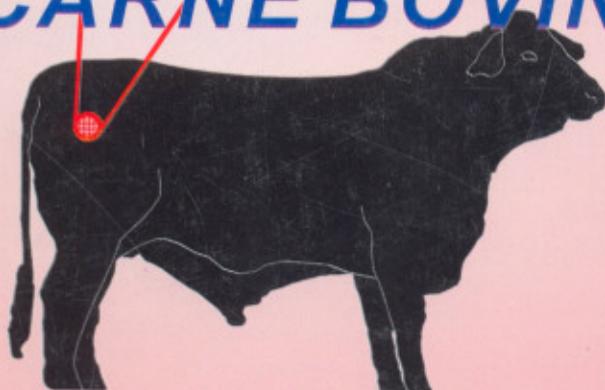




**Ministério  
da Agricultura  
e do Abastecimento**



# **MACIEZ E ATIVIDADE DE CALPASTATINA EM CARNE BOVINA**



**REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL**

Presidente  
**Fernando Henrique Cardoso**

**MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO**

Ministro  
**Marcus Vinicius Pratini de Moraes**

**EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA**

Diretor-Presidente  
**Alberto Duque Portugal**

Diretores-Executivos  
**Dante Daniel Giacomelli Scolari**  
**Elza Angela Battaglia Brito da Cunha**  
**José Roberto Rodrigues Peres**

**EMBRAPA PECUÁRIA SUL**

Chefe-Geral  
**Eduardo Salomoni**

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento  
**Roberto Silveira Collares**

Chefe Adjunto de Administração  
**Laudo Orestes Antunes Del Duca**

# **MACIEZ E ATIVIDADE DE CALPASTATINA EM CARNE BOVINA**



---

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro de Pesquisa de Pecuária dos Campos Sulbrasilieiros  
Ministério da Agricultura e do Abastecimento*

Exemplares desta publicação devem ser solicitados à:

**Embrapa Pecuária Sul**

Área de Comunicação Empresarial e Negócios Tecnológicos

BR 153 - km 595 - Vila Industrial

Caixa Postal 242

CEP 96400-970 - Bagé, RS

Fone/Fax: (0XX53) 242-8499

Tiragem: 300 exemplares

**Comitê de Publicações**

Coordenador: Roberto Silveira Collares

Membros: Carlos Otávio Costa Moraes

Francisco de Paula Jardim Alves-Branco

Joal José Brazzale Leal

João Carlos Pinto Oliveira

José Otávio Neto Gonçalves

Odoni Loris Pereira de Oliveira

Vicente Celestino Pires da Silveira

---

Rübensan, J.M.

Maciez e atividade de calpastatina em carne bovina - Revisão / Jane Maria

Rübensan, Eliane Mattos Monteiro. - Bagé, Embrapa. CPPSul, 2000.

54p. (Embrapa CPPSul, Documentos, 28)

1. Maciez da carne. 2. Textura da carne. 3. Calpastatina bovina.

I. Título. II. Série.

CDD 664.9

---

© Embrapa Pecuária Sul

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	05
MACIEZ DA CARNE BOVINA .....	07
<i>Sistema enzimático calpaínas/calpastatina</i> .....	14
<i>Maciez da carne de bovinos <u>Bos indicus</u></i> .....	28
<i>Atividade de calpastatina como indicador de maciez de carne bovina</i> .....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	42

# MACIEZ E ATIVIDADE DE CALPASTATINA EM CARNE BOVINA

## - Revisão -

Jane Maria Rübensam<sup>1</sup>  
Eliane Mattos Monteiro<sup>2</sup>

### INTRODUÇÃO

A década de 90 representa um marco na pecuária brasileira devido às mudanças significativas que estão ocorrendo na cadeia produtiva do gado de corte culminando com novas formas de comercialização que visam, principalmente, atender a preferência do consumidor por carne bovina de qualidade uniforme, que satisfaça sempre seu paladar.

As características de qualidade da carne bovina que influenciam, em ordem de preferência, na decisão de compra do consumidor brasileiro são a cor, maciez, sabor, suculência (FELÍCIO, 1995).

Em todo o mundo, a qualidade da carne bovina caracteriza-se por ser extremamente inconsistente sendo a maciez a característica que apresenta a maior variabilidade.

---

<sup>1</sup>Méd. Vet. Dr., Prof. da Faculdade de Veterinária, UFRGS, RS - jane@orion.ufrgs.br

<sup>2</sup>Méd. Vet. Dr., Pesquisador da Embrapa Pecuária Sul, Caixa Postal 242, CEP 96400-970 - Bagé, RS - eliane@cppsul.embrapa.br

No Brasil, a questão da variabilidade da maciez da carne bovina talvez seja mais importante. De um rebanho de 140.000.000 de cabeças, 80% é constituído de bovinos com genótipo *Bos indicus*, que acarreta o inconveniente da falta de maciez da carne.

A competitividade da carne bovina tanto no mercado interno quanto no mercado externo, depende da adoção de estratégias de produção que provoquem o aumento da produtividade dos rebanhos e da qualidade da carne. Diferentes mecanismos estão sendo adotados para alcançar estes objetivos. Sistemas de cruzamentos entre raças para obtenção das vantagens da heterose, redução da idade de abate e precocidade reprodutiva são alguns deles.

Pesquisas recentes têm evidenciado que o sistema enzimático calpaínas/calpastatina é o responsável pelo amaciamento progressivo da carne após o abate confirmando as hipóteses feitas desde décadas passadas de que a maciez da carne é, antes de tudo, resultado de processos proteolíticos.

O desenvolvimento de pesquisas que visem melhorar a qualidade da carne manipulando o sistema calpaínas/calpastatina, mostra-se extremamente importante num momento em que, a nível mundial, são feitos grandes investimentos na qualidade total dos alimentos. A introdução e seleção de animais que venham a produzir carne macia poderá trazer aumento da produção e da competitividade da carne produzida no Brasil.

Esta revisão tem como objetivo apresentar a relação da atividade da calpastatina como indicador da maciez da carne bovina.

## MACIEZ DA CARNE BOVINA

A carne é composta, em sua maior parte, por musculatura esquelética associada a tecido conjuntivo e gordura, organizados em uma estrutura complexa, variável entre espécies e entre músculos de uma mesma espécie (LAWRIE, 1974).

Segundo JUDGE *et al.* (1989), por muitos anos, produziu-se e consumiu-se carne sem preocupação com as funções biológicas do tecido muscular no animal vivo e o quanto elas influenciavam a qualidade da carne. Somente com a compreensão dos eventos bioquímicos que ocorrem no tecido muscular vivo, foi possível saber que a carne, como uma organização complexa de músculo esquelético, tecido conjuntivo e gordura, resulta de uma série de reações físico-químicas que ocorrem no tecido muscular a partir do abate, ou mesmo momentos antes, e que determinam a qualidade final do produto.

É unânime a preferência dos consumidores por uma carne macia, embora os aspectos de qualidade visual da carne crua como cor do músculo e da gordura, proporção músculo/gordura, marmorização, firmeza do tecido muscular e textura visual (grão da carne) sejam determinantes na hora da compra (KOOHMARAIE, 1992b, 1994; SMITH *et al.*, 1992; FELÍCIO, 1995; MILLER, 1997; WARKUP, 1997).

Entretanto, o maior obstáculo para o consumo dessa carne, em vários países, é a falta de uniformidade da maciez. No Brasil, o preço da carne bovina poderá ser um fator decisivo a influenciar o consumo se a qualidade puder ser melhorada.

Maciez, ou textura de um alimento, é a manifestação de seus elementos estruturais relacionados à aparência, à mastigação e resistência à aplicação de uma força (SZCZESNIAK, 1986).

A causa da variação da textura da carne foi, inicialmente, atribuída ao tecido conjuntivo. Para LEHMANN (citado por YEATES, 1967), músculos com pouco tecido conjuntivo resultavam em carne mais macia do que aqueles com maior conteúdo de tecido conjuntivo. Entretanto, não era possível, aos pesquisadores, explicar por que músculos com a mesma quantidade de tecido conjuntivo apresentavam diferenças em sua textura. Mais adiante, pesquisas mostraram que a causa estaria na diferença de solubilidade das fibras de colágeno (LAWRIE, 1974; MARSH, 1977). Somente a natureza do colágeno não foi suficiente para explicar a variabilidade da textura da carne bovina. No início da década de 60, ficou estabelecido que as proteínas contráteis do músculo também influenciam na textura da carne. O trabalho pioneiro de LOCKER & HAGYARD (1963) foi decisivo para o conhecimento do fenômeno do encurtamento do sarcômero, provocado pelo resfriamento rápido (10°C em 10 horas ou menos) das carcaças bovinas e ovinas e que resultava em carne excessivamente dura.

Os principais componentes estruturais da carne, tecido muscular e tecido conjuntivo, passaram, então, a ser considerados como determinantes da textura da carne (MARSH, 1977).

A participação do músculo esquelético na textura da carne não se limitou ao fenômeno do encurtamento do sarcômero, também conhecido como encurtamento pelo frio. Acreditava-se que o diâmetro das fibras musculares bem como o modo como se agrupam em feixes, estava associado à maciez. Muitos trabalhos

assinalaram que a um menor diâmetro das fibras musculares correspondia uma textura melhor ou seja, uma carne mais macia. Pesquisando a maciez da carne, no Brasil, NORMAN (1982) detectou diferenças nos valores de força de cisalhamento, maciez e preferência geral da carne de bovinos das raças Canchim (5/8 Charolês 3/8 Zebu), Charolês, Nelore e Guzerá tendo as raças zebuínas, recebido escores mais baixos para maciez e preferência geral. Entretanto, após descobertas sobre o papel das proteases neutras ativadas pelo cálcio, essa questão ficou relegada a um segundo plano, principalmente porque WHIPPLE *et al.* (1990a,b), estudando características bioquímicas e histológicas de músculos de bovinos europeus puros (animais Hereford x Angus como raça pura européia) e de animais cruzados com a raça Sahiwal (3/8 e 5/8S), abatidos com idade média de 15 meses, com o objetivo de prever a maciez da carne bovina maturada, não encontraram relação da força de cisalhamento com o diâmetro e tampouco com o tipo de fibra muscular.

