02$) and *post mortem* time ($P < 0.001$). The values of a* and b* and PPC showing only the effect of *post mortem* time ($P < 0.001$). Plasma lactate values were not influenced by animal temperament and genotype. The association between temperament of cattle with single nucleotide polymorphism in the CAST gene with AG heterozygosity caused negative impacts on the tenderization process in reactive animals that presented slower tenderization

Keywords: Calpastatin, Shear force, Temperament

4.1 Introdução

Analisar a influência dos mecanismos biológicos e qual a sua relação com os parâmetros específicos de qualidade de carne é importante para compreender os processos físicos e bioquímicos que possibilitam a transformação do músculo em carne (Kirinus et al., 2014). Nessa perspectiva, vários estudos caracterizaram os fatores biofísicos e bioquímicos que ocorrem *post mortem* que afetam a maciez da carne bovina, incluindo temperatura, comprimento do sarcômero, proteólise, conteúdo de colágeno, pH, genótipo, temperamento entre outros (D'Alessandro; Zolla, 2013; Koohmaraie, 1996; Maltin et al., 2003). Dentre as características sensoriais, a maciez apresenta a maior variabilidade (Koohmaraie, 1992), sendo mensurada apenas após o abate, no entanto ocupando lugar de destaque para definição das expectativas que influenciam a aquisição da carne e satisfação de consumidores (Behrends et. al., 2005; Koohmaraie, 1992). Além disso, dados sobre análise sensorial do impacto de maciez sobre a percepção e satisfação de consumidores brasileiros apontam para

sua relevância (Delgado et al., 2006).

A maciez final da carne depende das mudanças nas proteínas estruturais do músculo (Kemp et al., 2010, Calkins, Seideman, 1988; Goll et al., 1992). O sistema calpaína é um sistema de proteases endógenas dependentes de cálcio responsável pela proteólise de proteínas miofibrilares nas fibras musculares, resultando em amaciamento (Delgado et al., 2001; Geesink, 2006; Huff-Lonergan, 2014; Koohmaraie, 1992). A expressão diferencial de membros no sistema calpaína regula a maciez da carne, especialmente μ -calpaína e calpastatina, que podem ser consideradas como biomarcadores de maciez (Aaslyng, et al., 2018). A calpastatina é um inibidor endógeno da calpaína que regula a degradação da proteína miofibrilar *in vivo* (Zhang et al., 2018). Além do mais, o gene da calpastatina (CAST) está intimamente relacionado com a maciez da carne bovina (Laura et al., 2019, Goll et al., 2003; Kemp et al., 2010), devido a regulação da degradação da proteína miofibrilar no tecido muscular *post mortem* e a taxa e a extensão de amaciamento da carne *post mortem* (Goll et al., 2003; Kemp et al., 2010).

O temperamento animal pode influenciar a maciez da carne (King et al., 2006). O impacto negativo na maciez da carne de animais reativos, que ocorre devido à alteração no amaciamento *post mortem*, pode ser resultado de uma maior estimulação dos receptores dos agonistas β -adrenérgicos (BAA) pelas catecolaminas (Gruber et al., 2010; Sensky et al., 1996). O efeito negativo na maciez pode ser em decorrência da ativação dos receptores beta-adrenérgicos localizados no sarcolema, desencadeando uma cascata de eventos intracelulares, sendo um deles o aumento das concentrações de AMP cíclico, que por sua vez ativa a proteína quinase, a qual fosforila a calpastatina, aumentando sua atividade inibitória e reduzindo a proteólise (Navegantes, Baviera e Kettelhut, 2009). Nesse sentido, a estimulação simpática pode causar alterações no perfil das variantes da calpastatina, uma vez que sua expressão foi afetada pelo BAA durante a transcrição e pós-traducionalmente, além disso, a calpastatina é fosforilada pelo BAA. A fosforilação tem o potencial de alterar a afinidade da calpastatina pelas diferentes calpaínas, acabando por modificar a proteólise (Cong, et al., 1998). A regulação positiva da atividade inibitória da calpastatina após estresse alimentar foi apontada como possível causa da redução de fragmentação miofibrilar de músculo de ratos acondicionado refrigerado até cinco dias *post mortem* (Leonardo et al., 2008). Dessa forma, animais mais excitáveis estão associados a maior tônus simpático e consequente maior estimulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, sendo essa associação apontada como determinante para a menor maciez (Gruber et al., 2010; Sensky et al., 1996).

A relevância do sistema das calpaínas, especialmente da calpastatina, tem sido

reforçada por estudos em bovinos de corte que avaliaram o efeito de polimorfismos conhecidos, bem como para prospectar novos marcadores em genes candidatos associados a características de interesse econômico. Calpastatina é codificada pelo gene CAST localizado no cromossomo 7 (Bishop et al., 1993). Vários estudos identificaram marcadores de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no gene que codifica a calpastatina (CAST) associados à maciez da carne em bovinos *Bos taurus* e *Bos indicus* (Avilés et al., 2015; Schenkel et al., 2006; White et al., 2005). Nesse sentido, vários estudos relataram que os alelos GG e AG do gene CAST, produziram carne menos macia quando comparados aos animais com o genótipo AA (Casas et al., 2006; Van Eenennaam et al., 2007; Johnston; Graser, 2010; Allais et al., 2011). No Brasil, alguns estudos encontraram associações significativas do marcador de calpastatina com a maciez da carne de bovinos Nelore (Carvalho et al., 2017; Pinto et al., 2010).

Com base nestas informações, a hipótese da presente pesquisa é de que animais mais reativos com SNP do gene CAST desfavorável para maciez da carne bovina apresentarão maior atividade inibitória de calpastatina e menor extensão de amaciamento da carne. Portanto, o objetivo do estudo foi realizar associação entre SNP/CAST e maciez do músculo *Longissimus lumborum*, em bovinos da raça Nelore com temperamentos divergentes.

4.2 Material e Métodos

Animais

Foram utilizados 21 machos bovinos da raça Nelore, sendo: 9 não-castrados (NC), 12 imunocastrados (IM) apresentando dois genótipos para polimorfismo de nucleotídeo único no gene CAST: AA, AG (tabela 1). Os animais possuíam peso médio inicial de 350 ± 30 kg e média de idade de 18 meses, provenientes do rebanho experimental do Campus da USP de Pirassununga. Os animais foram alojados em dois confinamentos experimentais de acordo com o peso inicial (bloco), sendo que um grupo de 9 animais foram distribuídos em baias contendo portões eletrônicos (Calan Gates) que permitem o controle individual da alimentação, enquanto os outros 12, foram alojados em baias individuais. Os animais foram submetidos a um período de adaptação, às instalações e às dietas por 14 dias. Os animais foram alimentados diariamente (*ad libitum*) com uma dieta contendo 85% de concentrado e 25% de volumoso (silagem de milho). O consumo foi registrado individualmente, com base no oferecido e nas sobras.

Imunocastração

Os animais imunocastrados receberam duas doses da vacina de imunocastração (Anti-GnRH; Bopriva®, Pfizer Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil). A primeira dose foi

aplicada, por pessoa capacitada para realizá-la de forma adequada e segura, 30 dias antes do início do confinamento e a segunda no início do confinamento, conforme recomendação do fabricante.

Avaliações do temperamento animal

A avaliação do temperamento animal, ocorreu no primeiro manejo dos animais, no início do período de confinamento, em que, foi realizada a pesagem para registro de peso corporal. Para esta avaliação, foram associados dois testes de reatividade: escore de tronco e velocidade de fuga.

Escore de tronco (ET): É uma avaliação visual e subjetiva. Foi determinado logo na entrada do animal no tronco de contenção, utilizando uma escala de quatro pontos, no qual: 1 = sem movimento, permanência com a cabeça, orelhas e rabo relaxados; 2 = algum movimento, com cabeça erguida e orelhas eretas; 3 = movimentos frequentes, mas não vigorosos, pode haver vocalização; 4 = movimentação constante, vocalização, oferece grande resistência com contínuos golpes (adaptado de Hearnshaw e Morris, 1984)

Velocidade de fuga (VF). A velocidade de fuga foi determinada de acordo a velocidade com que o animal deixou o tronco de contenção em uma distância conhecida (5,40 metros). O tempo foi determinado por um cronômetro acionado por um observador, o cronômetro foi disparado assim que o focinho do animal saiu do tronco e foi pausado assim que a traseira do animal deixou a área pré-determinada. A velocidade de fuga foi analisada em metros por segundo (m/s), adaptado de Burrow, Seifert e Corbet (1988).

Índice de reatividade. Para a determinação do índice de reatividade foi calculado pela média dos resultados de escore de tronco e velocidade de fuga, de acordo com a formula.

$$IR = (ET + VF) / 2$$

Divisão dos grupos: A partir dos resultados de reatividade animal, foram criados dois grupos de reatividade: animais calmos e animais reativos. Dessa forma, após a determinação do valor médio do índice (geral) e desvio padrão, considerando a categoria sexual do animal e sua ascendência genética (touro), foram escolhidos os 21 animais. Os quais representam 2 grupos de temperamento: 1) animais calmos (n =10) com índices $\leq 8,3$; e 2) animais reativos (n =11) com índice $\geq 9,7$ a 17,7.

Extração do DNA

A genotipagem foi realizada através da coleta de pelos com bulbo capilar, que foram retirados da cauda dos animais, durante o primeiro manejo, na entrada do confinamento. Os pelos foram imediatamente acondicionados em um envelope de papel, previamente identificado.

A extração do DNA foi realizada a partir de 5 bulbos capilares (triplicatas) com aproximadamente de 0,5 cm dos pelos em microtubos de 1,5 ml. Após o corte dos bulbos, adicionou-se 50µl de solução de lise (200Mm NaOH). Os microtubos foram incubados a 95°C por 10 minutos, para que ocorra a quebra das membranas celulares e consequentemente a dispersão do DNA celular. As amostras foram submetidas a centrifugação a 13000 RPM por 10 segundos, visando separar o DNA das organelas e proteínas presentes no interior das células que, após a quebra celular, estarão dispersas na solução. Na próxima etapa, adicionou-se 50µl de solução neutralizante (200Mm HCl; 100Mm Tris-HCl ph 8,5), homogeneizando bem, essa solução tem o objetivo de parar a atividade de quebra da primeira solução e neutralizar o pH de toda a reação. Após a realização de todas as etapas de extração as alíquotas foram armazenadas em freezer (-20°C). A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

Análise de PCR

Para a amplificação para a detecção dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) foi realizada pela técnica de PCR convencional, utilizando-se iniciadores (primers). A avaliação dos SNPs foi realizada por digestão com enzimas de restrição que reconhecem sítios específicos no DNA.

