



Abundância de RNA do sistema calpaínas-calpastatina, genes relacionados à qualidade da carne de ruminantes: uma revisão

Isabella Guartieri da Silva¹; Lorraine Pissinin Dutra²; Ines Cristina Giometti³; Calie Castilho⁴; Gabriella Capitane Sena⁵; Leticia Jalloul Guimarães⁶; Natália Carolina Vieira⁷; Quêzia Hadassa Machado Leite⁸; Maria Fernanda Gibim⁹; Isadora de Souza e Silva¹⁰; Fabiola Cristine De Almeida Rêgo¹¹; Marilice Zundt¹²

Como Citar:

DA SILVA, Isabella Guartieri; DUTRA, Lorraine Pissinin; GIOMETTI, Ines Cristina et al. Abundância de RNA do sistema calpaínas-calpastatina, genes relacionados à qualidade da carne de ruminantes: uma revisão. Revista Sociedade Científica, vol.7, n. 1, p.4796-4825, 2024. <https://doi.org/10.61411/rsc202481517>

DOI: 10.61411/rsc202481517

Área do conhecimento: Biologia Molecular.

Palavras-chaves: μ -Calpaína; Calpastatina; m-Calpaína; *Ovis aries*; RT-qPCR

Publicado: 16 de outubro de 2024.

Resumo

As exigências do mercado consumidor com a carne ovina têm aumentado e visando atender essas demandas, a produção deve ser otimizada de modo complexo, sendo que os atributos qualitativos possuem muitas variáveis, influenciados principalmente pela genética, e outros fatores como nutrição e manejo pré e pós-abate. A maciez é o principal atributo considerado pelos consumidores e durante o processo de amaciamento da carne, há ação de genes específicos que determinam o resultado. Esses genes ativam o sistema enzimático das calpaínas-calpastatina, que é formado por duas calpaínas: μ -calpaína e m-calpaína, que desempenham um papel importante nos principais processos intracelulares. Com ênfase na reestruturação do citoesqueleto, regulação do ciclo celular, apoptose e formação de tecido muscular. Em contrapartida o gene CAST inibe as calpaínas e também influencia na produção, maciez e qualidade da carne. Portanto, a análise do RNA é um passo necessário na preparação de métodos como RT-qPCR. Pesquisas mostram que há anos a ação do complexo calpaínas-calpastatina atua diretamente na proteólise muscular, na transformação do músculo em carne, tornando-se responsável pela sua qualidade, porém mais pesquisas são sugeridas sobre o nível de

¹Unoeste. Presidente Prudente. Brasil. ✉

²Unoeste. Presidente Prudente. Brasil. ✉

³Unoeste. Presidente Prudente. Brasil. ✉

⁴Unoeste. Presidente Prudente. Brasil. ✉

⁵Unoeste. Presidente Prudente. Brasil. ✉

⁶Unoeste. Presidente Prudente. Brasil. ✉

⁷Unoeste. Presidente Prudente. Brasil. ✉

⁸Unoeste. Presidente Prudente. Brasil. ✉

⁹Unoeste. Presidente Prudente. Brasil. ✉

¹⁰Unoeste. Presidente Prudente. Brasil. ✉

¹¹Unoeste. Presidente Prudente. Brasil. ✉

¹²Unoeste. Presidente Prudente. Brasil. ✉



abundância de RNA para os genes CAPN1, CAPN2 e CAST, especialmente em ovinos.

Calpains-calpastatin system RNA abundance, genes related to ruminant meat quality: a review

Abstract

The consumer market demands for lamb meat have increased and to meet these demands, production must be optimized in a complex way, and the qualitative attributes have many variables, influenced mainly by genetics, and other factors such as nutrition and pre- and post-slaughter processing. The tenderness is the main attribute considered by consumers and during the meat tenderizing process, there is the action of specific genes that determine the final result. These genes activate the calpain-calpastatin enzymatic system, which is formed by two calpains: μ -calpain and m-calpain, which play an important role in the main intracellular processes. With emphasis on cytoskeleton restructuring, cell cycle regulation, apoptosis, and muscle tissue formation. In contrast, the CAST gene inhibits calpains and also influences the production, tenderness and quality of the meat. Therefore, RNA analysis is a necessary step in the preparation of methods such as RT-qPCR. Studies have shown for years that the calpain-calpastatin complex acts directly in muscle proteolysis, in the transformation of muscle into meat, becoming responsible for its quality, however, more investigations are suggested about the level of RNA abundance for CAPN1, CAPN2 and CAST genes, especially in ovines.