A deposição de gordura intramuscular, comumente usada como sinônimo de marmorização, característica de qualidade associada à palatabilidade da carne, tem sido relacionada à maciez desde as primeiras duas décadas deste século, quando os norte-americanos começaram a confinar bovinos alimentando-os com grãos. Acreditava-se que seu principal efeito era diluir o tecido conjuntivo (LAWRIE, 1974). BLUMER (1963) atribuiu à propriedade lubrificante da gordura intramuscular a maior facilidade para mastigar a carne. Assim, o conceito de que carnes com mais gordura intramuscular ou maior grau de marmorização, seriam mais macias ficou incorporado entre consumidores e pesquisadores da época. Entretanto, o mesmo autor mostrou evidências de que o teor

de gordura intramuscular contribuía com somente 7 a 11% da variação da maciez avaliada por painel sensorial, sendo raramente encontrada uma correlação significativa entre estas características. HAMMOND (citado por YEATES, 1967), em estudo sobre a qualidade da carne ovina, verificou que a relação entre quantidade de gordura intramuscular e maciez da carne era praticamente inexistente. Mas, por contribuir com a palatabilidade geral da carne, marmorização passou a ser um parâmetro importante em alguns sistemas de classificação de carcaças como ocorre no sistema norte-americano (JUDGE *et al.*, 1989; KOOHMARAIE, 1992a). Para JUDGE *et al.* (1989), a marmorização é muito mais benéfica para a suculência e sabor da carne do que para sua maciez.

PARRISH *et al.* (1973), em trabalho que avaliou o efeito da temperatura de cozimento e da marmorização sobre a palatabilidade de *longissimus dorsi* bovino, concluíram que não havia justificativa para dar importância ao grau de marmorização na tipificação ("grading") de carcaças e na melhoria da palatabilidade da carne. Os autores argumentaram que carcaças de bovinos mais jovens, com pouca deposição de gordura intramuscular no contrafilé, eram desclassificadas segundo os parâmetros do sistema norte-americano. Além disso, os produtores investiam (e continuam investindo, segundo WHEELER *et al.*, 1994) no acabamento de animais cujas carcaças apresentariam excesso de gordura que seria retirada dos cortes cárneos em função da qualidade exigida pelos consumidores.

YU & LEE (1986), avaliando as relações entre as características de qualidade da carne bovina, observaram que, entre as carcaças com a melhor classificação quanto à marmorização, a freqüência de carcaças com carne muito dura era alta.

Segundo KOOHMARAIE *et al.*, (1993), várias investigações realizadas com o objetivo de estudar o grau de interação entre marmorização e maciez da carne bovina têm mostrado que, quando há correlação positiva entre as duas características, ela é, no máximo, fraca. Os autores relataram que a marmorização explica somente 5% da variação da textura da carne bovina e que, qualquer sistema de classificação de carcaças deveria ser baseado na própria maciez, isto é, numa medida de força de cisalhamento da carne assada logo após o resfriamento.

O amaciamento progressivo da carne durante certos períodos de estocagem refrigerada (maturação da carne) tem sido objeto de estudos que datam do século XIX (LAWRIE, 1974). As primeiras hipóteses formuladas para explicar este fenômeno basearam-se no fato de que, uma vez degradados, os componentes do tecido conjuntivo do músculo seriam facilmente desdobrados por enzimas. Porém, logo se verificou que as proteínas do tecido conjuntivo, colágeno e elastina, não sofriam degradação durante a maturação ou, quando isto ocorria, se fazia por um processo não enzimático. Por outro lado, as proteínas miofibrilares e, principalmente as sarcoplasmáticas, sofriam diferentes graus de desnaturação (LAWRIE, 1974). MARSH (citado por LAWRIE, 1974), observou que, após a resolução do *rigor mortis*, a carne tornava-se tão macia quanto o era logo após o abate sem que houvesse a dissociação do complexo de actomiosina como se esperava. DAVEY (citado por LAWRIE, 1974), constatou que na carne, estocada por algum tempo em temperatura logo acima do ponto de congelação, os filamentos de actina se desprendiam da linha Z. Para DAVEY & GILBERT (citados por LAWRIE, 1974), o processo era iniciado pela liberação de íons  $Ca^{++}$  do retículo

sarcoplasmático para o sarcoplasma. Eles observaram também que etilenodiaminotetracetato (EDTA), agente quelante do  $\text{Ca}^{++}$ , evitava que ocorressem mudanças na linha Z durante a maturação. GOLL *et al.* (citados por LAWRIE, 1974), formularam a hipótese de que o rompimento das miofibrilas, ao nível da linha Z, era de natureza enzimática devido às semelhanças encontradas entre as alterações estruturais das proteínas miofibrilares ocorridas durante a maturação e aquelas causadas pela digestão das mesmas com tripsina. Além disso, postularam que as mudanças sofridas pelas proteínas musculares, que resultavam no amaciamento da carne, poderiam ocorrer por uma proteólise limitada, com rompimento de poucas ligações protéicas mas importantes do ponto de vista estrutural.

Entretanto, a natureza enzimática do amaciamento da carne durante a estocagem refrigerada, com proteólise parcial das proteínas miofibrilares, foi inicialmente atribuída às catepsinas lisossomais cujo pH ótimo, em torno de 5,0, coincidia com o pH final da carne, após a resolução do *rigor mortis*, em torno de 5,5 (YU & LEE, 1986; JUDGE *et al.*, 1989). GUROFF (citado por KOOHMARAIE, 1988), obteve, pela primeira vez, uma fração enzimática de cérebro de rato, com pH ótimo de atividade proteolítica entre 8 e 9. Esta fração foi descrita como proteinase neutra, que dependia de cálcio para ser ativada. Mais adiante, a partir dos trabalhos de DAYTON *et al.* (1976), foi possível obter a primeira purificação homogênea da proteinase neutra ativada pelo cálcio, a partir de músculos esqueléticos de suínos. DAYTON *et al.* (1976) demonstraram, *in vitro*, que a proteinase neutra removia rapidamente a linha Z das miofibrilas.

O fato de que a maciez da carne bovina aumenta à medida em que o período de estocagem refrigerada também aumenta, por 10 a 14 dias, sem que haja rompimento das ligações do complexo de actomiosina e, ainda, que as alterações que ocorrem no músculo são evidentemente proteolíticas, fez surgir um importante questionamento sobre qual sistema enzimático da célula muscular estaria envolvido no processo de maturação da carne. Naquele momento, a questão estava centralizada na ação proteolítica das enzimas lisossomais e nas enzimas neutras dependentes de cálcio (calpaínas) (GOLL *et al.*, 1983; KOOHMARAIE, 1988).

GOLL *et al.* (1983) levantaram a possibilidade de que em carnes mantidas sob congelação ou em temperaturas acima de 16°C, as catepsinas lisossomais, principalmente B, H e L, associadas às calpaínas, poderiam contribuir para o amaciamento da carne.

Vários experimentos foram realizados com o objetivo de estabelecer qual sistema enzimático estaria relacionado à degradação proteolítica da carne durante a maturação.

KOOHMARAIE (1988) verificou que, em carne estocada sob refrigeração, a atividade enzimática das catepsinas permaneceu inalterada durante a maturação de três músculos da carcaça de um mesmo animal enquanto a atividade proteolítica das calpaínas sofria declínio conforme diminuía a força de cisalhamento. Em outro experimento, usando o índice de fragmentação miofibrilar (CULLER *et al.*, 1978) e eletroforese das proteínas musculares em gel de dodecilmiliacrilamida de sódio (SDS-PAGE) como controle da degradação proteica, KOOHMARAIE (1988) em trabalho com carne ovina, observou que, em presença de EDTA e EGTA, a atividade das calpaínas foi inibida enquanto a atividade das

catepsinas permaneceu inalterada, não ocorrendo aumento da fragmentação miofibrilar. Porém, em presença de cloreto de cálcio, houve aumento da fragmentação das miofibrilas com correspondente declínio da atividade das calpaínas mas sem alteração da atividade das catepsinas lisossomais. O autor observou, também, significativo aumento da maciez da carne de carcaças ovinas que receberam infusão de solução de cloreto de cálcio. Na carne destas carcaças, a atividade das catepsinas não apresentou diferença em relação ao grupo controle, ao contrário das calpaínas cuja atividade sofreu declínio. Por outro lado, a infusão de carcaças ovinas com solução de cloreto de zinco, potente inibidor das calpaínas (KOOHMARAIE, 1990b), impediu o amaciamento da carne durante a estocagem refrigerada comprovando que o efeito proteolítico das calpaínas foi inibido pelo cloreto de zinco, como havia sido demonstrado por GUROFF (citado por KOOHMARAIE, 1990b) enquanto a atividade das catepsinas permanecia inalterada.

### ***Sistema enzimático calpaínas/calpastatina***

Calpaínas são enzimas proteolíticas presentes em todas as células eucarióticas examinadas até o momento e também em células de animais invertebrados. Pesquisas indicam que estas enzimas estão envolvidas na ativação, inativação ou modificação das funções de várias proteínas associadas com o metabolismo celular como a proteína-quinase C, receptores do fator de

crescimento epitelial, tubulina, troponina,  $\alpha$ -actinina e proteínas nucleares envolvidas na regulação gênica com a proteína *Fos*. As alterações na permeabilidade das membranas celulares podem ser uma consequência da proteólise causada pelas calpaínas em uma de suas funções biológicas como ocorre na ativação da ATPase- $\text{Ca}^{++}$  da membrana e, de modo geral, na modulação de processos de transporte de membranas (YOSHIMURA *et al.*, 1984; MELLONI & PONTREMOLI, 1989; JOHNSON, 1990; CARILLO *et al.*, 1994).

Calpaínas estão envolvidas em processos de proteólise de proteínas musculares decorrente de desnervação e de distrofia muscular de mamíferos e aves estando, ainda, envolvidas na destruição dos tecidos sinoviais em artrites reumatóides (DESPRÉS *et al.*, 1995).

Os eventos proteolíticos *post mortem* que acontecem nas células musculares de animais e que determinam o amaciamento da carne estocada sob refrigeração estão associados às calpaínas.

O músculo esquelético contém muitas proteinases. Entretanto, especialmente dois sistemas têm sido objeto de pesquisas pela capacidade de degradar proteínas miofibrilares: as catepsinas e as calpaínas. Existe, ainda, um terceiro complexo enzimático, as proteinases multicatalíticas ou proteasoma, que poderia estar envolvido na degradação das miofibrilas. Porém, ficou demonstrado que este complexo enzimático não age sobre as mesmas proteínas, que aparecem degradadas na carne durante o processo de maturação ou estocagem refrigerada *post mortem*. Por outro lado, ele pode ter um papel secundário na degradação de fragmentos protéicos gerados pelas calpaínas (GOLL *et al.*, 1992; KOOHMARAIE, 1992a, 1996).

Diferentes experimentos têm demonstrado que as catepsinas lisossomais têm pouco envolvimento com a proteólise que se observa no músculo após o abate. Embora as principais proteínas contráteis do músculo, miosina e actina, sejam bons substratos para as catepsinas, *in vitro*, segundo KOOHMARAIE (1992b) não se observa degradação destas proteínas em carne maturada por períodos prolongados e, sob diferentes condições bioquímicas (presença de íons  $\text{Ca}^{++}$ , EDTA, EGTA), as catepsinas não apresentam alterações em sua atividade. Segundo KOOHMARAIE (1992b, 1994), mesmo após estimulação elétrica e estocagem por 28 dias a  $4^{\circ}\text{C}$ , catepsinas ainda se encontram dentro dos lisossomas da célula muscular.