O polimorfismo CAST/Dde I envolveu a amplificação de um fragmento de 25 nmoles DNA, 23 bases usando forward 5'CTCACGTGTTCTTCAGTGTTCTG3' e reverse primer 5'CAACCCAAAGAAACATCAAACACAGT3', seguido pela digestão da endonuclease de restrição DdeI, essa reconhece a restrição do sítio 5'C`TNAG 3' (Invitrogen, EUA), localizado no cromossomo 7.

As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 25 µL contendo 3 uL de amostra de DNA, 10 uL de mix de PCR BIO (PCR- Biosystems), 10 uL de água ultrapura e 1 uL de cada iniciador CAST. Posteriormente, as amostras foram para fase de amplificação em termociclador (Bio-Rad), a desnaturação inicial a 95 °C por 3 min, a amplificação foi realizada em 30 ciclos a 95 °C por 30 s 1 min, 58 °C por 1 min (CAST/Dde I) e 72 °C por 1 min, seguido por uma etapa de extensão final a 72 °C por 5 min. Posteriormente os produtos de PCR foram separados e observados por eletroforese em gel de agarose 1,5%.

Foram utilizados 5 uL de produto da PCR para a digestão com endonuclease de restrição Dde I em um volume final de 9 µL contendo 1,2 uL tampão, 0,2 uL de endonuclease de restrição Dde I, 2,6 ul de água ultra pura. A digestão foi realizada em termociclador 37°C por 3 horas. Fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose low melt 3,5 %, utilizando marcador molecular de 50 pb. A eletroforese ocorreu por 40 min a 90v,

após a corrida do gel, estes foram fotografados em fotodocumentador (Bio-rad). A partir da genotipagem foram encontrados dois genótipos, animais homozigotos AA e heterozigotos AG (tabela 1).

Tabela 1- Números de animais por temperamento para cada genótipo.

Variáveis	Genótipo		
	AA	AG	Total
Temperamento			
Calmos	5	5	10
Reativos	4	7	11
Total	9	12	21

Abate

O ponto final de acabamento dos animais para o abate foi determinado pela espessura de gordura subcutânea, determinada por ultrassom na região do *Longissimus lumborum* entre a 12ª e 13ª costelas. Dessa forma, os animais que atingiram a cobertura mínima de 5 mm de espessura de gordura, foram destinados ao abate. Os abates aconteceram no abatedouro experimental do campus USP – Pirassununga, o qual funciona sob inspeção estadual e está localizado a 400 m do confinamento. Os animais foram transportados de caminhão, pela manhã, do confinamento ao abatedouro após jejum alimentar de 12h e com acesso livre à água. Ao todo, foram 6 datas de abate, sendo que foram abatidos os seguintes números de animais: 2, 3, 4, 3, 6 e 3 por data (tabela 2), até completar todos os 6 abates.

Tabela 2- Distribuição dos animais de acordo com temperamento e genótipo em relação as datas de abate.

Temperamento	Calmos		Reativos		Total
	AA	AG	AA	AG	
Abate 1	-	1	-	1	2
Abate 2	1	1	-	1	3
Abate 3	2	1	-	1	4
Abate 4	1	-	1	1	3
Abate 1	-	2	2	2	6
Abate 6	1	-	1	1	3
Total					21

Coleta de amostra

Lactato plasmático

No momento da sangria do animal foi realizada a coleta de sangue com auxílio de copo plástico descartável. Parte do sangue foi então transferido para tubos de coleta de 4 ml, os quais possuía fluoreto de sódio e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Os tubos foram devidamente identificados, homogeneizados e transferidos a uma caixa com gelo. Após o término do abate, realizou-se a centrifugação a 2000 ×g por 20 min, posteriormente o plasma foi transferido para microtubo, os quais foram armazenados em freezer convencional (-20 °C) até o momento das análises.

As amostras do plasma congeladas foram analisadas no Laboratório de Metabolismo Animal do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP, Piracicaba-SP. Foi utilizado kit enzimático comercial para a determinação das concentrações de lactato (Lactato Enzimático–Labtest Diagnóstica S.A), por espectrofotometria de ponto final, utilizando-se filtro de absorvância específico por protocolo em sistema automático para bioquímica (Modelo SBA 200 – CELM).

pH e temperatura

Os valores de pH e temperatura foram mensurados diretamente no músculo *Longissimus lumborum* (LL) utilizando pHmetro portátil Hanna (modelo HI99163). O pH foi determinado nos seguintes tempos: tempos 1, 3, 6, 9 e 24h *post mortem*. Simultaneamente foi realizada a aferição da temperatura com auxílio de termômetro portátil do tipo espeto (multi-thermometer).

Coleta de amostras do músculo Longissimus lumborum

Amostras do músculo *Longissimus lumborum* (LL), foram coletadas aproximadamente 1h *post mortem*, as quais foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Às 24h *post mortem*, o músculo *Longissimus lumborum* foram retirados das meia-carcaças esquerdas dos animais para porcionamento em frações menores destinadas a maturação, sendo que uma pequena porção de cada músculo foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido.

O músculo LL foi porcionado em 4 bifés de 2,5 cm de espessura e outros 4 bifés de 1 cm de espessura, sendo todos destinados a maturação por 1, 7, 14 e 28 dias, Todos os bifés foram embalados à vácuo e maturados em câmara de resfriamento (1 a 4 °C). Após cada tempo de maturação, os bifés de 2,5 cm do músculo LL foram imediatamente utilizados à determinação da força de cisalhamento.

Os bifés de menor espessura, após cada tempo de maturação, foram congelados em nitrogênio líquido. Todas as amostras em nitrogênio líquido foram transferidas para

armazenamento em ultrafreezer (- 80 °C), até o momento das análises. Tais amostras foram utilizadas para determinação de índice de fragmentação miofibrilar.

Análises laboratoriais

Cor

Ao final de cada período de maturação, as amostras foram retiradas das embalagens a vácuo e foram expostas ao oxigênio por 30 minutos. Posteriormente, foi realizada uma avaliação objetiva da cor da carne usando o sistema CIELab (CIE, 1986), com o auxílio de um espectrofotômetro portátil, modelo CM2500d (Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japão) com iluminante padrão D65, ângulo de observação de 10° e abertura do obturador de 30 mm.

Os valores de L* (luminosidade), a* (intensidade do vermelho) e b* (intensidade do amarelo) de cada amostra foram obtidos através da média de três leituras aleatórias.

Perda de peso por cocção (PPC).

Para essa análise foram utilizados bifes 2,5 cm de espessura. As amostras foram pesadas e em seguida assadas em forno elétrico industrial (Modelo F130/L – Fornos Elétricos Flecha de Ouro Ind. e Com. Ltda., São Paulo, Brasil) equipado com um termostato a 170° C. Ao atingir a temperatura interna de 40° C as amostras foram viradas e permaneceram no forno até atingir a temperatura interna de 71°C. Em seguida, as amostras permaneceram em temperatura ambiente até resfriarem, quando foram novamente pesados pós cozimento para determinação das perdas por cocção. A PPC foi determinada pela diferença do peso antes e depois do cozimento.

Força de cisalhamento

O procedimento foi executado de acordo com as recomendações da American Meat Science Association - AMSA (1995). No mesmo dia em que cada tempo de maturação se concluiu, os respectivos bifes daquele tempo foram retirados das embalagens à vácuo e destinados ao cozimento. Cada bife foi posicionado sob uma grelha acoplada a uma bandeja de alumínio, e com um sensor de temperatura espetado em seu centro geométrico. O cozimento foi feito em forno elétrico industrial (Modelo F130/L – Fornos Elétricos Flecha de Ouro Ind. e Com. Ltda., São Paulo, Brasil) equipado com um termostato a 170° C). Quando os bifes atingiram a temperatura interna de 40 °C foram virados e cozidos até a temperatura interna atingir 71 °C. Retirados do forno, foram transferidos para resfriar sob temperatura ambiente, sendo embalados em plástico e colocados em refrigerador.

No dia seguinte, no mínimo seis e no máximo oito cilindros de 1,27 cm de diâmetro foram retirados de cada bife, seguindo o alinhamento das fibras musculares. Os cilindros

foram submetidos a cisalhamento em equipamento do tipo Warner-Bratzler, sendo o valor máximo de força requerido para corte, registrado. A média aritmética da força considerando todos os cilindros foi calculada para representar o respectivo bife, sendo expressa em Newtons (N).

Índice de Fragmentação Miofibrilar (MFI)

A determinação do IMF foi realizada de acordo com os procedimentos descritos por Culler et al. (1978) com as seguintes modificações: 1g de amostra de músculo foi homogeneizada em 10 volumes de tampão IMF. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de biureto descrito por Gornall; Bardawill; David (1949). A concentração de proteínas foi ajustada, para que se tenha a mesma proporção em 5 ml. A suspensão de miofibrila foi diluída e agitada e imediatamente lida no Espectrofotômetro (Unico, modelo 1205) com a absorvância de 540 nm. O índice foi calculado de acordo com Culler et al. (1978). A análise foi realizada nos seguintes tempos: 24h, 7, 14 e 28 dias *post mortem*.