Keywords: μ -Calpaína. Calpastatina. m-Calpaína. *Ovis aries*. RT-qPCR.

1. Introdução

O desenvolvimento de estratégias para agregar valor e diferenciar a carne ovina, com o objetivo de atender às crescentes demandas dos consumidores, representa uma importante oportunidade para o sistema agroindustrial ovino [1]. A qualidade da carne é



um conceito multifatorial, influenciado por diversas variáveis, incluindo genética, nutrição, sanidade e manejo pré e pós-abate. Entre essas variáveis, a maciez destaca-se como uma das características mais apreciadas pelo consumidor final [2].

Assim, a avaliação da qualidade da carne por meio de testes químicos e físicos tem se tornado cada vez mais comum nas pesquisas, constituindo uma ferramenta essencial para orientar a escolha da dieta fornecida aos animais. A dieta influencia diretamente a composição da carne, e animais que recebem maiores proporções de concentrados tendem a apresentar carne com maior teor de gordura, o que, por sua vez, eleva a suculência e a percepção de maciez [3] [4].

Boas práticas de manejo são capazes de melhorar tanto o desempenho quanto o bem-estar animal. Contudo, para otimizar esses resultados, é fundamental compreender a estrutura e função dos genes associados à maciez da carne, bem como sua interação com fatores não genéticos dos sistemas de produção, como nutrição e ambiente [5]. Esse conhecimento pode ser decisivo para alcançar resultados mais precisos e atender à crescente demanda global por carne de qualidade [6]. Assim, o sistema proteolítico calpaína-calpastatina, intimamente ligado à maciez da carne, tem sido investigado em nível de miRna [7].

Compreender a ativação e a ação do complexo enzimático calpaína/calpastatina é crucial, pois esse sistema desempenha um papel fundamental na degradação pós-morte das proteínas miofibrilares e na maciez da carne durante o armazenamento [8]. As calpaínas atuam degradando proteínas como titina, nebulina, desmina, troponina e tropomiosina, o que resulta no enfraquecimento da interação entre o filamento fino e o disco Z, ambos constituintes do sarcômero, que é a unidade básica do músculo estriado. Esse processo contribui para a transformação do músculo em carne [9] [10].

A nutrição é um dos fatores que podem influenciar o desempenho das enzimas do sistema calpaína/calpastatina, uma vez que está intimamente ligada à expressão dos genes que regulam esse sistema [11]. A ingestão de determinados alimentos pode



bloquear ou ativar a expressão gênica ao longo da vida do indivíduo, e esses processos podem ser monitorados por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), uma ferramenta essencial para a investigação do RNA tecidual. Além disso, a PCR também é amplamente utilizada para diagnósticos em animais e plantas, sendo aplicada em áreas como forense e melhoramento genético, entre outras [12].

O protocolo RT-qPCR, como é conhecido no meio científico, permite a análise quantitativa direta da expressão relativa do RNA, sendo de extrema importância, devido à sensibilidade do gene, que o material da amostra seja de alta qualidade, ou seja, que o RNA não seja degradado ou fragmentado [13]. Portanto, a qualidade do RNA dependerá do ambiente de extração e dos protocolos de coleta utilizados. Após essas adições, a extração do RNA é uma etapa necessária na preparação de métodos para RT-qPCR [14].

Essa abordagem genética e proteômica é atualmente necessária para obter informações sobre os mecanismos relacionados à amaciamento da carne [15], característica de extrema importância segundo o consumidor nacional e segundo pesquisa realizada por [16], avaliando preferências no consumo de carne ovina.