Por outro lado, a hipótese de que as calpaínas são as responsáveis pela proteólise *post mortem* que ocorre nos músculos após o abate, tem sido cada vez mais reforçada e continuamente testada.

Calpaínas são endopeptidases (EC 3.4.22.17), intracelulares, não lisossomais. Apresentam-se sob duas formas,  $\mu$ -calpaína e m-calpaína. Foram denominadas, inicialmente, como fator de ativação da quinase (em inglês "KAF"), fator ativado pelo cálcio (em inglês "CAF"), protease neutra ativada pelo cálcio (em inglês "CANP") e protease dependente de cálcio (em inglês "CDP"). São encontradas em homogeneizados de tecidos com seu inibidor específico, a calpastatina.

Estas enzimas apresentam absoluta dependência de cálcio para manifestarem atividade proteolítica. O requerimento de íons  $\text{Ca}^{++}$  para a  $\mu$ -calpaína varia de 5 a  $45 \mu\text{M}$  e para m-calpaína, 200 a  $1000 \mu\text{M}$  (DAYTON *et al.*, 1981; KOOHMARAIE, 1992a,b).

Ambas as formas das endopeptidases constituem-se em heterodímeros de aproximadamente 110 kDa que se dissociam em duas subunidades, de diferentes pesos moleculares, na presença de cloreto de cálcio (YOSHIZAWA *et al.*, 1995). A maior subunidade ou, a mais pesada, de 80 kDa, consiste de quatro domínios. Por possuir seqüência de aminoácidos característica das cisteínoproteinases, atribui-se ao Domínio II a atividade catalítica das calpaínas. Acredita-se que no Domínio IV seja feita a ligação com o  $\text{Ca}^{++}$  porque esta estrutura apresenta seqüência de aminoácidos semelhante à das proteínas que se ligam com cálcio como, por exemplo, a calmodulina e troponina C. A função dos Domínios I e III, este último, constituindo a porção terminal COOH, ainda não está bem definida. Apesar de serem semelhantes, as subunidades de 80 kDa das calpaínas são oriundas de genes diferentes (KOOHMARAIE, 1992a, 1994; SORIMACHI *et al.*, 1994).

Existe uma forma de calpaína expressada somente no tecido muscular esquelético denominada p94 (nCL-1). Esta nova espécie de calpaína foi descoberta em 1989. Dificilmente a calpaína p94 é detectada pois se autolisa rapidamente após a síntese. *In vitro*, sua meia-vida é de 30 minutos, sem adição de íons  $\text{Ca}^{++}$ . Localiza-se no núcleo, próximo às proteínas do citoesqueleto e no citosol. Provavelmente, sua ação envolve a diferenciação das células musculares interagindo com a família MyoD (SORIMACHI *et al.*, 1994).

No músculo, após o abate, a concentração de íons cálcio é suficiente para ativar a  $\mu$ -calpaína, responsável pelo processo proteolítico que se instala na célula muscular (GOLL *et al.*, 1983, 1992; KOOHMARAIE, 1988, 1992a,b).

As calpaínas, em presença de cálcio, sofrem autólise, mesmo na presença de substrato. A autólise tem papel fisiológico importante pois a atividade catalítica destas proteinases depende disso (KOOHMARAIE, 1988; CONG *et al.*, 1989). Uma das descobertas mais importantes em trabalhos que envolveram as calpaínas é o fato de que, após a autólise, ambas as formas,  $\mu$ - e m-calpaína, se tornam sensíveis a concentrações mais baixas de íons  $\text{Ca}^{++}$ . Segundo EDMUNDS *et al.* (1991), somente  $\mu$ -calpaína autolisada pode ter atividade proteolítica na concentração de 0,2 a 0,8  $\mu\text{M}$  de íons cálcio existente dentro da célula muscular. A isoforma milimolar de calpaína, em solução de cloreto de cálcio 1 mM, dissocia-se em duas subunidades mas não em  $\text{CaCl}_2$  a 100  $\mu\text{M}$ .

A dissociação das calpaínas em presença de cloreto de cálcio é reversível quando se adiciona EDTA, que remove o  $\text{Ca}^{++}$  da subunidade de 80 kDa. Adicionando-se a subunidade de 30 kDa a uma solução que contenha a subunidade catalítica, parece haver uma redução na sensibilidade ao íon  $\text{Ca}^{++}$  em relação à calpaína intacta (YOSHIZAWA *et al.*, 1995).

Em concentração de  $\text{Ca}^{++}$  suficiente para sua dissociação, a atividade proteolítica da  $\mu$ - e m-calpaína autolisadas, diminui à medida que aumenta o tempo de autólise. Porém, a autólise da  $\mu$ -calpaína, de origem intermolecular, não chega a ser completa. Ao contrário, após o mesmo tempo, a autólise da m-calpaína é completa por ser de origem intramolecular (CONG *et al.*, 1989; EDMUNDS *et al.*, 1991; KOOHMARAIE, 1996).

A atividade proteolítica das calpaínas é regulada pela calpastatina, proteína que exerce ação inibidora específica. Quanto mais calpastatina na célula, mais baixo é o requerimento de íons  $\text{Ca}^{++}$  para a atividade das calpaínas. A quantidade de calpaína que pode ser ativada, mantendo-se a mesma concentração de cálcio, é controlada pela concentração de calpastatina (SALAMINO *et al.*, 1994).

Segundo TAKAHASHI-NAKAMURA *et al.* (1981), a proteína inibidora endógena das calpaínas foi caracterizada pela primeira vez em 1966, por DRUMMOND e DUNCAN. Desde então, esta proteína tem sido objeto de pesquisas que investigam seu papel regulador sobre calpaínas e, especialmente, sua função no crescimento e desenvolvimento muscular de diferentes espécies (GOLL *et al.*, 1983, 1992; van den HEMEL-GROOTEN *et al.*, 1997) e na proteólise *post mortem* de músculos (WHIPPLE *et al.*, 1990a; KOOHMARAIE, 1996).

Calpastatinas com pesos moleculares que variam de 68 a 170 kDa já foram purificadas a partir de diferentes tecidos do organismo humano e de várias espécies animais (MELLONI & PONTREMOLI, 1989). Alguns estudos de purificação de calpastatina muscular de diferentes animais citam que a proteína apresenta um peso molecular igual a 68 kDa (TAKAHASHI-NAKAMURA *et al.*, 1981; POMPILI *et al.*, 1995). Por outro lado, DOUMIT *et al.* (1996) e DOUMIT & KOOHMARAIE (1996), utilizando anticorpo policlonal anti GST-calpastatina, têm encontrado, em extrações de músculo bovino, calpastatina com peso molecular de 130 kDa. A determinação de calpastatina com pesos moleculares maiores que 70 kDa, segundo MELLONI & PONTREMOLI (1989) e KILLEFER &

KOOHMARAIE (1994), pode ser devido a alterações pós-transcricionais e/ou pós-translacionais durante sua expressão.

Por ser uma proteína termoestável (TAKAHASHI-NAKAMURA *et al.*, 1981), os sistemas de purificação da calpastatina comumente utilizam-se deste recurso através do uso de altas temperaturas (60 - 90°C, 5 - 20 min.) como uma das etapas de sua purificação (MELGREN & CARR, 1983; PONTREMOLI *et al.*, 1992; SHACKELFORD *et al.*, 1994; KOOHMARAIE; SCHACKELFORD; WHEELER, 1996).

A calpastatina é composta por cerca de 700 aminoácidos sendo que a de músculo esquelético bovino apresenta 706 resíduos. Nesta proteína, estão ausentes os aminoácidos triptofano e a fenilalanina; a metionina encontra-se em quantidades muito baixas (KILLEFER & KOOHMARAIE, 1994).

O processo de conversão do músculo em carne é complexo e envolve uma série de alterações no metabolismo celular bem como na estrutura protéica, que se caracterizam pelo *rigor mortis*, queda do pH, glicólise, esgotamento das reservas de ATP, queda da temperatura da musculatura, aumento da concentração de íons cálcio no citosol, entre outros (LAWRIE, 1974; JUDGE *et al.*, 1989; GOLL *et al.*, 1995; KOOHMARAIE, 1992a,b;1996). A combinação destes eventos resultam no aparecimento de novas condições intracelulares, muito diferentes daquelas encontradas na célula muscular viva. Não se sabe ao certo quanto estas modificações podem afetar os sistemas enzimáticos intracelulares mas, favorecem a atividade das calpaínas, resultando no amaciamento da carne após o *rigor mortis* (KOOHMARAIE, 1992a,b; 1994; HUFF-LONERGAN *et al.*, 1996).

Após a resolução do *rigor mortis*, a carne apresenta maciez semelhante àquela verificada no momento do abate do animal. Neste período, miosina e actina interagem através de ligações fracas e fortes tal como acontece durante a contração muscular no animal vivo, ou seja, ocorrem ciclos de "contração" e "relaxamento" até que se esgotem as reservas de ATP (JUDGE *et al.*, 1989). Acredita-se, hoje, que existem níveis intermediários de interações miosina-actina entre a mais fraca e a mais forte. Assim, o enrijecimento muscular após o abate bem como a resolução do mesmo, seriam o resultado da mistura de todos os tipos de interação miosina-actina e, a maior ou menor quantidade de um deles, dependeria de como se encontrassem no momento do abate. De qualquer modo, o amaciamento da carne após a resolução do *rigor mortis* seria resultado do enfraquecimento das interações entre miosina e actina. Estas mudanças podem ser provocadas pelas enzimas proteolíticas do músculo (GOLL *et al.*, 1995), especificamente  $\mu$ -calpaína que, segundo GEESINK & GOLL (1995), encontra-se também associada à fração muscular sedimentada (proteínas miofibrilares) de homogeneizados musculares.

Portanto, é provável que a maciez da carne, no momento da resolução do *rigor mortis*, seja resultado da ação proteolítica da  $\mu$ -calpaína, iniciada no momento do abate (KOOHMARAIE, 1996). ALARCAN-ROJO e DRANSFIELD (1995) consideraram esta possibilidade ao verificarem que, 24 horas após o abate, em carne de bovino (músculo semitendinoso), a  $\mu$ -calpaína apresentava 40% da atividade inicial. HUFF-LONERGAN *et al.* (1996) verificaram que, em carne com força de cisalhamento muito baixa no 1º dia após o abate, não ocorria redução significativa da maciez depois de 28

dias de maturação, indicando a possibilidade de ter havido alterações estruturais das fibras musculares num período muito curto logo após o abate.