Atividade inibitória caseinolítica de calpastatina

A atividade inibitória caseinolítica de calpastatina total foi realizada pelo método proposto por Koohmaraie et al. (1995), com algumas modificações. Foram utilizadas 8 gramas do músculo *Longissimus lumborum* 24 horas *post mortem*, que foram homogeneizados em 50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8,3. O tampão de extração também continha inibidores proteolíticos: 100 mg/L de ovomucóide, 2 mM PMSF e 6 mg/L de leupeptina. Posteriormente, o homogeneizado foi centrifugado a 24.652 ×g por 180 min. Em seguida, o sobrenadante foi dialisado em tampão de Tris 40 mM, EDTA 5 mM, pH 7,3, durante 18 horas. Após a diálise, o extrato foi aquecido a 95°C por 30 minutos. Posteriormente ao aquecimento as amostras foram resfriadas em gelo e seguiram para centrifugação a 24.652 ×g por 30 min. Posteriormente sobrenadante foi carregado em coluna de 15×120 cm preenchida com DEAE Sephacel. Após o carregamento, as colunas foram lavadas com Tris 40 mM, NaCl 25 mM em pH 7,5. A eluição foi com Tris 40 mM, NaCl 200 mM, em pH 7,5. Após, foi realizado um ensaio de atividade inibitória com auxílio de espectrofotômetro (Shimadzu 1800), o qual baseia-se nas alterações na leitura de absorvância a 278 nm após adição de substrato (caseína) e semi-purificado de m-calpaína (utilizou-se m-calpaína pulmonar purificada por DEAE-Sephacel e fenil sepharose como fonte de m-calpaína). Quando a mudança de 1 unidade de absorvância ocorrer, o resultado será considerado proporcional a 1 unidade de atividade enzimática inibitória.

Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizados (condição sexual) em arranjo fatorial 2x2, sendo dois temperamentos (animais calmos e animais reativos) e dois genótipos (AA e AG). As variáveis: declínio de pH e temperatura cor, força de cisalhamento, índice de fragmentação miofibrilar e perdas por cozimento foram analisadas como medidas repetidas no tempo utilizando-se o procedimento MIXED do pacote estatístico SAS. Conforme modelo: $Y_{ijkl} = \mu + b_i + F1_j + F2_k + (F1F2)_{jk} + W_i + (F1W)_{jl} + (F2W)_{kl} + (F1F2W)_{jkl} + e_{ijkl}$. Onde, Y_{ijk} = variável resposta; μ = média geral; b_i = efeito do bloco; $F1_j$ = efeito do fator 1 (temperamento animal calmos vs. reativos); $F2_k$ = efeito fator 2 (genótipos AA e AG); $F1F2_{jk}$ = efeito da interação F1 x F2; W_i = efeito do tempo *post mortem*; $F1W_{jl}$ = efeito da interação F1x tempo *post mortem*; $F2W_{kl}$ = efeito da interação F2 x *post mortem*; $F1F2W_{jkl}$ = efeito da interação F1 x F2 x tempo *post mortem*; e_{ijkl} = erro residual. Para efeito de comparação de médias, foi utilizado o método dos quadrados mínimos (LSMEANS).

As variáveis de atividade inibitória caseinolítica de calpastina e concentração de lactato plasmático, foram analisadas como variáveis não repetidas, utilizando o seguinte modelo estatístico: $Y_{ijk} = \mu + b_i + F1_j + F2_k + (F1F2)_{jk} + e_{ijk}$. Onde, Y_{ijk} = variável resposta; μ = média geral; b_i = efeito do bloco; $F1_j$ = efeito do fator 1 (temperamento animal calmo vs. reativo); $F2_k$ = efeito fator 2 (genótipos AA e AG); $F1F2_{jk}$ = efeito da interação F1 x F2. Para efeito de comparação de médias, foi utilizado o método dos quadrados mínimos (LSMEANS).

4.3 Resultados

4.3.1 Declínio do pH e temperatura do músculo *Longissimus Lumborum*

Os valores de declínio de pH do *Longissimus lumborum* (figura 1A) foram influenciados pelo temperamento animal ($P= 0,020$), em que, na média geral os animais reativos apresentaram os maiores de valores de pH. Além disso, houve efeito do tempo *post mortem*, no qual, todos os tempos diferiram, com exceção dos horários 9 e 12 horas. Não houve efeito de interação entre os fatores estudados.

Assim como para o declínio de pH, o declínio da temperatura (figura 1B) também apresentou efeito do tempo *post mortem*, onde todos os tempos foram diferentes.

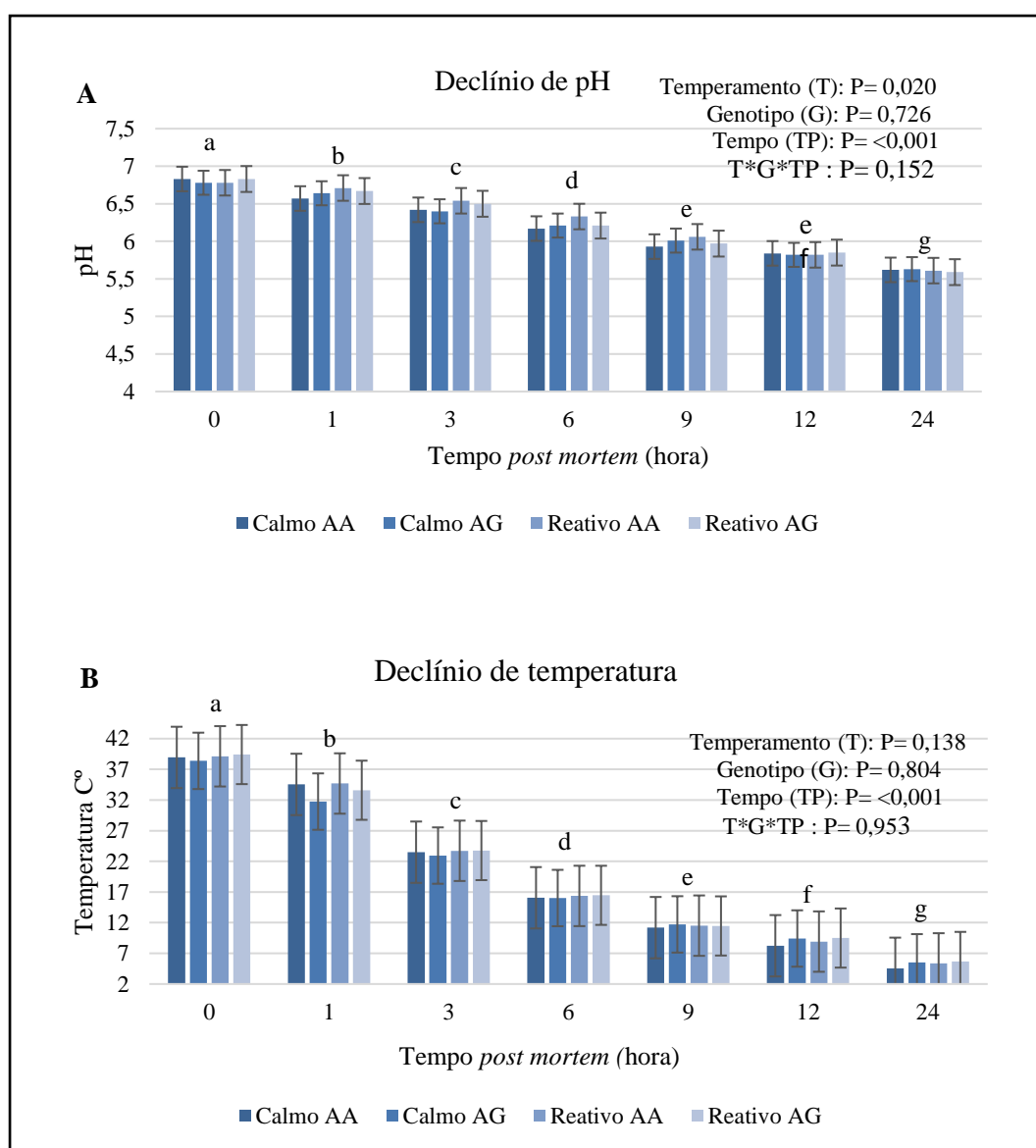


Figura 1. Declínio do pH e temperatura do músculo *Longissimus lumborum* em carcaças bovinas acondicionadas em câmara fria (4-5 °C) provenientes de bovinos classificados de acordo com temperamento (calmos e reativos) em dois genótipos para polimorfismo de nucleotídeo único no gene CAST (AA, AG). A- Declínio de pH; B- Declínio da temperatura. ^{a,b} Letras diferentes, denotam diferenças entre os tempos *post mortem*.

4.3.2 Atividade inibitória caseinolítica de calpastatina, força de cisalhamento e índice de fragmentação miofibrilar

Houve efeito de interação entre temperamento e genótipo ($P < 0,106$) para atividade inibitória de calpastatina total (Figura 2). Observa-se que, os animais reativos AA apresentaram menor atividade inibitória do que os reativos AG e não houve diferença para os animais calmos.

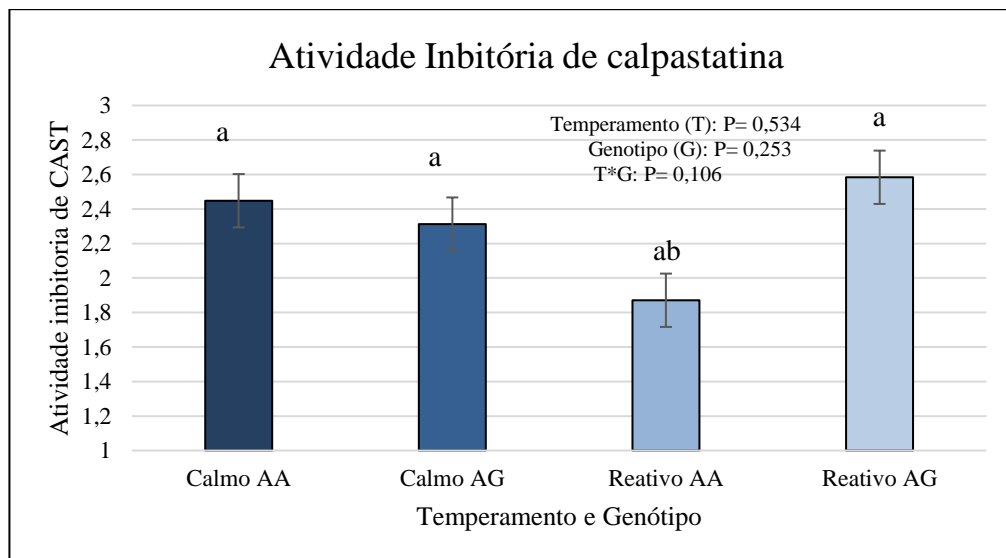


Figura 2- Atividade inibitória caseinolítica de calpastatina do músculo *Longissimus lumborum* 24 horas *post mortem* de bovinos classificados de acordo com temperamento: (calmos e reativos) em dois genótipos para polimorfismo de nucleotídeo único no gene CAST (AA, AG). R*G= efeito da interação entre reatividade e genótipo. *a,b= letras diferentes, denotam diferenças dentro dos grupos. Calpastatina total como unidade de atividade por grama de tecido.