Ao longo desta revisão, serão apresentados diferentes aspectos moleculares relacionados à qualidade da carne, como a ação do sistema calpaína-calpastatina, o papel das caspases e a utilização do RT-qPCR para análise da expressão gênica. Cada um desses tópicos está interconectado, refletindo como os processos moleculares pós-abate e a expressão de genes específicos contribuem para características sensoriais e funcionais da carne, como a maciez.

2. **Qualidade da carne**

Os consumidores estão desenvolvendo novos hábitos em relação ao consumo de carne de cordeiro e seus derivados. Para garantir uma boa aceitação desse produto, é essencial produzir animais que atendam às exigências do mercado, seguindo padrões de qualidade específicos [17]. A qualidade da carne envolve diversos fatores inter-relacionados, que dependem de todas as etapas da cadeia produtiva, além do modo



como o produto é preparado e consumido, destacando a importância de um foco constante no consumidor final.

Entre os fatores que influenciam a aceitabilidade da carne ovina, além dos métodos de produção, estão as características físico-químicas [18]. Um exemplo é o processo de saturação da gordura, que ocorre à medida que o animal envelhece até o abate. Esse processo impacta diretamente o mercado, pois altera o sabor e o aroma da carne, levando os consumidores a desenvolverem uma percepção negativa ao consumir carne de animais mais velhos [19] [20].

Além dessas influências pré-abate, a qualidade final da carne também depende de processos que ocorrem no período post mortem. A maioria das reações que definem a maciez e outras qualidades sensoriais da carne inicia-se após a morte do animal, quando a circulação sanguínea é interrompida, resultando em uma série de alterações bioquímicas no tecido muscular [21]. Esses processos incluem o rigor mortis, que marca a transformação do músculo em carne, e a subsequente degradação proteolítica, que modifica a arquitetura das proteínas estruturais, contribuindo para a maciez da carne [22].

Um fator importante nesses processos é a acidificação do músculo devido à queda do pH no período post mortem. Esse ambiente ácido, com pH em torno de 5,7, ativa as calpaínas, enzimas responsáveis por continuar o processo de amaciamento da carne. Essas enzimas permanecem ativas por aproximadamente 16 horas, desempenhando um papel crucial na manutenção da maciez ao longo do armazenamento [23] [24].

Para a carne de cordeiro, espera-se que o pH final esteja entre 5,5 e 5,8, próximo ao ponto isoelétrico das proteínas [25]. Nesse estágio, a ausência de força atrativa entre as fibras musculares, causada pela neutralização das cargas positivas e negativas, favorece o distanciamento entre os miofilamentos que compõem o tecido muscular [26]. Esse aumento no comprimento dos sarcômeros resulta diretamente em uma carne mais



macia. Além disso, a queda rápida de temperatura e pH após o abate acelera as alterações bioquímicas post mortem e intensifica a ação das enzimas proteolíticas sobre os atributos sensoriais da carne [27].

Manter os valores de pH da carne de cordeiro dentro dessa faixa ideal também indica que o abate foi realizado seguindo os padrões adequados de bem-estar animal. Quando essas condições são respeitadas, ocorre o correto desenvolvimento do rigor mortis, que ativa de forma eficiente o sistema calpaína, essencial para o processo de amaciamento da carne [28] [29].

No entanto, a calpastatina, um inibidor natural das calpaínas, desempenha um papel fundamental ao inativar essas enzimas, limitando a degradação das proteínas miofibrilares durante a maturação e, conseqüentemente, reduzindo a maciez da carne e a ação da calpastatina está diretamente relacionada à velocidade de refrigeração: quando o resfriamento é retardado, a ativação da calpastatina também é postergada [30].

Esse atraso na ativação é mais pronunciado em animais com maior deposição de gordura subcutânea, que atua como isolante térmico. Assim, as calpaínas, responsáveis pelo amaciamento da carne, mantêm sua atividade por mais tempo em temperaturas mais elevadas, enquanto a calpastatina demora mais para exercer sua função inibitória [23] [31].