A ação da  $\mu$ -calpaína muscular, logo após a morte do animal, resulta em mudanças da ultraestrutura da célula muscular. Rupturas ao longo da linha Z, na junção da banda I, são as mais comumente observadas (GOLL *et al.*, 1983, 1992; WHEELER *et al.*, 1990b; TAYLOR *et al.*, 1995; HUFF-LONERGAN *et al.*, 1996). Estas alterações têm sido associadas à maior facilidade de fragmentação das miofibrilas (DAVEY & GILBERT, 1969).

Por muito tempo, considerou-se a degradação ou ruptura da linha ou disco Z como a alteração proteolítica mais drástica da ultraestrutura da fibra muscular durante a conversão do músculo em carne (DAVEY & GILBERT, 1969; GOLL *et al.*, 1983; TAYLOR *et al.*, 1995). A proteólise *post mortem* torna as miofibrilas mais suscetíveis à fragmentação durante a mastigação. A facilidade de fragmentação das miofibrilas é, sem dúvida, o resultado mais importante das alterações que ocorrem durante a transformação do músculo em carne e que confere a característica de maciez à carne. A maior ou menor facilidade de fragmentação pode ser medida por método químico, denominado de Índice de Fragmentação Miofibrilar, que mede a intensidade com que as miofibrilas são rompidas durante um processo de trituração das mesmas, à semelhança do que ocorre na mastigação (DAVEY & GILBERT, 1969). Este método indica quão macia é a carne ou quão fácil será mastigá-la. Este índice foi muito utilizado como um meio de prever a maciez da carne (CULLER *et al.*, 1978; WHIPPLE *et al.*, 1990a,b;) mas, por demandar tempo e ser questionável quanto ao valor preditivo da maciez (WHIPPLE *et al.*, 1990b), seu uso tem sido mais

limitado. Ao contrário, a medida da força de cisalhamento, de execução mais simples e rápida, de alta correlação com a avaliação sensorial, vem sendo utilizada através dos anos por ser uma característica com valor preditivo da maciez (HUFFMAN *et al.*, 1996; KOOHMARAIE, 1996, KOOHMARAIE; SHACKELFORD; WHEELER, 1998).

Pesquisas recentes mostraram que o aumento da fragmentação miofibrilar ou amaciamento progressivo da carne estocada sob refrigeração (0 a 5°C) está relacionado muito mais com a degradação da troponina T, desmina, nebulina e outras proteínas pertencentes ao citoesqueleto da fibra muscular do que propriamente com a ruptura da linha Z.

As calpaínas estão localizadas em regiões distintas das células musculares (GOLL *et al.*, 1983,1992). Encontram-se junto às mitocôndrias, na superfície da membrana celular que está em contato com o citoplasma e às miofibrilas, nas quais a concentração é maior junto à linha Z, assim como na superfície das miofibrilas. Calpaínas e calpastatina também já foram localizadas fora da célula muscular, no tecido conjuntivo (FUMAGALLI *et al.*, 1996), podendo ter participação na regulação proteica da lâmina basal.

A localização das calpaínas, concentrada próximo à linha Z, indica que possuem papel importante no metabolismo das proteínas miofibrilares e, conseqüentemente, no amaciamento da carne (GOLL *et al.*, 1983). As calpaínas, especificamente a  $\mu$ -calpaína, têm pouco efeito sobre as proteínas sarcoplasmáticas. Sua ação mais visível (microscopia eletrônica) é a rápida degradação da linha Z (DAYTON *et al.*, 1981; WHEELER *et al.*, 1990b) e da linha M. Porém, em SDS-PAGE, a primeira alteração que se observa nas proteínas miofibrilares é o desaparecimento da

banda protéica correspondente à troponina T, à medida que a carne vai maturando. Em função disto, estabeleceu-se uma relação entre o desaparecimento da troponina T, concomitante ao aparecimento de um polipeptídeo de 30 kDa e a velocidade de amaciamento da carne, de tal modo que, em carnes macias, a banda de 30 kDa aparece mais rapidamente do que naquelas cuja proteólise é mais lenta, que não amaciam durante a maturação.

GOLL *et al.* (1983), revisando vários trabalhos, concluíram que o amaciamento da carne ocorreria, provavelmente, pela degradação da troponina T paralelamente a outras alterações *post mortem*. Estas, por sua vez, também afetariam o processo de amaciamento da carne como por exemplo, a degradação da linha N<sub>2</sub>, que aconteceria antes do desaparecimento da troponina T. Além disso, os autores enfatizaram que, em carne refrigerada entre 2 e 4°C, a degradação da troponina T e da linha Z, seria causada pela ação proteolítica das calpaínas, principalmente  $\mu$ -calpaína, mesmo em presença de calpastatina.

Recentemente, GOLL *et al.* (1995) afirmaram que, apesar de existir ainda um consenso de que a  $\mu$ -calpaína provoca a degradação da linha Z, existem evidências de que a linha Z, composta de  $\alpha$ -actinina, permanece intacta na carne estocada sob refrigeração durante 7 a 10 dias. TAYLOR *et al.* (1995), em trabalho que avaliou a degradação das proteínas do citoesqueleto, atribuída à  $\mu$ -calpaína, verificaram que a ruptura se dá ao longo da linha Z, sem alteração da mesma ou seja, sem proteólise da  $\alpha$ -actinina. Os autores também observaram afrouxamento do sarcolema e degradação das proteínas desmina, vinculina e distrofina responsáveis pela sustentação das miofibrilas dentro da fibra

muscular, além de proteínas do citoesqueleto, nebulina e titina. Segundo KOOHMARAIE (1996), outras proteínas musculares poderão ser descobertas e serem envolvidas no amaciamento da carne porém, o certo é que este processo será essencialmente proteolítico.

Sempre houve um questionamento sobre a possibilidade de a  $\mu$ -calpaína ser, ou não, ativa nas condições de estocagem refrigerada da carne cujo pH está ao redor de 5,6 e a temperatura ambiente oscilando entre 0 e 5°C. Acreditava-se que a  $\mu$ -calpaína seria inativada rapidamente e não poderia contribuir para o amaciamento da carne além das 24-48 horas que se seguiam ao abate. Esta hipótese esteve alicerçada em determinações de atividade da  $\mu$ -calpaína nas quais se observava um declínio da atividade proteolítica desta enzima à medida que aumentava o tempo *post mortem*. Este declínio da atividade era atribuído à autólise e inativação da enzima nas condições de temperatura e pH da carne.

Com o objetivo de determinar se a  $\mu$ -calpaína apresentava atividade nas condições de estocagem refrigerada da carne, HUFF-LONERGAN *et al.* (1996) estudaram a degradação das proteínas troponina T, nebulina, desmina, filamina e titina na carne de novilhos, previamente classificada em dois grupos conforme a força de cisalhamento inicial em muito macias e muito duras, maturadas pelo método convencional (2-4°C), por diferentes períodos de tempo. Estas proteínas, isoladas de músculos bovinos, foram, também, incubadas com  $\mu$ -calpaína em condições semelhantes às da maturação (4°C, pH 5,6, CaCl<sub>2</sub> 100  $\mu$ M). A proteólise foi controlada pelo aparecimento de produtos de degradação destas

proteínas, em SDS-PAGE e técnicas imunológicas ("immunoblot"). HUFF-LONERGAN *et al.* (1996) observaram, na carne convencionalmente maturada, que os padrões de degradação das proteínas isoladas, incubadas com  $\mu$ -calpaína, mostraram-se relacionados com a maioria das alterações observadas nas mesmas proteínas. Nebulina foi degradada rapidamente, antes da troponina T. Este resultado coincidiu com as observações feitas por GOLL *et al.* (1983). A proteólise da nebulina também aconteceu antes da titina. Desmina permaneceu praticamente inalterada durante todo o período de maturação (28 dias) das carnes.

No trabalho de HUFF-LONERGAN *et al.* (1996), em amostras de carne muito macia, a banda correspondente ao peso molecular de 30 kDa, indicativa da proteólise da troponina T, apareceu no 1º dia após o abate enquanto nas carnes muito duras, o polipeptídeo de 30 kDa apareceu somente no 7º dia *post mortem*. No 3º dia após o abate, nas carnes muito macias, já havia sido identificada uma segunda banda, de 28 kDa, indicando início de degradação do polipeptídeo de 30 kDa. Porém, até o final da maturação, alguma troponina T intacta permaneceu visível em ambos os tipos de carne. A degradação parcial da desmina e troponina T coincidiu, em ambos os tipos de carnes, com a redução dos valores da força de cisalhamento, principalmente nas carnes muito duras.

Em conjunto, estes resultados forneceram suporte para afirmar que a degradação das proteínas miofibrilares pela  $\mu$ -calpaína constitui o principal fator de amaciamento da carne maturada sob refrigeração e que provavelmente seja iniciado imediatamente após a morte do animal, gerando as diferenças de maciez durante as primeiras 24 horas *post mortem* (KOOHMARAIE, 1996).

A degradação das proteínas nebulina, troponina T e titina estão intimamente relacionadas com o aparecimento, número e largura das rupturas da junção da linha Z com a banda I (BOYER-BERRI & GREASER, 1998) e, juntamente com a proteólise da filamina e desmina, podem ser usadas como indicadores da maciez da carne porque, de modo geral, elas são degradadas mais rapidamente em músculos macios do que naqueles de pior textura (HUFF-LONERGAN *et al.*, 1996).

Estes trabalhos, juntamente com o de GEESINK & GOLL (1995), que observaram presença de  $\mu$ -calpaína na fração sedimentada de miofibrilas, que contêm actina e miosina, indicam que esta endopeptidase pode manter atividade por um longo período de tempo após o abate. KOOHMARAIE (1996) relatou que, em trabalhos nos quais se utilizou caseína marcada,  $\mu$ -calpaína está presente no músculo mesmo após 14 dias, com 5 a 10% da atividade inicial. A autólise desta endopeptidase, constituindo-se em processo intermolecular, não sendo, portanto, completo, permite concluir que a  $\mu$ -calpaína pode reter alguma atividade após ter sofrido autólise extensiva (KOOHMARAIE, 1996).

Sabe-se que a atividade das calpaínas é inibida especificamente pela calpastatina. Porém, a natureza desta regulação ainda não foi bem definida. A velocidade de inativação da calpastatina é altamente correlacionada com o amaciamento da carne durante a maturação. Em geral, alta atividade de calpastatina é relacionada a uma reduzida degradação das proteínas miofibrilares (HUFF-LONERGAN & LONERGAN, 1997), claramente evidenciada na falta de maciez da carne de bovinos *Bos indicus* e de ovinos com o fenótipo "callipyge" nas quais a atividade de calpastatina se sobrepõe à da  $\mu$ -calpaína (KOOHMARAIE, 1988;

WHIPPLE *et al.*, 1990a,b; WHEELER *et al.*, 1990b; SHACKELFORD *et al.*, 1991,1994; KOOHMARAIE *et al.*, 1995b; KOOHMARAIE *et al.*, 1996, KOOHMARAIE, SHACKELFORD & WHEELER, 1998).