A FC apresentou efeito da interação entre temperamento e genótipo ($P= 0,11$), além disso, como esperado houve efeito do tempo *post mortem* (figura 3). Na comparação da FC entre os temperamentos e genótipo dentro de cada tempo *post mortem*, não foram observadas diferenças entre os fenótipos nos seguintes tempos 1 e 7 dias de maturação (figura 3A e 3B). Aos 14 dias *post mortem* a única diferença observada foi entre os animais calmos-AG e reativos- AG, os demais fenótipos foram iguais (figura 3C). No período final de maturação houve diferença apenas entre os animais calmos-AA e reativos-AG (figura 3D).

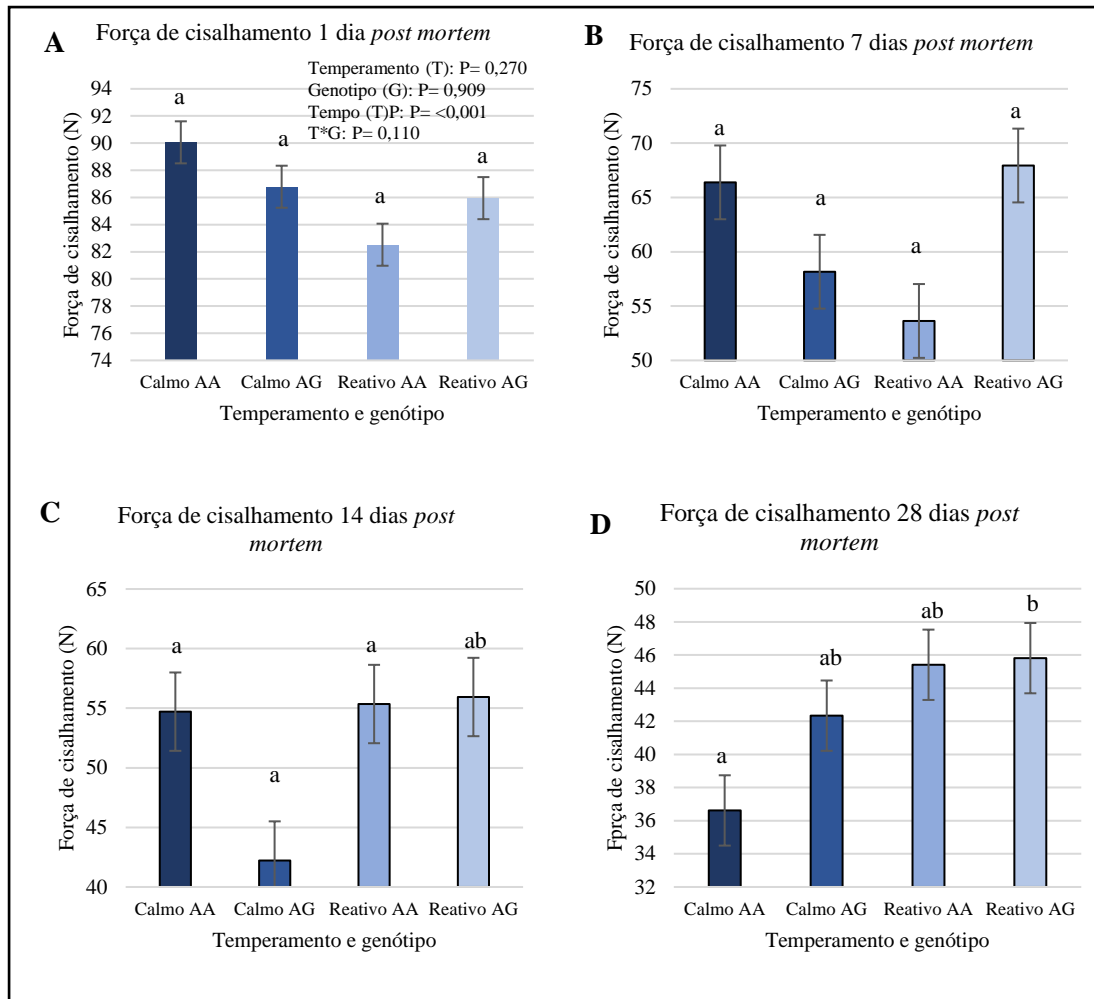


Figura 3. Comparação da força de cisalhamento do músculo *Longissimus lumborum* nos tempos *post mortem* de bovinos classificados de acordo com temperamento (calmos e reativos) em dois genótipos para polimorfismo de nucleotídeo único no gene CAST (AA, AG). A- FC 1 dia *post mortem*; B- FC 7 dias *post mortem*; C- 14 dias *post mortem*; D- 28 dias *post mortem*. *a,b= letras diferentes, denotam diferenças em cada tempo *post mortem*.

Quando comparado a FC dos genótipos dentro de cada classificação de temperamento nos tempos *post mortem*, observa-se que para os animais calmo-AA, não houveram diferenças na FC nos tempos intermediários de maturação (7 e 14 dias), porém, os valores de FC aos 14 dias e 28 dias *post mortem* foram diferentes (figura 4A). Para os calmos-AG as diferenças observadas foram nos tempos iniciais de maturação, 1, 7 e 14 dias, não ocorrendo diferença entre 14 e 28 dias (figura 4B).

A FC dos animais reativos (figuras, 4C e 4D) a maior diferença observada foi apenas entre o 1 e 28 dias *post mortem*. Não apresentando diferenças entre os tempos intermediários e final de maturação.

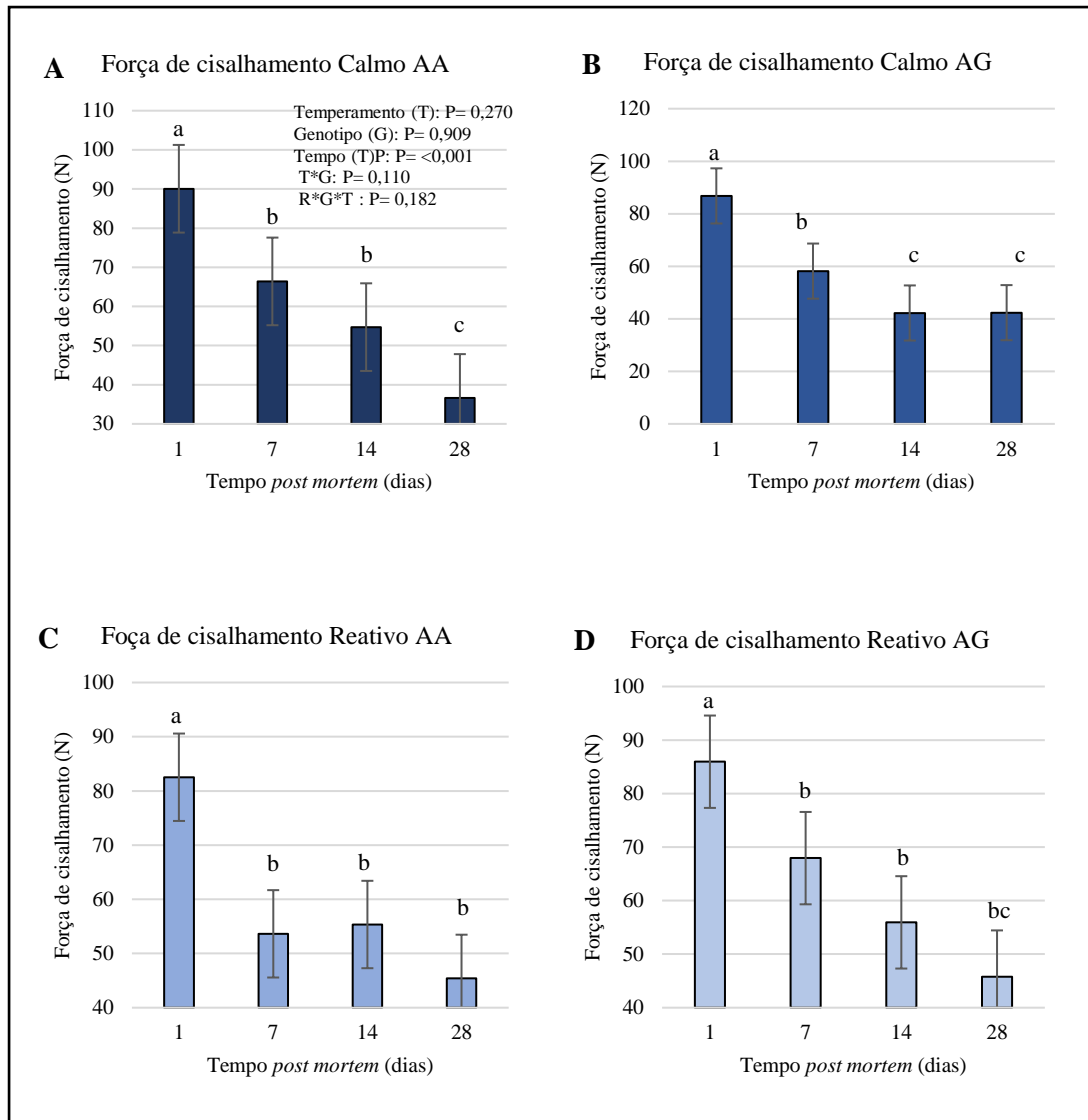


Figura 4. Força de cisalhamento do músculo *Longissimus lumborum* dentro de cada classificação de temperamento (Calmos e reativos), em dois genótipos para polimorfismo de nucleotídeo único no gene CAST (AA, AG) nos tempos *post mortem*. A= FC Calmos-AA; B= FC Calmos-AG; C= Reativos-AA; D= FC Reativos-AG. ^{a,b}= letras diferentes, denotam diferenças entre os *tempos post mortem*.