Dessa forma, o sistema de produção, incluindo a alimentação dos animais, exerce um impacto significativo sobre os aspectos qualitativos da carne, uma vez que afeta diretamente as taxas de crescimento e deposição de gordura. Animais terminados em confinamento, por exemplo, tendem a apresentar maior deposição de gordura em comparação com aqueles terminados a pasto [32] [33]. Esse maior acúmulo de gordura favorece a maciez da carne, devido à ação prolongada das calpaínas, ativadas pelos genes CAPN1 e CAPN2, como mencionado anteriormente, corroborando a importância do manejo alimentar para a qualidade final do produto.



Embora já seja bem estabelecido que a nutrição animal influencia a atividade de enzimas como as calpaínas, ainda há incertezas sobre o quanto a dieta afeta a expressão de genes como CAPN1, CAPN2 e CAST. Estudos mostram que dietas ricas em concentrados e pobres em fibras podem acelerar o processo de crescimento muscular, resultando em maior deposição de gordura, o que pode, por sua vez, modificar a atividade dessas enzimas. No entanto, ainda não é claro se esses mesmos planos nutricionais alteram significativamente a expressão gênica desses marcadores moleculares.

3. μ -calpaína e m-calpaína: Enzimas fatoradas com cálcio ativadas pelos genes CAPN1 e CAPN2

Durante o processo de amaciamento da carne, o enfraquecimento e desaparecimento dos discos Z nos sarcômeros musculares, que delimitam a unidade funcional das miofibrilas, têm sido associados ao sistema calpaína-calpastatina, especialmente quando suplementado com cálcio (Ca^{2+}). Esse sistema desempenha um papel essencial na degradação das proteínas estruturais do músculo, promovendo o amaciamento da carne [34] [11].

Segundo [35], a identificação e o isolamento de uma protease ativada por Ca^{2+} , que remove os discos Z e promove a ruptura dos filamentos contráteis do músculo, revelaram a atividade enzimática endógena na dissociação da actomiosina. Esse processo é intensificado pelo fornecimento de calor, o que destaca a necessidade de compreender como diferentes tratamentos afetam a dissociação de proteínas específicas.

O sistema enzimático calpaína-calpastatina é composto por duas principais calpaínas: μ -calpaína e m-calpaína. A μ -calpaína é mais sensível à presença de Ca^{2+} , e sua ativação e autólise desempenham um papel crucial em diversos processos intracelulares, incluindo a reestruturação do citoesqueleto, a regulação do ciclo celular, a apoptose e a formação de tecido muscular [36]. Esses processos são fundamentais para o desenvolvimento muscular e têm impacto direto na qualidade final da carne.



Diferentemente de muitas proteases, as calpaínas não degradam totalmente suas proteínas-alvo; em vez disso, realizam clivagens em locais específicos, modulando suas funções [37] [38]. Elas são classificadas como proteases neutras, atuando de forma mais eficiente em pH neutro (7,0 a 7,5) e em temperaturas entre 10°C e 25°C. Além disso, a atividade das calpaínas é dependente de concentrações de cálcio que variam entre níveis micromolares e milimolares, destacando a importância do Ca²⁺ na regulação de suas funções [39].

Essas alterações promovidas pelas calpaínas nas estruturas miofibrilares levam à redução da rigidez muscular e, como consequência, ao aumento gradual da maciez da carne [40]. Após a morte do animal, quando as reservas de ATP no músculo se esgotam, o Ca²⁺ não pode mais ser transportado para o retículo sarcoplasmático, o que aumenta sua concentração intracelular. Esse aumento, juntamente com a acidificação da célula devido à queda no pH, ativa as calpaínas, desencadeando o processo de amaciamento da carne.

Estudos confirmam que as μ -calpaínas são ativadas em um intervalo de pH entre 6,8 e 5,7, enquanto as m-calpaínas são ativadas em um pH próximo a 5,7 [41]. No entanto, há evidências de que em pH entre 5,5 e 5,8 a μ -calpaína se torna inativa, tornando essencial a avaliação simultânea das atividades das calpaínas 1 e 2 para obter uma compreensão mais específica de seus papéis no processo de amaciamento da carne [42].