***Maciez da carne de bovinos***  
***Bos indicus***

A introdução de bovinos da raça Nelore (*Bos indicus*) no Brasil, vindos da Índia e que em 1962 não alcançava 7.000 animais, sofreu uma expansão sem igual no mundo, refletindo a perfeita adaptação ao ambiente de clima tropical e subtropical característico da maior parte do país (SANTIAGO, 1972).

A adaptabilidade das diferentes raças de *Bos indicus* a climas quentes, sua resistência a ectoparasitas e os aspectos produtivos em geral, vêm sendo extensivamente aproveitados em cruzamentos com bovinos europeus, em várias formas, para obtenção das vantagens da heterose (CARPENTER *et al.*, 1961; CROUSE *et al.*, 1989; O'CONNOR *et al.*, 1997).

Entretanto, apesar dos incontestáveis ganhos produtivos resultantes desses cruzamentos, as vantagens da heterose têm encontrado, na falta de maciez da carne, um sério obstáculo. Em outros países, mercados mais exigentes e a indústria discriminam bovinos com fenótipo zebuino (CARPENTER *et al.*, 1961; SHERBECK *et al.*, 1996). Para os brasileiros, o maior obstáculo poderá estar relacionado à preferência dos consumidores que têm, na maciez, o item mais importante da palatabilidade da carne bovina (FELÍCIO, 1995, PIÑEDA, 1998).

No Brasil, que possui o maior rebanho comercial do mundo, composto em grande parte pela raça Nelore, cruzamentos comerciais entre o gado Nelore e bovinos *Bos taurus* estão cada vez mais intensificados, principalmente em regiões de clima temperado, onde predominam as raças européias. Com isso, parece que, em algum momento, a qualidade da carne, especialmente a maciez, deverá constituir-se em ponto crítico (SMITH *et al.*, 1992; WARKUP, 1997) do sistema de produção de carne.

Vários estudos, realizados basicamente nos Estados Unidos da América, revelaram que o genótipo zebuíno e sua proporção nos cruzamentos com raças européias, introduz uma grande variação da maciez da carne. CARPENTER *et al.* (1961) compararam a palatabilidade da carne de bovinos com diferentes graus de sangue Brahman (1/4B, 1/2B, 3/4B), em cruzamentos com gado Shorthorn, com a carne de animais puros Brahman. Os autores observaram que a carne de novilhos 1/4B apresentou menor força de cisalhamento e os melhores escores de maciez pelo painel sensorial em relação à carne de novilhos Brahman. Bovinos 1/2B e 3/4B produziram carne com textura intermediária. CROUSE *et al.* (1989), utilizando animais 0, 25, 75 e 100% *Bos indicus*, demonstraram que, à medida que aumenta a participação do genótipo zebuíno dentro de uma raça, aumenta a força de cisalhamento, diminuem os escores de avaliação sensorial de maciez com o respectivo aumento da variância destes valores. CROUSE *et al.* (1989) concluíram que a variação da maciez foi independente do ambiente onde os animais foram produzidos e da composição da carne e deveu-se ao genótipo zebuíno. Resultados

semelhantes foram encontrados por GALLINGER *et al.* (1992), SHERBECK *et al.* (1995), e PRINGLE *et al.* (1997).

WHEELER *et al.* (1990a), maturando carne de novilhos Hereford puros, Brahman puros e cruzamentos Hereford x Brahman, submetidos ou não à estimulação elétrica logo após o abate (450 V, 1,5 a 2 min.), durante 28 dias, verificaram que o genótipo zebuino influenciava também a velocidade de amaciamento da carne de novilhos. Neste trabalho, ficou demonstrado que a carne de novilhos Brahman necessitou de 28 dias de maturação para alcançar 20% dos valores de força de cisalhamento igual ou menor que 3,5 kgf, valor relativo às carnes muito macias de novilhos Hereford, sem estimulação elétrica, após 28 dias. Com estimulação elétrica, nenhuma amostra de carne de bovinos Brahman apresentou força de cisalhamento menor que 3,5 kgf aos 14 dias *post mortem* e somente 60% das mesmas necessitou menos que 3,5 kgf somente após 21 dias de maturação. Por outro lado, 70% das amostras de contrafilé de novilhos Hereford, não estimulados eletricamente, apresentaram valores de força de cisalhamento igual ou menor que 4,5 kgf aos 14 dias de maturação e, com estimulação elétrica, 90% das amostras apresentaram força de cisalhamento igual ou menor que 3,5 kgf no mesmo período. Com relação aos animais cruzados, a estimulação elétrica fez aumentar em 70% a frequência de valores de força de cisalhamento menor que 3,5 kgf após 14 dias de maturação e, em 90%, a frequência de amostras que necessitaram de menos de 4,5 kgf para serem cortadas. Para WHEELER *et al.* (1990a), a combinação de estimulação elétrica com maturação da carne de novilhos Brahman não foi suficiente para dar garantia de qualidade quanto à maciez.

WHIPPLE *et al.* (1990a), buscando explicar as causas das diferenças de velocidade de amaciamento dos músculos longo dorsal e semitendinoso de novilhos europeus puros (animais Hereford x Angus como raça pura européia) e de animais cruzados com a raça Sahiwal (3/8 e 5/8S), observaram que a carne de bovinos 5/8S, mais dura que a de 3/8S, mesmo após 14 dias de maturação, teve proteólise reduzida, verificada por eletroforese das proteínas miofibrilares. A proteína desmina, do citoesqueleto das células musculares, da carne de novilhos 5/8S permaneceu inalterada. Ao mesmo tempo, não foi observada a banda correspondente à proteína de 30 kDa, característica das carnes que sofreram maturação (GOLL *et al.*, 1983; KOOHMARAIE, 1988). Isto também foi observado por WHEELER *et al.* (1990b), em contrafilé maturado de novilhos Brahman. WHIPPLE *et al.* (1990a) verificaram que a atividade de calpastatina, o inibidor específico das calpaínas, determinada 24 horas após o abate juntamente com a força de cisalhamento, foi mais alta no músculo *longissimus dorsi* de novilhos 3/8S (1,96 U de calpastatina/g de carne e 9,3 kgf) e 5/8S (2,09 U/g de carne e 9,6 kgf) do que em novilhos Hereford x Angus, igual a 1,36 U de calpastatina/g de carne (força de cisalhamento igual a 7,0 kgf). Para os autores, a pior textura da carne de zebuínos foi devida à reduzida proteólise das proteínas miofibrilares associada à alta atividade de calpastatina dos músculos.

Com base nestes resultados, WHIPPLE *et al.* (1990b) realizaram estudo que envolveu análise de regressão tomando a força de cisalhamento e os escores sensoriais, obtidos de carne maturada por 14 dias, como variáveis dependentes e, as diferentes características bioquímicas e histológicas, como variáveis independentes. O objetivo dos autores foi determinar o valor

preditivo das características bioquímicas e histológicas do músculo *longissimus dorsi* de novilhos 3/8S e 5/8S após 14 dias de maturação. Neste estudo, WHIPPLE *et al.* (1990b) verificaram que o Índice de Fragmentação Miofibrilar (CULLER *et al.*, 1978), de carne maturada por 7 dias, explicava 50% da variação da força de cisalhamento e maciez, avaliada por painel sensorial, e que o mesmo poderia ser importante indicador da maciez junto com força de cisalhamento. Entretanto, o Índice de Fragmentação Miofibrilar foi considerado como uma resposta à maturação e não uma característica com potencial preditivo. Com base nessa observação, WHIPPLE *et al.* (1990b) retiraram esta variável da análise estatística e verificaram que a atividade de calpastatina, determinada 1 dia após o abate, foi a variável que, sozinha, explicou a maior parte, 44%, da variação da maciez da carne bovina, independentemente da raça. O modelo de regressão para a força de cisalhamento, sem o IFM, teve o maior coeficiente de determinação ( $R^2$ ), igual a 0,76 e incluiu 4 variáveis: atividade de calpastatina 24 h *post mortem*, atividade de catepsinas B + L após 14 dias de maturação, pH 6 horas e relação porcentagem de fibras/área de fibras  $\beta R$ , embora os três últimos tenham sido menos importantes.

Resultados semelhantes aos obtidos por WHIPPLE *et al.* (1990b) foram encontrados por SHACKELFORD *et al.* (1991). Estes autores concluíram que a maior atividade de calpastatina de contrafilé de novilhos 5/8B, em relação aos novilhos Hereford, contribuiu para a menor velocidade de amaciamento da carne durante a maturação.

A extensão do amaciamento da carne bovina durante a maturação, de três raças 3/8 Brahman, provenientes de

cruzamentos com Hereford, Red Angus e Simental (Braford, Red Brangus e Simbrah), foi avaliada em relação ao componente genético do *Bos taurus* por O'CONNOR *et al.* (1997). A baixa resposta à maturação e, portanto, a maior dureza da carne, foi associada com o genótipo zebuíno. Neste trabalho, a atividade de calpastatina da carne de bovinos Braford, até 4 dias *post mortem*, foi mais alta do que a de Red Brangus e Simbrah, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Entretanto, comparando-se os genótipos que formaram as raças estudadas, a atividade de calpastatina de contrafilé de bovinos 3/8 Brahman foi mais alta ( $P < 0,05$ ) em relação aos animais *Bos taurus*. Além disso, os autores observaram que o amaciamento da carne de novilhos 3/8 Brahman, mais lento do que a de bovinos europeus, foi associado com a alta atividade de calpastatina.

RÜBENSAM *et al.* (1998) encontraram diferenças na atividade de calpastatina e na textura da carne medida através da força de cisalhamento pelo equipamento de Warner Bratzler Shear (WB) determinados no 1º dia e no 10º dia após o abate, entre a carne (contrafilé, m. *L. dorsi*) de novilhos Polled Hereford (HH,  $n=14$ ) e 5/8Hereford3/8Nelore (5/8H3/8H,  $n=5$ ) produzidos no Rio Grande do Sul. O grupo genético 3/4Hereford1/4Nelore (3/4H1/4N,  $n=7$ ) apresentou médias intermediárias, que não diferiram dos dois grupos anteriores ( $P > 0,05$ ). O coeficiente de correlação entre força de cisalhamento e atividade de calpastatina, medidas no 1º e 10º dia *post mortem*, foi positivo ( $r=0,59$  e  $0,51$ , respectivamente) e significativo ( $P < 0,01$  e  $P < 0,05$ , respectivamente), indicando que carnes com alta atividade de calpastatina no 1º dia *post mortem* necessitam de maior força para serem cortadas, ou seja, são menos macias mesmo após 10 dias de maturação. Considerando-

se o limite de 4,6 kgf de força de cisalhamento proposto por SHACKELFORD *et al.* (1991), entre carne macia (<4,6 kgf) e carne dura (>4,6 kgf), a carne obtida nos três tratamentos era dura no 1º dia após o abate e, com exceção do grupo 3/8N (37,5% Nelore), era macia no 10º dia *post mortem*. Os autores concluíram que a introdução de raças zebuínas em cruzamentos comerciais de bovinos pode estar trazendo prejuízos à maciez da carne produzida no Estado.