Os valores MFI (Figura 5), apresentaram efeito apenas para o tempo *post mortem*, com os maiores valores aos 28 dias de maturação, no entanto não houve diferença entre as médias de 7 e 14 dias de maturação.

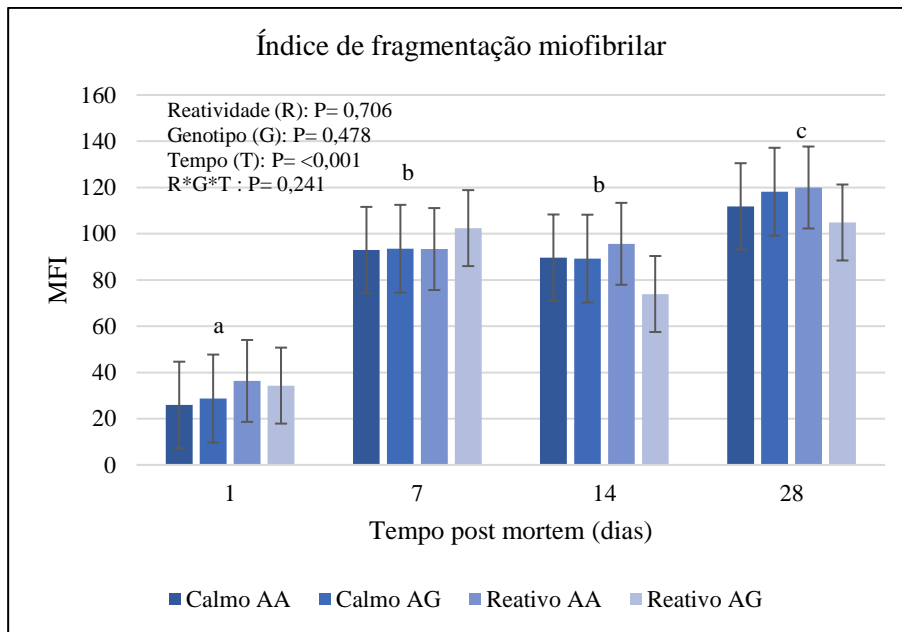


Figura 5. Índice de fragmentação miofibrilar do músculo *Longissimus lumborum* de bovinos classificados de acordo com temperamento (calmos e Reativos) em dois genótipos para polimorfismo de nucleotídeo único no gene CAST (AA, AG). ^{a,b=} letras diferentes, denotam diferenças entre os tempos *post mortem*.

4.3.3 Valores de perdas por cozimento, lactato plasmático e cor

Não houve interação temperamento animal vs. genótipos para as perdas por cozimento (Figura 6). No entanto, as PPC apresentaram efeito do tempo *post mortem* ($P < 0,06$), havendo diferenças entre as 24 horas e 28 dias de maturação, os demais tempos *post mortem* não diferiram.

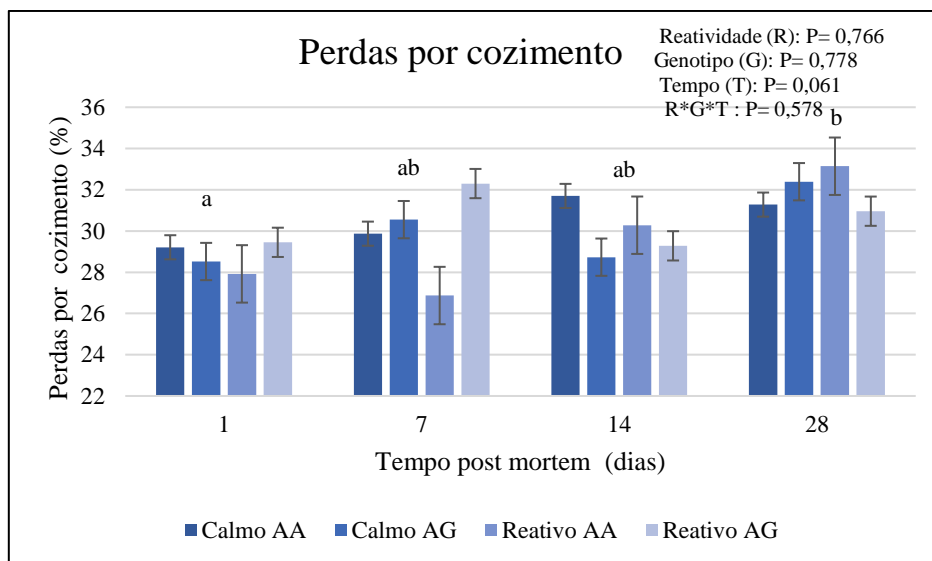


Figura 6. Perdas por cozimento do músculo *Longissimus lumborum* de bovinos classificados de acordo com temperamento (calmos e Reativos) em dois genótipos para polimorfismo de nucleotídeo único no gene CAST (AA, AG). ^{a,b=} letras diferentes, denotam diferenças entre os tempos *post mortem*.

Os valores de lactato plasmático não foram influenciados pelo temperamento animal e genótipo, bem com a interação entre esses fatores ($P > 0,10$, figura 7).

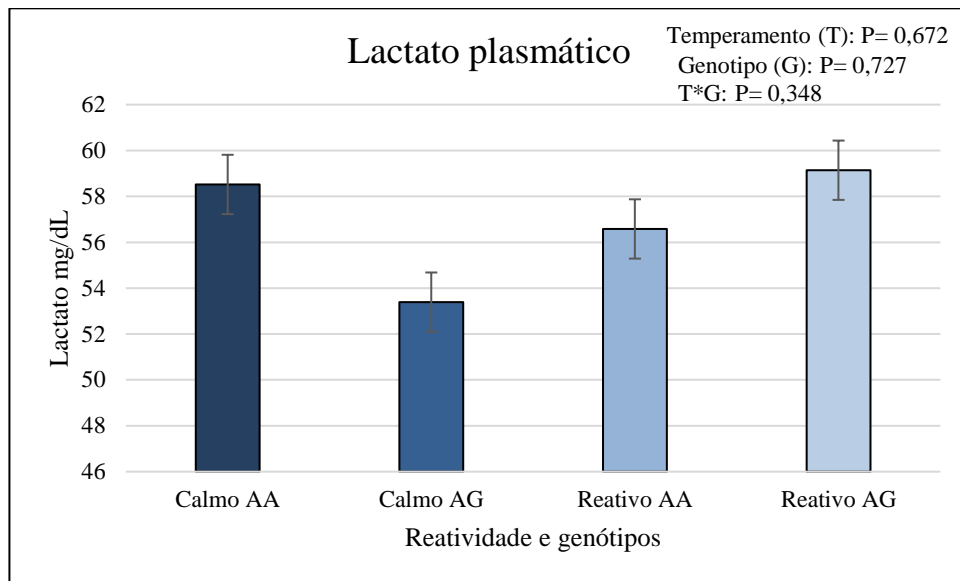


Figura 7. Concentração lactato plasmático (mg/dL) de bovinos Nelore classificados de acordo com o temperamento (calmos e Reativos) em dois genótipos para polimorfismo de nucleotídeo único no gene CAST (AA, AG).

Os valores de cor estão apresentados na figura 8. Os valores de cor de L^* (figura 6 A) apresentaram efeito para temperamento ($P < 0,03$), genótipo ($P < 0,02$) em que, os animais do temperamento calmo e do genótipo AG tiveram os menores valores de L^* . Ademais, essa variável também foi influenciada pelo tempo *post mortem* ($P < 0,001$), em que, todos os tempos diferiram, com exceção dos valores de 14 e 28 dias de maturação que foram iguais.

Resultados semelhantes foram observados para os valores de a^* e b^* , apresentando apenas efeito do tempo *post mortem* ($P < 0,001$, figuras 8B e 8B), não havendo diferenças entre 14 e 28 dias de maturação.