Em estudos com ovelhas de diferentes idades, [43] observaram uma maior expressão do gene CAPN2 na carne de cabras pós-púberes em comparação com a de cabritos recém-desmamados. Em relação ao gene CAPN1, a expressão foi semelhante entre os grupos experimentais, tanto nas cabras recém-desmamadas quanto nas pós-desmamadas. Esses resultados indicam que a idade pode influenciar a expressão de genes envolvidos no sistema calpaína-calpastatina, o que impacta diretamente a qualidade da carne.



Os autores sugerem que animais jovens apresentam uma menor taxa de proteólise, o que está alinhado com sua maior taxa de crescimento muscular. Esse crescimento é atribuído, em parte, à diminuição da degradação de proteínas, resultado do aumento da atividade da calpastatina, que inibe a ação das calpaínas e, conseqüentemente, reduz a degradação das proteínas miofibrilares [43] [44].

[45] e [46] explicam que a atividade da calpastatina pode ser aumentada em estados de sarcopenia, como consequência do avanço da idade, com o objetivo de controlar a atividade das calpaínas. Entretanto, não há evidências diretas dessas atividades em bovinos e ovinos, pois esses animais são geralmente abatidos antes de atingirem a velhice, o que limita a investigação dessas enzimas em fases mais avançadas da vida.

Nesse contexto, a literatura afirma que animais criados a pasto, especialmente em sistemas mais extensivos, onde são abatidos em idade mais avançada em comparação com animais criados em confinamento, tendem a produzir carne com menor maciez [47] [48] [49]. Essa redução na maciez pode estar relacionada à menor atividade proteolítica das calpaínas nesses animais, uma vez que a maior idade ao abate favorece o aumento da atividade da calpastatina, inibindo a degradação das proteínas miofibrilares.

Em um estudo com bovinos Braford criados sob diferentes planos nutricionais — pasto e pasto suplementado com silagem de milho a 1% do peso vivo por dia — foi observada uma diferença significativa na abundância de RNA do gene CAPN1 entre os diferentes músculos analisados, de acordo com a dieta fornecida. A expressão do gene CAPN1 foi maior no músculo *Longissimus dorsi* dos animais suplementados. No entanto, não foi encontrada diferença significativa na expressão do gene CAPN2 no mesmo estudo [50].



De acordo com [7], é possível testar os efeitos de uma determinada condição experimental na expressão gênica, permitindo uma visão integrada das mudanças que ocorrem em grupos específicos de genes. Isso possibilita uma compreensão mais ampla dos estágios de desenvolvimento e da forma como uma espécie metaboliza os componentes de uma formulação nutricional. Em experimentos com nutrição, esses dados são essenciais para avaliar como diferentes dietas podem influenciar a expressão de genes como CAPN1 e CAPN2, impactando diretamente a qualidade da carne.

4. **Calpastatina**

O gene da calpastatina (CAST) desempenha um papel significativo nas características de crescimento e nas propriedades da carcaça. Sua função principal é ativar a enzima calpastatina que inibe as calpaínas, que degradam a proteína muscular, influenciando diretamente o rendimento, a maciez e a qualidade final da carne [51]. A calpastatina é um membro bem caracterizado do sistema calpaína-calpastatina, inibindo especificamente a atividade proteolítica da μ -calpaína e m-calpaína. A quantidade e a ação da calpastatina no músculo do animal são fatores determinantes na maciez da carne [52].

O sistema calpaína-calpastatina, como todas as proteínas, resulta de sua expressão em nível celular, onde o gene é transcrito em RNA mensageiro e posteriormente traduzido em proteína [53] [54]. A quantidade de calpaína ou calpastatina no tecido muscular pode variar conforme a expressão de seus genes codificadores. No entanto, a quantidade de mRNA expressa nem sempre reflete a quantidade de proteína produzida, devido a regulações pós-traducionais [2]. Isso pode gerar variações nas quantidades de calpaína e calpastatina presentes no período post mortem, afetando o processo de amaciamento da carne.