Por muitos anos se utilizou e ainda se utiliza, a marmorização (BLUMER, 1963; WHEELER *et al.*, 1994; KOOHMARAIE, 1995), característica de atratividade da carne relacionada à quantidade de gordura intramuscular, como critério de tipificação de carcaças nos Estados Unidos da América. Naquele país, para se conseguir uma classificação superior das carcaças, os animais permanecem mais tempo em regime de alimentação extensiva, produzem carcaças com maior proporção de gordura que será, posteriormente, desprezada pelas donas de casa. Inúmeros trabalhos demonstraram que marmorização se relaciona muito pouco com a palatabilidade da carne (KOOHMARAIE; SHACKELFORD; WHEELER, 1998) e, além disso, explica somente 5 a 20% da variação da maciez (BLUMER, 1963; WHIPPLE *et al.*, 1990b). Deste modo, em um grupo de animais com o mesmo teor de gordura intramuscular, alguns irão produzir carne macia e, outros, carne dura.

Independentemente da classificação de carcaças, com ênfase na marmorização do contrafilé, a seleção de raças bovinas foi essencialmente direcionada para aquelas de constituição genética apropriada tanto a um crescimento como a um

acabamento rápido e que apresentam, geralmente, uma carne mais macia.

No Brasil, este conceito está sendo assimilado entre os criadores e melhoristas da raça Nelore através de diferentes programas de melhoramento genético de gado de corte. Precocidade é a palavra-chave na cadeia produtiva da carne de gado Nelore e tem por objetivo, a obtenção de um produto final de qualidade conhecida, seja no âmbito da produção de reprodutores seja na produção da carne (FELÍCIO, 1995; FRIES, 1996) sem porém, esquecer das características de adaptação.

Entretanto, mesmo que a precocidade de terminação aumente as probabilidades de os animais produzirem carne macia, a qualidade final da carne ou a palatabilidade, será variável, principalmente quanto à maciez (WHEELER; CUNDIFF; KOCH, 1994; KOOHMARAIE; SHACKELFORD; WHEELER, 1998).

Há necessidade crescente de se adotar metodologias para o melhoramento genético dos rebanhos bovinos, que dêem garantia ao consumidor de que a carne bovina será macia. Para KOOHMARAIE; SHACKELFORD; WHEELER (1998), a genética influi significativamente na variação da maciez da carne e sua maior expressão acontece em relação ao *Bos indicus* e ao fenótipo "callipyge" em ovinos, associado à alta atividade de calpastatina muscular.

A partir dos trabalhos de WHIPPLE *et al.* (1990a,b) e WHEELER *et al.* (1990b), ficou estabelecida a estreita relação entre a reduzida proteólise da carne maturada de bovinos com genótipo zebuíno à maior atividade de calpastatina muscular. Com base nestes trabalhos, SHACKELFORD *et al.* (1994) calcularam as herdabilidades e correlações genéticas e fenotípicas de

características de carcaça e de carne, a partir de dados de programas de melhoramento de rebanhos bovinos do "Meat Animal Research Center", Clay Center, Estados Unidos da América. A hipótese de que a seleção de animais com reduzida atividade de calpastatina poderia resultar na produção de carne mais macia, levou SHACKELFORD *et al.* (1994) a determinar a herdabilidade da atividade de calpastatina muscular e de sua relação genética com a maciez da carne maturada. Os autores obtiveram valores de herdabilidade de atividade de calpastatina, força de cisalhamento e teor de gordura intramuscular iguais a 0,65, 0,53 e 0,93, respectivamente. A correlação genética entre atividade de calpastatina e força de cisalhamento foi igual a 0,50. Neste trabalho, a correlação genética entre rendimento em cortes e atividade de calpastatina e teor de gordura intramuscular foi, respectivamente, 0,44 e -0,63. Entre ganho médio diário e as duas últimas características foi, respectivamente, -0,52 e -0,04. Tendo em vista estes resultados, os autores concluíram que a seleção de animais com baixa atividade de calpastatina muscular pode resultar numa resposta genética rápida para maciez, sem comprometimento da taxa de crescimento. Ao contrário, seleção de animais com alto teor de gordura intramuscular poderia levar à produção de animais com baixo rendimento em cortes.

Por outro lado, PRINGLE *et al.* (1997), observaram que a diminuição do teor de gordura intramuscular, avaliada visualmente através da marmorização do contrafile bovino, pôde explicar, parcialmente, as diferenças de maciez da carne observadas entre *Bos taurus* e *Bos indicus*. Além disso, mais do que a atividade de calpastatina, a relação  $\mu$ -calpaína/calpastatina constituiu-se na característica determinante das diferenças de maciez entre os

diferentes genótipos bovinos. Para os autores, o amaciamento da carne de bovinos, com diferentes genótipos *Bos indicus*, sofre efeito combinado da atividade de calpastatina, grau de marmorização e da porcentagem de genes zebrúinos.

Os resultados obtidos por SHACKELFORD *et al.* (1994) e PRINGLE *et al.* (1997) podem estar indicando que a busca da precocidade de crescimento (FRIES, 1996) talvez resulte na produção de carne com qualidade uniforme. Portanto, a possibilidade de se usar a atividade de calpastatina como método de identificação de animais produtores de carne macia, pode se constituir num meio de alcançar a precocidade de terminação.

### ***Atividade de calpastatina como indicador de maciez de carne bovina***

A constatação de que a atividade de calpastatina nas 24 horas após o abate, é uma característica de alta herdabilidade e geneticamente correlacionada com a maciez da carne bovina, tem levado os pesquisadores a propor que a mesma seja usada como indicador de maciez da carne logo após a matança e mesmo antes de o animal ser abatido (KOOHARAIE *et al.*, 1995a; WULF *et al.*, 1996).

Sem dúvida, a instigante curiosidade e necessidade de se conhecer a maciez da carne bovina já foi registrada há algumas décadas, mostrando que o homem sempre se preocupou com a qualidade da carne e, principalmente, com sua maciez. Mais

interessantes, ainda, foram as observações feitas sobre a herdabilidade da maciez, à qual se atribuía a grande variabilidade encontrada entre os animais. Mas, nos anos passados, permanecia difícil e distante estabelecer os fundamentos anatômicos fisiológicos ou bioquímicos de tais diferenças. YEATES (1967) relatou sua preocupação e curiosidade afirmando que, no futuro, talvez fosse possível tomar amostras de músculos de touros mediante uma biópsia, com o objetivo de determinar a herdabilidade da mesma.

Porém, até o presente momento, mesmo que a relação da maciez com a atividade de calpastatina *post mortem* esteja bem estabelecida, ainda não foi possível definir qual método é o mais apropriado para fazer a previsão da maciez com base genética. Sabe-se que o gene da calpastatina bovina é polimórfico e está localizado no cromossomo 7 do genoma bovino (KOOHMARAIE *et al.*, 1995a). O polimorfismo foi identificado por LONERGAN *et al.* (1995), com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI que produziram fragmentos de 9,0 e 5,0 kb (quilobases) e 6,0 e 4,0 kb, respectivamente. Ambas enzimas produziram fragmentos monoméricos de 15 e 2,0-3,0 kb, respectivamente. Entretanto, apesar deste polimorfismo, não surgiu evidência de que a frequência alélica fosse diferente entre raças. Além disso, o polimorfismo de genótipos, analisados pelas enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI, não explicou a variação da atividade de calpastatina e força de cisalhamento da carne tanto nas primeiras 24 horas *post mortem* como após 14 dias após o abate. Tendo em vista estes resultados, LONERGAN *et al.* (1995) concluíram que a alternativa para prever a maciez da carne de bovinos de diferentes composições genéticas poderia ser baseada principalmente na

variação da expressão da calpastatina e de sua atividade no próprio músculo.

GREEN *et al.* (1996) realizaram experimento com novilhos provenientes de cruzamentos *Bos taurus*-*Bos indicus*, com o objetivo de determinar a relação entre maciez da carne, maturada por diferentes períodos, e o polimorfismo genético da calpastatina muscular. O polimorfismo do gene da calpastatina, de cada animal, foi determinado pela técnica de identificação de fragmentos de DNA de diferentes comprimentos (RFLP) obtidos com a enzima Taq1. GREEN *et al.* (1996) concluíram que o polimorfismo genético da calpastatina de *Bos indicus* afetou significativamente a maciez, avaliada por painel sensorial e força de cisalhamento, e a atividade de calpastatina, medida no 1º dia após o abate.

KOOHMARAIE (1995) comentou que os fatores que afetam a expressão do gene candidato a ser o marcador da maciez, no caso o gene da calpastatina, podem estar localizados em cromossomas diferentes e os mesmos não podem ser identificados tendo por base somente o gene candidato. O autor considerou que, para seleção genética para maciez, mais importante e mais seguro, será o uso de marcadores genéticos, que permitem, em nível de DNA, a determinação da variação genética simultaneamente com as determinações fenotípicas. Para KOOHMARAIE (1995), mesmo conhecendo-se os fatores genéticos de regulação dos genes, nem toda a variação da maciez da carne poderá ser controlada porque ela é afetada, também, por fatores ambientais e que se constituem na maior parte da variação desta característica. Dentro de uma raça, a genética explica 30% da variação da maciez e entre raças, aproximadamente 46%. Segundo o autor, o fator ambiental (alimentação, nível de estresse, resfriamento da carne, maturação,

congelamento, método de cozimento da carne) deve ser considerado na seleção genética para maciez.

MILLER (1997) considerou a possibilidade de se fazer seleção genética para maciez através de testes de progênes de touros, tendo em vista que a força de cisalhamento da carne responde ao efeito do touro e que a atividade de calpastatina no 1º dia *post mortem* tem relação genética com a força de cisalhamento. Por outro lado, KOOHMARAIE (1995) já havia se manifestado contrário aos testes de progênie para a atividade de calpastatina argumentando que isso seria um processo muito demorado. MILLER (1997) afirmou que a atividade de calpastatina da carne no 1º dia após o abate poderia constituir-se em instrumento de seleção indireta para a força de cisalhamento.