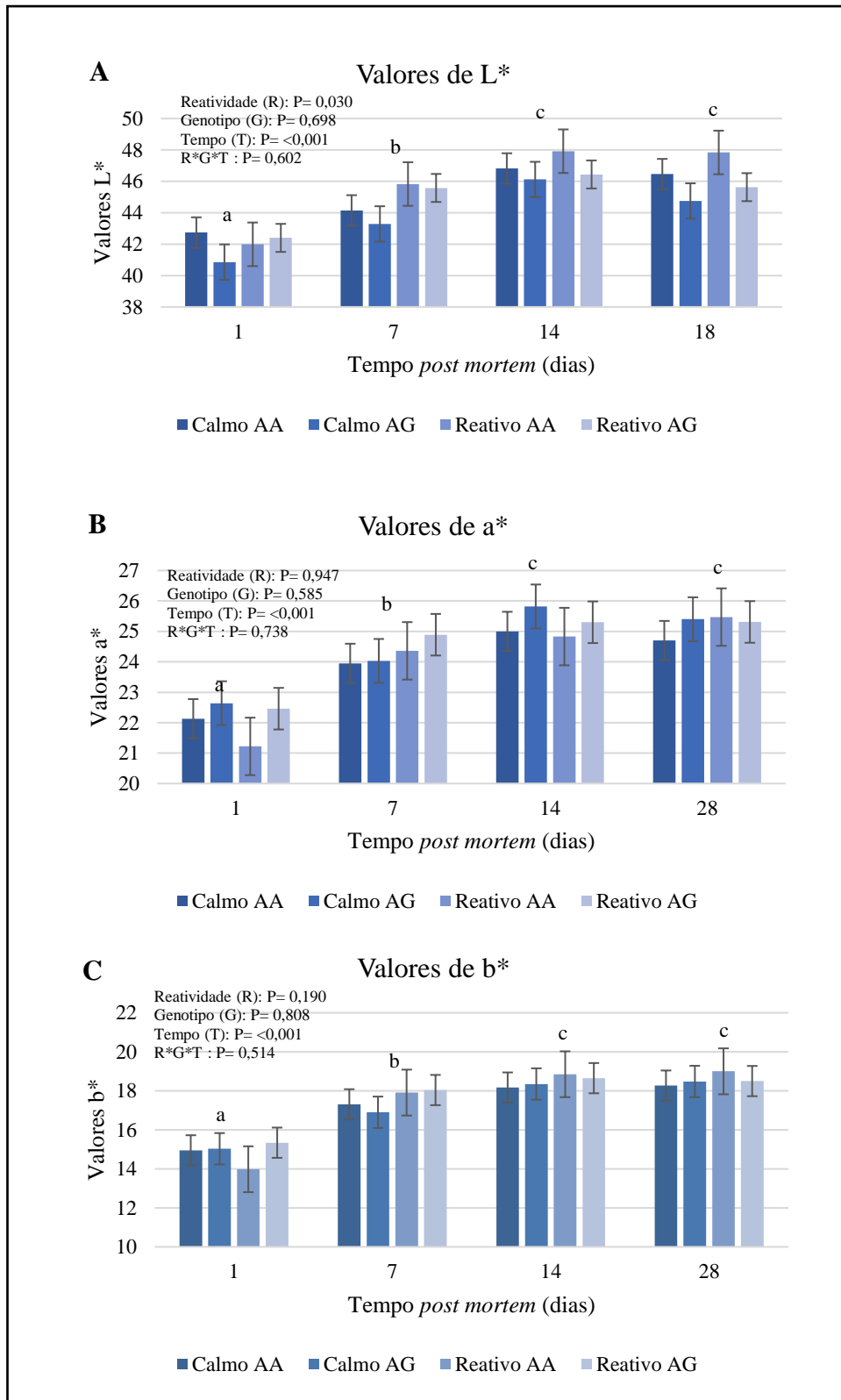


Figura 8. Valores de cor do músculo *Longissimus lumborum* de bovinos classificados de acordo com temperamento (calmos e Reativos) em dois genótipos para polimorfismo de nucleotídeo único no gene CAST (AA, AG). A- Valores de L*; B- valores a*; C- valores de b*. ^{a,b}= letras diferentes, denotam diferenças entre os tempos *post mortem*.

4.4 Discussão

Os valores de declínio de pH do músculo *Longissimus lumborum* (figura 1A) foram influenciados pelo temperamento animal e tempo *post mortem*, com a carne de animais reativos apresentando os maiores valores médios gerais pH em todos os tempos. Os resultados corroboram a observação de bovinos Nelores classificados como mais rápidos e excitáveis resultando em carcaças com maior pH 48 horas *post mortem* no LL (Sant'Anna et al., 2019). Porém, os dois grupos de temperamento (calmos e reativos) apresentaram os valores de pH finais às 24 horas *post mortem* dentro da faixa normal entre 5,3 e 5,8 (Pearson e Young, 1989). Por outro lado, existe relato de ausência de diferenças no pH 48 horas *post mortem* em novilhos mestiços *Bos taurus taurus* classificados como temperamento calmo, intermediário ou excitável (King et al., 2006). A taxa de declínio do pH durante a conversão do músculo em carne reflete a intensidade de metabolismo *post mortem*. Um aspecto fundamental de interferência do pH pré-rigor (até cerca de 9 a 12 horas) diferenciado entre temperamentos seria a possibilidade de estar relacionado com atividade proteolítica da calpaína mais elevada em pHs mais ácidos na fase inicial *post mortem*, especialmente na temperatura observada nos músculos por volta de 1 hora *post mortem* (Hwang e Thompson, 2001), prejudicando o processo de amaciamento nos animais reativos. A diferença no declínio no pH não pode ser associada ao ritmo de declínio da temperatura (figura 1B) do músculo *Longissimus lumborum*, uma vez que não foram observados efeitos significativos do temperamento animal, genótipo ou interação entre os fatores no padrão da queda de temperatura. Como esperado foi influenciada exclusivamente pelo tempo *post mortem*, o que seria algo esperado pelo ponto de abate dos animais ter sido definido pela espessura mínima de gordura subcutânea no músculo *Longissimus thoracis et lumborum*. Essa variável também não apresentou efeito do temperamento em novilhos mestiços *Bos taurus taurus* calmo, intermediário ou excitável (King et al., 2006).

Atividade inibitória caseinolítica de calpastatina total foi influenciada pela interação entre temperamentos e os genótipos, com os animais reativos AA apresentando menor atividade inibitória de calpastatina quando comparado aos reativos AG (figura 2), a diferença de atividade entre esse grupo foi de 0,7 U/g. Esses resultados são parcialmente semelhantes com trabalhos que estudaram diferentes polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no gene CAST que foram associados à maciez da carne, em que o alelo A foi considerado favorável e o alelo G desfavorável a maciez (Allais et al., 2011; Barendse et al., 2002; Casas et al., 2006; Page et al., 2002; Schenkel et al., 2006), sendo que introduz um componente do impacto da reatividade como determinante para a diferença observada, corroborando a possibilidade da

interferência de modificações pós-traducionais sinalizadas pela resposta ao manejo pré-abate sobre um perfil de expressão do gene da calpastatina.

A alteração identificada na atividade de calpastatina entre os diferentes genótipos apenas para os animais reativos, com impacto no processo de amaciamento aferido pela força de cisalhamento durante a maturação. De forma geral, os resultados corroboram a relação entre o temperamento de bovinos Nelores com a atividade inibitória caseinolítica da calpastatina (Coutinho et al., 2017), sendo que dentro dos temperamentos parece existir uma diferença ligada com o nível de expressão de calpastatina e sua degradação *post mortem* (Souza et al., 2019), com desfavorecimento de animais reativos, mesmo que as diferenças não sejam identificadas pela atividade de calpastatina *in vitro*. O resultado aponta que uma maior expressão para animais AG reativos corrobora parcialmente com uma composição de expressão gênica e alteração da atividade dependente da reatividade do animal, com impactos deletérios em taxa e extensão de amaciamento.

Nesse contexto, os animais classificados como reativos não apresentaram diferenças para FC entre os tempos intermediários e final de maturação (7, 14 e 28 dias), com diferença significativa observada apenas entre o 1 e 28 dias *post mortem* (figuras 4C e 4D). Mostrando que temperamento reativo pode causar uma proteólise miofibrilar *post mortem* mais atrasada, principalmente se estiver aliada ao genótipo AG. Os animais classificados como calmos apresentaram a proteólise muscular *post mortem* muito similar entre os genótipos ao longo do tempo de maturação (figura 4A e 4B). Esses resultados estão de acordo com pesquisas anteriores que relataram associação entre temperamento e força de cisalhamento, atribuindo uma carne menos macia ou alteração no amaciamento a bovinos com temperamento reativo (Burrow; Dillon, 1997; Cafe et al., 2011; Fell et al., 1999; Fordyce et al., 1988; King et al., 2006; Gruber et al., 2010; Coutinho et al., 2017; Souza et al., 2019).

Esse efeito negativo na maciez da carne de animais reativos do genótipo AG, pode estar relacionado com uma maior estimulação dos receptores dos agonistas β -adrenérgicos sarcolemas (BAA) pelas catecolaminas (Gruber et al., 2010; Sensky et al., 1996), cuja transdução desencadeia uma cascata de eventos intracelulares que resulta no aumento das concentrações de AMP cíclico, que por sua vez aumenta a atividade da proteína quinase A, a qual fosforila diferentes variantes da calpastatina, cujo perfil é definido pelo genótipo, aumentando sua atividade inibitória e reduzindo proteólise (Navegantes, Baviera e Kettelhut, 2009). Além disso, associação do temperamento reativo com polimorfismo do gene CAST AG, parece causar impactos negativos ainda maiores para o processo de amaciamento, sendo que, os animais reativo-AG não demonstraram alteração significativa da maciez após 7 dias

de maturação. Todavia, o alelo AG, também causou impactos na taxa e extensão de amaciamento dos animais calmos, visto que, estes não apresentaram diferenças para FC depois dos 14 dias *post mortem* (Figura 3B). Já os calmos-AA, apresentaram diferenças na FC em todos tempos de maturação (figura 3A). Esses resultados estão de acordo com o estudo realizado por Casas et al. (2006), onde encontraram efeitos aditivos significativos do alelo G de CAST-2 na força de cisalhamento e no escore de maciez em população mestiça de *Bos taurus* e *Bos indicus*. Curi et al. (2009) estudando o polimorfismo no gene CAST também encontraram resultados que demonstraram a superioridade do genótipo AA em relação à heterozigotos AG na maciez bovinos Nelores (*Bos indicus*) e Nelore x *Bos taurus*. Nesse sentido, Souza et al. (2019) encontrou relação positiva entre a força de cisalhamento da carne e a abundância do mRNA e atividade da calpastatina. Dessa forma, o músculo *Longissimus* de animais com temperamento exacerbado e com maior expressão de calpastatina se manteve duro mesmo após longo período de maturação. Dessa forma, o resultado de maior maciez para o genótipo AA, pode ser resultante da menor atividade da calpastatina, codificada pelo alelo A. A menor atividade de calpastatina está diretamente associada com maior maciez *post mortem* (Goll et al., 1992; Taylor et al., 1995).

O MFI mede a proteólise muscular, resultado da quebra de proteínas que se fragilizam e ao serem homogeneizadas formam pequenos fragmentos miofibrilares. Não foi observada alteração no MFI durante a maturação entre os fenótipos (temperamento x genótipo) (figura 5). Embora tenham ocorrido alterações no processo de amaciamento, verificado pela força de cisalhamento, as diferenças não foram suficientes para a verificação de alterações do MFI, levando-se em conta que o amaciamento de todos os fenótipos não resultou em carne macia. Os resultados corroboram com a ocorrência de 60% da degradação das miofibrilas durante a fase inicial da maturação, nos primeiros dois dias, em bovinos (Koohmaraie et al., 1987).