As determinações da atividade de calpastatina geralmente são feitas por determinação enzimática das frações eluídas de colunas de cromatografia de troca iônica ou de gel-filtração ou de extratos musculares aquecidos, através da atividade inibidora da calpastatina sobre a ação proteolítica das calpaínas (KOOHMARAIE, 1990a; SHACKELFORD *et al.*, 1994). Estas determinações consomem tempo e necessitam de quantidades significativas de amostra. Por outro lado, os métodos imunoenzimáticos são mais rápidos, simples e muito sensíveis. Quantidades mínimas de amostras são necessárias para fazer as determinações (TAKANO *et al.*, 1984; van den HEMEL-GROOTEN *et al.*, 1997). A quantificação rápida da atividade de calpastatina pode ser viabilizada através do ensaio imunoenzimático denominado teste ELISA (do inglês "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay") utilizando-se um anticorpo contra a calpastatina muscular bovina. O anticorpo pode ser produzido a

partir de fragmentos menores de calpastatina como por exemplo, 15 kDa (KOOHMARAIE *et al.*, 1995a), 34 kDa (POMPILI *et al.*, 1995, FUMAGALLI *et al.*, 1996) ou pela expressão da proteína recombinante por microrganismos transformados com o plasmídeo contendo o gene da calpastatina (DOUMIT *et al.*, 1996). Para que o anticorpo reconheça a calpastatina nativa, com peso molecular em torno de 70 kDa, ou fragmentos menores, em extratos musculares, o mesmo deve ser policlonal. Utilizando-se o anticorpo policlonal anti calpastatina, é possível analisar pelo teste ELISA, ao mesmo tempo, um grande número de amostras de carne de bovinos fenotipicamente diferentes (DOUMIT *et al.*, 1996).

A seleção para carne macia, seja pelo uso de marcadores genéticos, teste de progênie ou através de imunoensaios em amostras de músculos obtidos por biópsia, pode diminuir significativamente a variabilidade da maciez da carne bovina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALARCON-ROJO, A. D.; DRANSFIELD, E. Alteration of postmortem ageing in beef by the addition of enzyme inhibitors and activators. **Meat Science**, v. 41, n.2, p. 163-178, 1995.
- BLUMER, T. N. Relationship of marbling to the palatability of beef. **J. Animal Science**, v.22, p. 771-779, 1963.
- BOYER-BERRI, C.; GREASER, M. L. Effect of post mortem storage on the Z-line region of titin in bovine muscle. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 1034-1044, 1998.
- CARILLO, S.; PARIAT, M.; STEFF, A. M.; ROUX, P.; ETIENNE-JOULAN, M.; LORCA, T.; PIECHACZYK, M. Differential sensitivity of *FOS* and *JUN* family members to calpain. **Oncogene**, v. 9, p. 1679-1689, 1994.
- CARPENTER, J. W.; PALMER, A. Z.; KIRK, W. G.; PEACOCK, F. M.; KOGER, M. Slaughter and carcass characteristics of Brahman and Brahman-Shorthorn crossbred steers. **Journal of Animal Science**, v. 20, p. 336-340, 1961.
- CONG, J.; GOLL, D. E.; PETERSON, A. M.; KAPPRELL, H. P. The role of autolysis in activity of the  $Ca^{2+}$ -dependent proteinases ( $\mu$ -calpain and m-calpain). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 17, p. 10096-10103, 1989.
- CROUSE, J.D., CUNDIFF, L.V., KOCH, R.M., KOOHMARAIE, M. and SEIDEMAN. Comparisons of *Bos indicus* and *Bos taurus* inheritance for carcass beef characteristics and meat palatability. **Journal of Animal Science**, v. 67, p. 2661-2668, 1989.

- CULLER, R. D.; PARRISH, Jr., F. C.; SMITH, G. C.; CROSS, H. R. Relationship of myofibril fragmentation index to certain chemical, physical and sensory characteristics of bovine longissimus muscle. **Journal of Food Science**, v. 43, p. 1177-1180, 1978.
- DAVEY, C. L.; GILBERT, K. V. Studies in meat tenderness. 7. Changes in the fine structure of meat during age. **Journal of Food Science**, v. 34, p. 69-74, 1969.
- DAYTON, W. R.; REVILLE, W. J.; GOLL, D. E.; STROMER, M. H. A  $Ca^{2+}$ -activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Partial characterization of the purified enzyme. **Biochemistry**, v. 15, n. 10, p. 2159-2167, 1976.
- DAYTON, W.R., SCHOLLMEYER, J.V., LEPLEY, R.A. and CORTÉS, L.R. A calcium-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 659, p. 48-61, 1981.
- DESPRÉS, N.; TALBOT, G.; PLOUFFE, B.; BOIRE, G.; MÉNARD, H. A. Detection and expression of a cDNA clone that encodes a polypeptide containing two inhibitory domains of human calpastatin and its recognition by rheumatoid arthritis sera. **Journal of Clinical Investigation**, v. 95, p. 1891-1896, 1995.
- DOUMIT, M. E.; KOOHMARAIE, M. Immunoblot analysis of calpastatin degradation: evidence for calpain cleavage in postmortem muscle. **Journal of Animal Science**, v. 74, suppl. 1, p. 157, 1996.
- DOUMIT, M. E.; LONERGAN, S. M.; ARBONA, J. R.; KILLEFER, J.; KOOHMARAIE, M. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantification of skeletal

muscle calpastatin. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 2679-2686, 1996.

EDMUNDS, T., NAGAINIS, P.A., SATHE, S.K., THOMPSON, V.F. and GOLL, D.E. Comparison of the autolysed and unautolysed forms of  $\mu$ - and m-calpain from bovine skeletal muscle. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1077, p. 197-208, 1991.

FELÍCIO, P. E. A carne de Nelore para o consumidor. In: SEMINÁRIO MANAH. O NELORE PARA CARNE, 5., 1995, Brotas. **Anais. Brotas. Fazenda Mundo Novo**, 1995. p. 11.

FRIES, L. A. Precocidade, precocidade, precocidade. In: SEMINÁRIO NACIONAL: REVISÃO DE CRITÉRIOS DE JULGAMENTO E SELEÇÃO EM GADO DE CORTE, 1996, Uberaba. **Anais. Uberaba**. 1996.

FUMAGALLI, L.; BUSINARO, R.; NORI, S. L.; TOESCA, A.; POMPILI, E.; EVANGELISTI, E.; GIANNETTI, S.; IPPOLITI, F.; DE RENZIS, G. Protease inhibitors in mouse skeletal muscle: tissue-associated components of serum inhibitors and calpastatin. **Cellular and Molecular Biology**, v. 42, n. 4, p. 535-546, 1996.

GALLINGER, M.M.; MARCELIA, M.; GARCIA, P.T.; LASTA, J.; ZANELLI, M. & GONZALEZ, B. Meat quality of zebu cross-breds: sensory and mechanical evaluation. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY, 38., 1992, Clermont-Ferrand. **Proceedings. Clermont-Ferrand**. 1992. p. 45-48.

GEESINK, G. H.; GOLL, D. E. Measurement of calpain activity in postmortem muscle extracts underestimates levels of  $\mu$ -calpain. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT

- SCIENCE AND TECHNOLOGY, 41., 1995, San Antonio. **Proceedings**. San Antonio. 1995. p. 537.
- GOLL, D. E.; GEESINK, G. H.; TAYLOR, R. G.; THOMPSON, V. F. Does proteolysis cause all postmortem tenderization, or are changes in the actin/myosin interaction involved? In: INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY, 41., 1995, San Antonio. **Proceedings**. San Antonio. 1995. p. 537.
- GOLL, D.E.; OTSUKA, Y.; NAGAINIS, P.A.; SHANNON, J.D.; SATHE, S.K.; MUGURUMA, M. Role of muscle proteinases in maintenance of muscle integrity and mass. **Journal of Food Biochemistry**, v. 7, p. 137 - 177, 1983.
- GOLL, D.E.; THOMPSON, V.F.; TAYLOR, R.G.; CHRISTIANSEN, J.A. Role of the calpain system in muscle growth. **Biochimie**, v. 74, p. 225 - 237, 1992.
- GREEN, R. D.; COCKETT, N. E.; TATUM, J. D.; O'CONNOR, S. F.; HANCOCK, D. L.; SMITH, G. C. Association of a Taq1 calpastatin polymorphism with post mortem measures of beef tenderness in *Bos taurus* and *Bos indicus-Bos taurus* steers and heifers. **Journal of Animal Science**, v. 74, suppl. 1, p. 111, 1996.
- van den HEMEL-GROOTEN, H. N. A.; te PAS, M. F. W.; van den BOSCH, T. J.; GARSSSEN, G. J.; SCHREURS, V. V. A. M.; VERSTEGEN, M. W. A. mRNA levels of the calpain system in longissimus muscle of young pigs during prolonged feeding of a protein-free diet. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 968-974, 1997.
- HUFF-LONERGAN, E.; LONERGAN, S.M. Postmortem protein degradation and calpastatin activity in top loin steaks from

- Brangus cattle. **Journal of Animal Science**, v. 75, suppl. 1, p. 176, 1997.
- HUFF-LONERGAN, E.; MITSUHASHI, T.; BEEKMAN, D. D.; PARRISH, Jr., F. C.; ROBSON, R. M. Proteolysis of specific muscle structural proteins by  $\mu$ -calpain at low pH and temperature is similar to degradation in post mortem bovine muscle. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 993-1008, 1996.
- HUFFMAN, K. L.; MILLER, M. F.; HOOVER, L. C.; WU, C. K.; BRITTIN, H. C.; RAMSEY, C. B. Effect of beef tenderness on consumer satisfaction with steaks consumed in home and restaurant. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 91-97, 1996.
- JOHNSON, P. Calpains (intracellular calcium-activated cysteine proteinases): structure-activity relationships and involvement in normal and abnormal cellular metabolism. **International Journal of Biochemistry**, v. 22, n 8, p. 811-822, 1990.
- JUDGE, M.; ABERLE, E. D.; FORREST, J. C.; HEDRICK, H. B.; MERKEL, R. A. (Ed.) **Principles of Meat Science**. Dubuque: Kendall/Hunt, 1989. 351 p.
- KILLEFER, J.; KOOHMARAIE, M. Bovine skeletal muscle calpastatin: cloning, sequence analysis and steady-state mRNA expression. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 606-614, 1994.
- KOOHMARAIE, M. Role of endogenous proteases in meat tenderness. In: ANNUAL RECIPROCAL MEAT CONFERENCE, 1988, Laramie. **Proceedings**. Laramie. 1988. p. 89.
- KOOHMARAIE, M. Quantification of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent protease activities by hydrophobic and ion-exchange chromatography. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 659-665, 1990a.