Em relação aos resultados de cor, os valores de luminosidade L* (figura 8A) foram influenciados pelo temperamento, genótipo e tempo *post mortem*. Os animais do temperamento calmos e genótipo AG apresentaram os menores valores de L*. Resultados divergentes aos relatos que apontaram bovinos com temperamento mais excitável apresentando carnes mais escuras (Voisinet et al., 1997; Cafe et al., 2011), embora relacionados com aumento de pH muscular. Apesar dos animais calmos apresentarem menor valor de L*, não pode ser considerada carne DFD (do inglês “Dark, Firm and Dry”), devido que os dois grupos temperamento apresentaram os valores de pH finais às 24 horas *post mortem* dentro da faixa normal entre 5,3 e 5,8 (figura 1A), um dos fatores que pode influenciar na luminosidade das carnes, e podem gerar carne DFD é o pH final acima de 5,8 (Muchenjea et

al., 2009). Portanto, os resultados do presente estudo indicam que os valores de CIE L, a* e b* corroboram com os dados de classificação de carcaça, pois nenhum dos animais apresentou a condição de corte escuro.

Nossos resultados estão de acordo com King et al. (2006), que nenhuma das amostras de carnes analisadas apresentou características de corte escuro, independente do temperamento animal. Esses resultados, contrasta com o estudo de Voisinet et al. (1997) que descobriram que os animais com temperamentos excitáveis tiveram uma maior ocorrência de corte de carne escura. Resultados semelhantes aos de Fordyce et al. (1988) e Petherick et al. (2002), que encontraram associação entre temperamento e incidência de cortes escuros da carne em seus trabalhos. Ausência de corte escuro nos animais reativos, pode estar relacionado com o fato da pequena distância entre o confinamento e o abatedouro. Nesse sentido, podemos pressupor que não houve diferença nas concentrações de glicogênio muscular entre os animais calmos e reativos, visto os dois temperamentos que apresentaram os valores de pH finais às 24 horas *post mortem* dentro da faixa normal. As concentrações de reservas de glicogênio muscular e o principal determinante do pH final no abate e nas condições anaeróbicas do músculo *post mortem* (Huff-Lonergan et al., 2010 Tarrant, 1989) O transporte tem influência na depleção das reservas de glicogênio do músculo e isso se relaciona com a taxa de declínio do pH e seu valor final na carne, o que influencia na cor e na maciez deste produto (Soria; Corva, 2004; Knowles, 1999). o que poderia ser uma explicação para que não houvesse efeito do temperamento sobre o as concentrações de lactato plasmático (figura 7), como será relatado posteriormente.

Além disso, estudo realizado por Wulf et al. (1996) relataram que carcaças bovinas (*Bos taurus taurus*) com músculo de cor escura apresentaram maior atividade de calpastatina em 24 horas do que carcaças com músculo de cor normal, cenário parcialmente semelhante ao do presente estudo, que os animais calmos dos dois genótipos obtiveram maior atividade inibitória de calpastatina e apresentaram menores valores de L*.

As PPC não foram influenciadas pelo temperamento e genótipo ou a interação entre os dois fatores, apresentou apenas efeito para o tempo *post mortem* (figura 6), com os maiores percentuais de PPC aos 28 dias de maturação. Esses resultados estão de acordo com trabalho que estudou diferentes temperamentos, adequado e excitáveis em bovinos Nelores que a PCC não foi influenciada pelo temperamento (Francisco et al., 2015). Ao contrário dos nossos resultados, a literatura relata associação do temperamento com a perda por cocção (Cafe et al., 2011), atribuindo maior perda aos animais com temperamento reativos.

Como mencionado acima, as concentrações de lactato plasmático (figura 7) não foram influenciadas pelo temperamento animal e genótipo, bem como a interação entre esses fatores. Esperava-se que os animais reativos apresentassem maiores concentrações. Os resultados do presente trabalho foram semelhantes aos encontrados por Francisco et al. (2015) que também não encontrou diferença nas concentrações séricas de lactato quando estudou dois temperamentos (adequado e excitáveis) em bovinos Nelores. Contudo, vários estudos relataram que os bovinos com temperamento reativo tiveram uma maior concentração de lactato sanguíneo quando comparado aos animais calmos (Cafe et al., 2011; Gruber et al., 2010). O aumento de lactato em animais mais reativos é consequência que o estresse tende a causar glicólise excessiva do músculo (Li et al., 2016; Sun et al., 2019). A exposição estímulos estressores causa liberação de catecolaminas, resultando em uma cascata de efeitos, incluindo estimulação da glicogenólise, levando à mobilização dos estoques de glicogênio hepático e muscular, juntamente com concentrações sanguíneas elevadas de glicose e lactato (Knowles; Warriss, 2007). Dessa forma, as variações nas concentrações de lactato plasmáticos, podem ser em decorrência de exposição a exercícios intensos e glicogenólise muscular ligada à contração ou de estresse adrenérgico agudo, onde um aumento na glicólise pode ocorrer em duas a três vezes a taxa de fosforilação oxidativa, portanto, o excesso de piruvato é desviado para lactato (Pang et al., 2007; Bakker et al., 2013).

Portanto, pode-se especular que o manejo adequado dos animais deste estudo provavelmente contribuiu para a redução do estresse animal, inclusive durante o período pré-abate. Devido, às concentrações de lactato serem um bom indicador de esforço físico (Broom, 2003), fadiga durante o transporte (Knowles et al., 1999) e também é indicativo de dano muscular (Braun et al., 1993). Em que, os animais excitáveis mobilizaram mais glicose através da glicogenólise devido ao aumento da demanda de energia em resposta ao estresse no músculo do que os animais menos excitáveis, resultando em elevação do lactato e da glicose sendo transportada para o sangue (Gruber et al., 2010; Coombes et al., 2014).

4.5 Conclusão

A associação entre temperamento dos bovinos com polimorfismo de nucleotídeo único no gene CAST com heterozigose AG causou impactos negativos na atividade inibitória de calpastatina e no processo de amaciamento em animais reativos, que apresentaram amaciamento mais lento.

Referências

- Allais S, Journaux L, Levéziel H, Payet-Duprat N, Raynaud P, Hocquette JF, Lepetit J, Rousset S, Denoyelle C, Bernard-Capel C. (2011). Effects of polymorphisms in the calpastatin and Unknown node type: font -calpain genes on meat tenderness in 3 French beef breeds. *J Anim Sci.* 89 :1–11.
- Aaslyng, M.D.; Jensen, H.; Karlsson, A.H. (2018).The gender background of texture attributes of pork loin. *Meat Science*, 136, 79–84.
- Avilés, C., Peña, F., Polvillob, O., Barahona, M., Campoc, M. M., Sañudo, C., Juárez, M., Horcada, A., Alcalde, M. J. y Molina, A. (2015). Association between functional candidate genes and organoleptic meat traits in intensively fed beef. *Meat Science*,107, 33–38
- Bakker J., Nijsten M.W., Jansen T.C. (2013). Clinical use of lactate monitoring in critically ill patients. *Ann. Intensive Care*, 10: 3:12.
- Barendse, W. J. 2002. DNA markers for meat tenderness. International patente application PCT/AU02/00122. International patent publication WO 02/064820 A1.
- Behrends, J. M., Goodson, K.J., Koohmaraie, M., Shackelford, S.D., Wheeler, T.L., Morgan, W.W., Reagan, J.O., Gwartney, B.L., Wise, J.W., J.W. & Savell, J.W. (2005). Beef customersatisfaction: USDA quality grade and marination effects on consumer evaluations of top round steaks. *Journal of Animal Science*, 83, 662-670.
- Bishop, M. D.; Koohmaraie, M.; Killefer, J.; Kappes, S.(1993). Rapid communication: restriction fragment length polymorphisms in the bovine calpastatin gene. *Journal of Animal Science*, 71, 2277.
- Burrow, H. M.; Dillon, R. D. (1997). Relationships between temperament and growth in a feedlot and commercial carcass traits of *Bos indicus* crossbreds. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 37, 407-411.
- Broom D.M. (2003). Causes of poor welfare in large animals during transport. *Vet. Res. Commun.* 27:515–518.
- Cafe, L. M., D.L. Robinson, D.M. Ferguson, G.H. Geesink, P.L. (2011). Greenwood Temperament and hypothalamic-pituitary-adrenal axis function are related and combine to affect growth, efficiency, carcass, and meat quality traits in Brahman steers. *Domestic Animal Endocrinology*, 40, 230-240
- Calkins, C.R., & Seideman, S.C., (1988). Relationships among calciumdependent protease, cathepsins B and H, meat tenderness and the response of muscle to aging. *Jornal Animal Science*, 66, 1186-1193.
- Carvalho, M.E G. Gasparin, M.D. Poleti, A.F. Rosa, J.C.C. Balieiro, C.A. Labate,L.L. Coutinho. (2014). Heat shock and structural proteins associated with meat tenderness in Nellore beef cattle, a *Bos indicus* breed. *Meat Science*, 96, 1318-1324.
- Casas, E.; Winte, S. N.; Riley, D. O.; Smith, T. P. L.; Brenneman, R. A. (2006). Assessment of single nucleotide poiymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for

association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. *Journal of Animal Science*, 83, 3-19.

Cong, M., Thompson, V.F., Goll, D.E., Antin, P.B., (1998). The Bovine Calpastatin gene promoter and a new N-terminal region of the protein are targets for cAMPdependent Protein Kinase activity. *J. Biol. Chem.* 273, 660–666.

Coombes, S.V.; Gardner, D.W. Pethick, P. Mcgilchrist. (2014). The impact of beef cattle temperament assessed using flight speed on muscle glycogen, muscle lactate and plasma lactate concentrations at slaughter *Meat Sci.*, 98: 815-821.

Coutinho, M.A.S. Ramos, PM; Silva, SL; Martello, LS; Pereira, Delgado. EF. (2017). Divergent temperaments are associated with beef tenderness and the inhibitory activity of calpastatin. *Meat Science* 134: 61-67.

Curi RA, Chardulo LAL, Mason M, Arrigoni M, Silveira AC, De Oliveira H. (2009). Effect of the g. 98535683A > G SNP in the CAST gene on meat traits of Nellore beef cattle (*Bos indicus*) and their crosses with *Bos taurus*. *Anim Genet.* 40 :456–462.

D'Alessandro, A., & Zolla, L. (2013). Meat science: From proteomics to integrated omics towards system biology. *Journal of Proteomics*, 78, 558–577.

Delgado, E. F., Geesink, G. H., Marchello, J. A., Goll, D. E. and Koohmaraie, M. (2001). 'Properties of myofibril-bound calpain activity in longissimus muscle of callipyge and normal sheep', *Journal of Animal Science*, 79, 2097–2107

Delgado, E.F., Aguiar, A.P., Ortega, E.M.M., Spoto, M.H.F., & Castillo, C.J.C. (2006). Brazilian consumers' perception of tenderness of beef steaks classified by shear force and taste. *Scientia Agricola*, 63, 232-239.

Fell L.R. et al. (1999). Associations between temperament, performance and immune function in cattle entering a commercial feedlot. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 39, 795- 802.

Fordyce, G.E.; Dodt, R.M.; Wythes, J.R. (1988). Cattle temperaments in extensive beef herds. *Journal of Animal Science*, Champaign, 93, 5419-5429.

Francisco, C. L., Resende, F. D., Benatti, J. M., Castilhos, A. M., Cooke, R. F., & Jorge, A. M. (2015). Impacts of temperament on Nellore cattle: physiological responses, feedlot performance, and carcass characteristics. *Journal of animal science*, 93(11), 5419–5429.

Geesink, G.H., Kuchay, S., Chishti, A.H., & Koohmaraie, M. (2006). μ -Calpain is essential for postmortem proteolysis of muscle proteins. *Journal of Animal Science*, 84, 2834-2840.

Goll, D. E., V. F. Thompson, H. Li, W. Wei and J. Cong. (2003). The calpain system. *Physiol. Rev.* 83:731-801.

Goll, D.E., Thompson, V. F., & Taylor, R. G. I. (1992). Role of the calpain system in muscle growth. *Biochimie*, 74, 225-237.

Gruber, S.I, J.D. Tatum, T. Engle, E. Chapman, P.L. Belk, K. E., & Smith, G. C. (2010). Relationships of behavioral and physiological symptoms of preslaughter stress to beef Longissimus muscle tenderness Journal of Animal Science, 88, 1148-1159.

Huff-Lonergan, E. (2014). Tenderizing mechanisms: enzymatic. Encyclopedia of Meat Sciences, 3, 438-442.

Huff-Lonergan, E., Zhang, W., & Lonergan, S. M. (2010). Biochemistry of postmortem muscle lessons on mechanisms of meat tenderization. Meat Science, 86, 184–195.

Hwang, I, H.; Thompson, J. M. (2001). The interaction between pH and temperature decline early postmortem on the calpain system and objective tenderness in electrically stimulated beef longissimus dorsi muscle. Meat Science, v.58, 167- 174.

Johnston DJ, Graser HU.(2010). Estimated gene frequencies of GeneSTAR markers and their size of effects on meat tenderness, marbling, and feed efficiency in temperate and tropical beef cattle breeds across a range of production systems. J Anim Sci.;88:1917.

Kemp, C. M., Sensky, P. L., Bardsley, R. G., Buttery, P. J., & Parr, T. (2010). Tenderness An enzymatic view. Meat Science, 84, 248–256.

King, D. A. et al. (2006). Influence of animal temperament and stress responsiveness on the carcass quality and beef tenderness of feedlot cattle. Meat Science, 74, 546-556.

Knowles, T. G. (1999). A review of the road transport of cattle. Veterinary Record, London, v. 144, n. 8, p. 197-201,.

Knowles, T. G.; P. Warriss. (2007). Stress physiology of animals during transport. in Livestock Handling and Transport. T. Grandin, ed. CAB Int., Cambridge, MA, 312–328.

Koohmaraie, M. (1987).The role of endogenous proteases in meat tenderness. In: Reciprocal Meat Conference, 41., 1988, Wyoming. Proceedings... Champaign: AMSA, 1988. p. 89-100.

Koohmaraie, M. (1992). The role of Ca (2+)-dependent proteases (calpains) in *post mortem* proteolysis and meat tenderness. Biochimie, 74, 239–245.

Koohmaraie, M., Doumit, M. E., & Wheeler, T. L. (1996). Meat toughening does not occur when rigor shortening is prevented. Journal of Animal Science, 74, 2935–2942.

Laura, P.; Jorge, H.; Isabel, C.; Malena, S.; Guillermo, R.; Pilar, S.; Daniel, V.; Mireia, B. (2019). Association of two single nucleotide polymorphisms in the calpastatin gene with tenderness under varying lengths of meat ageing in two native spanish cattle breeds. *Livest. Sci.* 2019, 230, 103820

Leonardo, E.F. et al. (2008). Differential growth retardation and myofibrillar fragmentation in rats submitted to feed restriction and realimentation. *Scientia Agricola* 65(2): 122-129.

Li Z., Li X., Wang Z., Shen Q.W., Zhang D. (2016). Antemortem stress regulates protein acetylation and glycolysis in postmortem muscle. *Food Chemistry*, 202:94–98

Maltin, C. et al. (2003). Determinants of meat quality: Tenderness. The Proceedings of the Nutrition Society, 62(2), 337–347.

Muchenje, V., Dzama, K., Chimonyo, M., Raats, J.G., & Strydom, P.E. (2008). Meat quality of Nguni, Bonsmara and Aberdeen Angus steers raised on natural pasture in the Eastern Cape. *Meat Science*, 79, 20–28.

Navegantes, Baviera e Kettelhut, 2009. The inhibitory role of sympathetic nervous system in the Ca²⁺-dependent proteolysis of skeletal muscle. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 42: 21-28.

Page, J. K., Wulf, D. M., & Schwotzer, T. R. (2002). A survey of beef muscle color and pH. *Journal of animal science*, 79(3), 678–687.

Pang D.S., Boysen S. (2007). Lactate in veterinary critical care: Pathophysiology and management. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 43: 270–279.

Pearson AM, Young RB (1989) 'Muscle and meat biochemistry.' (Academic Press Inc.: San Diego, CA, USA)

Petherick, J. C. (2002). Productivity, carcass and meat quality of lot-fed *Bos indicus* cross steers grouped according to temperament. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, East Melbourne, 42, 389-398.

Pinto, L.F.B. J.B.S. Ferraz, F.V. Meirelles, J.P. Eler, F.M. Rezende, M.E. Carvalho, R.C.G. Silva. (2010). Association of SNPs on CAPN1 and CAST genes with tenderness in Nellore cattle *Genetics and Molecular Research*, 9, 1431-1442

Sant'anna, A. C., Valente, T. D. S., Magalhães, A. F. B., Espigolan, R., Ceballos, M. C., de Albuquerque, L. G., & Paranhos da Costa, M. J. R. (2019). Relationships between temperament, meat quality, and carcass traits in Nellore cattle. *Journal of animal science*, 97(12), 4721–4731.

Schenkel, F.S., Miller, S.P., Jiang, Z., Mandell, I.B., Ye, X., Li, H., Wilton., J.W (2006). Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle, *Journal of Animal Science*, 84, 291-299.

Sensky , PL , Parr , T. , Bardsley , RG e Buttery , PJ (1996) . Relação entre a concentração plasmática de epinefrina e a atividade do sistema enzimático calpaína no músculo longissimus suíno . *Journal of Animal Science* 74 : 380-387 .

Soria, L. A.; Corva, P. M. (2004). Factores genéticos y ambientales que determinan la terneza de la carne bovina. *Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal*, 12, 73-88.

Souza, G. M., Coutinho, M. A. D. S., Ramos, P. M., de Oliveira, G. M., Lonergan, S. M., & Delgado, E. F. (2019). Tough aged meat presents greater expression of calpastatin, which presents postmortem protein profile and tenderization related to Nellore steer temperament. *Meat science*, 156, 131–138.

Sun X.B., Huang J.C., Li T.T., Ang Y., Xu X.L., Huang M. (2019). Effects of preslaughter shackling on postmortem glycolysis, meat quality, changes of water distribution, and protein structures of broiler breast meat. *Poultry Science*, 98:4212–4220.

Tarrant, P.V.; Fabiansson, W.R. Shorthose, R.D. Warner, S.U. (1989). Animal behaviour and environment in the dark-cutting condition Dark cutting in sheep and cattle, Australian Meat and Livestock Research and Development Corporation, Sydney (1989), pp. 8-18.

Taylor, R.G.; Geesink, G.H.; & Thompson, V.F. (1995). Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization? *Journal of Animal Science*, 73, 1351.

Van Eenennaam A.L., Li J., Thallman R.M., Quaas R.L., Dikeman M.E., Gill C.A., Franke D.E., Thomas M.G. (2007). Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. *J. Anim. Science*, 85:891–900.

Voisinet, B. D., T. Grandin, J. D. Tatum, S. F. O'Connor, and J. J. Struthers. (1997). Feedlot cattle with calm temperaments have higher average daily gains than cattle with excitable temperaments. *J. Anim. Sci.* 75:892–896.

White, S.N., Casas, E., Wheeler, T.L., Shackelford, S.D., Koohmaraie, M., Riley, D.G., Chase Jr, C.C., Johnson, D. D., Keele, J.W., T.P.L. Smith, T.P.L. (2005). A new single nucleotide polymorphism in CAPN1 extends the current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent. *Journal of Animal Science*, 83, 2001-2008.

Wulf, D. M., O'Connor, S. F., Tatum, J. D., & Smith, G. C. (1997). Using objective measures of muscle color to predict beef longissimus tenderness. *Journal of animal science*, 75(3), 684–692.

Zhang, H.; Pan, J.; Wu, Z.(2018). Investigation of the effects of high pressure processing on the process of rigor in pork. *Meat Science*. 145, 455–460.