- KOOHMARAIE, M. Inhibition of postmortem tenderization in ovine carcasses through infusion of zinc. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 1476-1483, 1990b.
- KOOHMARAIE, M. Role of the neutral proteinases in post mortem muscle protein degradation and meat tenderness. In: RECIPROCAL MEAT CONFERENCE PROCEEDINGS, 45, p. 63-71, 1992a.
- KOOHMARAIE, M. The role of  $Ca^{2+}$ -dependent proteinases (calpains) in post mortem proteolysis and meat tenderness. **Biochimie**, v. 74, p. 239-245, 1992b.
- KOOHMARAIE, M. Muscle proteinases and meat ageing. **Meat Science**, v. 36, p. 93-104, 1994.
- KOOHMARAIE, M. The biological basis of meat tenderness and potential genetic approaches for its control and prediction. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY, 41., 1995, San Antonio. **Proceedings**. San Antonio, 1995.
- KOOHMARAIE, M. Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. **Meat Science**, v. 43, n. S, p. S193-S201, 1996.
- KOOHMARAIE, M.; KILLEFER, J.; BISHOP, M. D.; SHACKELFORD, S. D.; WHEELER, T. L.; ARBONA, J. R. Calpastatin-based methods for predicting meat tenderness. In: OUALI, A.; DEMEYER, D.; SMULDERS, F. (Ed.). **Expression of muscle proteinases and regulation of protein degradation as related to meat quality**. Nijmen: Audet Tijdschriften, 1995<sup>a</sup>. p. 395-412.
- KOOHMARAIE, M.; SHACKELFORD, S. D.; WHEELER, T. L.; LONERGAN, S. M.; DOUMIT, M. E. A muscle hypertrophy

- condition in lamb (callipyge): characterization of effects on muscle growth and meat quality traits. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 3596-3607, 1995b.
- KOOHMARAIE, M.; SHACKELFORD, S. D.; WHEELER, T. L. Effect of a  $\mu$ -adrenergic agonist ( $L_{644, 969}$ ) and male sex conditions on muscle growth and meat quality of callipyge lambs. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 70-79, 1996.
- KOOHMARAIE, M.; SHACKELFORD, S. D.; WHEELER, T. L. A base biológica da maciez da carne bovina e abordagens potenciais para seu controle e previsão. In: REPENSANDO A PECUÁRIA DE CORTE. "EXPERIÊNCIAS INTERNACIONAIS", 1998, São Paulo. **Anais**. São Paulo: Fundepc, 1998. p. II 94.
- KOOHMARAIE, M.; WHEELER, T. L.; SHACKELFORD, S. D. Eliminating inconsistent beef tenderness with calcium-activated tenderization. In: NEBRASKA CATTLEMAN ASSOCIATION WORKSHOP, 1993, Kearney. **Proceedings**. Kearney, 1993.
- LAWRIE, R. A. **Meat Science**. Oxford: Pergamon, 1974. 2. Ed., 419p.
- LOCKER, R. H.; HAGYARD, C.J. A cold shortening effect in beef muscles. **Journal of Food Science and Agriculture**, v. 14, p. 787.
- LONERGAN, S. M.; ERNST, C. W.; BISHOP, M. D.; CALKINS, C. R.; KOOHMARAIE, M. Relationship of Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP) at the bovine calpastatin locus to calpastatin activity and meat tenderness. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 3608-3612, 1995.
- MARSH, B.B. Symposium: The basis of quality in muscle foods. The Basis of Tenderness in Muscle Foods. **Journal of Food**

- Science**, v. 42, n. 2, p. 295-297, 1977.
- MELLGREN, R. L.; CARR, T. C. The protein inhibitor of calcium-dependent proteases: purification from bovine heart and possible mechanisms of regulation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 225, n.2, p. 779-786, 1983.
- MELLONI, E. and PONTREMOLI, S. The Calpains. **TINS**, v. 12, n. 11, p. 438-443, 1989.
- MILLER, R. K. United States initiatives to reduce variability in beef and pork eating quality. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY, 43., 1997, Auckland. **Proceedings**. Auckland, 1997. p. 52.
- O'CONNOR, S. F.; TATUM, J. D.; WULF, D. M.; GREEN, R. D.; SMITH, G. C. Genetic effects on beef tenderness in *Bos indicus* composite and *Bos taurus* cattle. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 1822-1830, 1997.
- PARRISH, Jr., F. C.; OLSON, D. G.; MINER, B. E.; RUST, R. E. Effect of degree of marbling and internal temperature of doneness on beef rib steaks. **Journal of Animal Science**, v. 37, n. 2, p. 430-434, 1973.
- PIÑEDA, N. Como destruir a imagem de um produto. **Vet. Bras. Reprod. Anim.**, v. 22, n. 1, p. 14-21, 1998.
- POMPILI, E.; PANTANALI, F.; DELI, R.; DE RENZIS, G. Studio immunochimico ed immunoistochimico della calpastatina, inibitore endogeno delle calpaine, nel muscolo massetere di coniglio. **Minerva Stomatologica**, v. 44, p. 397-402, 1995.
- PONTREMOLI, S., VIOTTI, P.L., MICHETTI, M., SALAMINO, F., SPARATORI, B.; MELLONI, E. Modulation of inhibition efficiency of rat skeletal muscle calpastatin by phosphorylation.

**Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 187, n. 2, p. 751-759, 1992.

PRINGLE, T. D.; WILLIAMS, S. E.; LAMB, B. S.; JOHNSON, D. D. WEST, R. L. Carcass characteristics, the calpain proteinase system, and aged tenderness of Angus and Brahman crossbred steers. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 2955-2961, 1997.

RÜBENSAM, J.M.; FELÍCIO, P.E. de; TERMIGNONI, C. Influência do genótipo *Bos indicus* na atividade de calpastatina e na textura da carne de novilhos abatidos no Sul do Brasil. **Ciênc. E Tecnol. Alim.**, 18 (4): 405-409, 1998.

SANTIAGO, A. A. **O Gado Nelore**. São Paulo: Instituto de Zootecnia de São Paulo. Secretaria da Agricultura, 1972. 556 p.

SALAMINO, F., SPARATORI, B., MELLONI, E., MICHETTI, M., VIOTTI, P.L., PONTREMOLI, S.; CARAFOLI, E. The plasma membrane calcium pump is the preferred calpain substrate within the erythrocyte. **Cell Calcium**, v. 15, p. 28-35, 1994.

SHACKELFORD, S.D.; KOOHMARAIE, M.; MILLER, M.F. CROUSE, J.D.; REAGAN, J.O. An evaluation of tenderness of the longissimus muscle of Angus by Hereford versus Brahman crossbred heifers. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 171-177, 1991.

SHACKELFORD, S.D.; KOOHMARAIE, M.; CUNDIFF, L.V. GREGORY, K.E.; ROHRER, G.A.; SAVELL, J.W. Heritabilities and phenotypic and genetic correlations for bovine *post rigor* calpastatin activity, intramuscular fat content, Warner Bratzler shear force, retail product yield and growth rate. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 857 - 863, 1994.

SHERBECK, J.A.; TATUM, J.D.; FIELD, T.G.; MORGAN, J.B. SMITH, G.C. Feedlot performance, carcass traits and

palatability traits of Hereford and Hereford x Brahman steers. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 3613-3620, 1995.

SHERBECK, J.A.; TATUM, J.D.; FIELD, T.G.; MORGAN, J.B. & SMITH, G.C. Effect of phenotypic expression of Brahman breeding on marbling and tenderness traits. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 304-309, 1996.

SMITH, G. C.; SAVELL, J. W.; CLAYTON, R. P.; FIELD, T.G.; GRIFFIN, D. B.; HALE, D. S.; MILLER, M.F.; MONTGOMERY, T. H.; MORGAN, J. B.; TATUM, J. D.; WISE, J. W. THE FINAL REPORT OF THE NATIONAL BEEF QUALITY AUDIT, Colorado St. Univ., Ft. Collins, and Texas A&M Univ., College Station. 1992.

SORIMACHI, H.; SAIDO, T. C.; SUZUKI, K. New era of calpain research: Discovery of tissue-specific calpains. **FEBS Letters**, v. 343, p. 1-5, 1994.

SZCZESNIAK, A. S. Sensory texture evaluation methodology. In: ANNUAL RECIPROCAL MEAT CONFERENCE, 39., 1986, Chicago. **Proceedings**. Chicago, 1986. p. 86.

TAKAHASHI-NAKAMURA, M.; TSUJI, S.; SUZUKI, K.; IMAHORI, K. Purification and characterization of an inhibitor of calcium-activated neutral protease from rabbit skeletal muscle. **Journal of Biochemistry**, v. 90, p. 1583-1589, 1981.

TAKANO, E.; KITAHARA, A.; KANNAGI, R.; MURACHI, T. Enzyme immunoassay of calpain I and calpastatin and its application to the analysis of human erythrocyte hemolysate. **Journal of Applied Biochemistry**, v. 6, p. 117-125, 1984.

TAYLOR, R. G.; GEESINK, G. H.; THOMPSON, V. F.; KOOHMARAIE, M.; GOLL, D. E. Is Z-disk degradation

- responsible for postmortem tenderization? **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 1351-1367, 1995.
- YEATES, N. T. M. **Avances en Zootecnia**. Zaragoza: Acribia, 1967. 432 p.
- YOSHIMURA, N.; TSUKAHARA, I.; MURACHI, T. Calpain and calpastatin in porcine retina. **Biochemistry Journal**, v. 223, p. 47-51, 1984.
- YOSHIZAWA, T.; SORIMACHI, H.; TOMIOKA, S.; ISHIURA, S.; SUZUKI, K. Calpain dissociates into subunits in the presence of calcium ions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 208, n. 1, p. 376-383, 1995.
- YU, L.P. and LEE, Y.B. Effects of postmortem pH and temperature on bovine muscle structure and meat tenderness. **Journal of Food Science**, v. 51, n. 3, p. 774-780, 1986.
- WARKUP, C. The development of "Blueprint" specifications for improved meat quality. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY, 43., 1997, Auckland. **Proceedings**. Auckland, 1997. p. 26.
- WHEELER, T.L., CUNDIFF, L.V., KOCH, R. M. Effect of marbling degree on beef palatability in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 3145-3151, 1994.
- WHEELER, T.L.; SAVELL, J.W.; CROSS, H.R.; LUNT, D.K.; SMITH, S.B. Effect of postmortem treatments on the tenderness of meat from Hereford, Brahman and Brahman-cross beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 3677-3683, 1990a.
- WHEELER, T.L.; SAVELL, J.W.; CROSS, H.R.; LUNT, D.K.; SMITH, S.B. Mechanisms associated with the variation in tenderness of meat from Brahman and Hereford cattle. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 4206-4220, 1990b.

- WHIPPLE, G.; KOOHMARAIE, M.; DIKEMAN, M.E.; CROUSE, J.D.; HUNT, M.C.; KLENN, R.D. Evaluation of attributes that affect longissimus muscle tenderness in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 2716 - 2728, 1990a.
- WHIPPLE, G.; KOOHMARAIE, M.; DIKEMAN, M.E.; CROUSE, J.D. Predicting beef-longissimus tenderness from various biochemical and histological muscle traits. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 4193-4199, 1990b.
- WULF, D. M.; TATUM, J. D.; GREEN, R. D.; MORGAN, J. B.; GOLDEN, B. L.; SMITH, G. C. Genetic influences on beef longissimus palatability in Charolais- and Limousin-sired steers and heifers. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 2394-2405, 1996.