Além disso, o pH abaixo do ideal pode inibir a atividade enzimática e causar um encurtamento excessivo das fibras musculares, resultando em uma carne mais dura e com menor capacidade de retenção de água. Esse efeito ocorre porque as sequências



helicoidais da calpastatina impedem que as calpaínas se liguem às membranas, prejudicando a maciez do músculo vivo. A ação aumentada da calpastatina também reduz a degradação das proteínas musculares, impactando negativamente a maciez final da carne [55].

O cálcio (Ca^{2+}) é essencial para que a calpastatina se ligue e iniba as calpaínas [56]. A ligação entre a calpastatina e as calpaínas é reversível, e a quantidade de cálcio necessária para essa ligação depende da conformação da molécula de calpaína. Curiosamente, a quantidade de cálcio requerida para a ligação calpaína-calpastatina é significativamente menor do que a necessária para iniciar a atividade proteolítica das catepsinas, que degradam proteínas miofibrilares e atuam sobre o colágeno durante a maturação muscular.

Diante desse cenário, a nutrição também pode influenciar a expressão do gene da calpastatina (CAST) [57]. Carcaças com menor deposição de gordura, devido à menor sensibilidade ao frio, e o abate de animais mais jovens impactam a ação geral do sistema calpaína-calpastatina. Esse sistema, regulado pelos genes CAPN1, CAPN2 e CAST, desempenha um papel crucial na determinação da maciez e da qualidade final da carne, mostrando como a nutrição e o manejo dos animais podem modular a atividade dessas enzimas e, conseqüentemente, influenciar os resultados da produção.

5. **Disparo e ativação da Caspase 3**

O período post mortem desempenha um papel crucial na fragmentação da estrutura muscular, afetando diretamente a maciez e a capacidade de retenção de água da carne. No entanto, a proteólise por si só pode explicar apenas uma parte limitada das variações na qualidade do músculo [58] [59]. Estudos de [60] e [52] sugerem que a caspase 3 ativa está associada à degradação de proteínas miofibrilares. A caspase 3 é uma das principais enzimas envolvidas na iniciação e execução da apoptose, um processo fundamental para o desenvolvimento e a manutenção da homeostase tecidual em organismos multicelulares.



As mudanças que ocorrem em células em apoptose são amplamente mediadas por uma cascata enzimática de proteases de cisteína conhecidas como caspases (CASP). As caspases são endoproteases que hidrolisam ligações peptídicas de maneira dependente de resíduos de cisteína catalítica no sítio ativo, e essa reação ocorre apenas após a presença de determinados resíduos de ácido aspártico no substrato [61] [62].

Embora o processamento mediado por caspases possa resultar na inativação de substratos, ele também pode gerar moléculas de sinalização ativas que participam de processos ordenados, como a apoptose. Por essa razão, as caspases foram amplamente classificadas com base em seus papéis na apoptose [63], destacando sua importância em diferentes processos celulares.

Entre as caspases, a caspase 3 é particularmente importante, pois está envolvida na degradação de proteínas miofibrilares e citoesqueléticas, podendo estar relacionada ao processo de amolecimento muscular. Além disso, devido ao seu papel cooperativo com as calpaínas, a caspase 3 também pode contribuir para a renovação muscular [64]. [43] observaram que a expressão da caspase 3 aumenta com a idade do animal, de forma semelhante à proporção calpaína-calpastatina relatada no mesmo estudo, sugerindo uma interação entre esses sistemas no controle da qualidade da carne.

As células expressam seus genes em resposta a mudanças ambientais, especialmente em resposta a moléculas de sinalização extracelular específicas. Quando estimuladas, as células alteram o microambiente ao sintetizar e liberar citocinas, receptores solúveis, enzimas e outras moléculas reguladoras. A resposta celular a esses estímulos depende do contexto e da sequência de sinais que a célula recebe, com múltiplos sinais extracelulares convergindo para influenciar a expressão gênica e, consequentemente, impactando a função celular.

Dado que a expressão gênica é iniciada no nível da transcrição, é amplamente aceito que os destinos celulares são determinados por essa regulação. A ativação celular mediada por citocinas, assim como a própria expressão dessas moléculas sinalizadoras,



depende de uma complexa maquinaria molecular que utiliza a transcrição como a principal via de regulação [65]. Esse mecanismo tem implicações diretas para a modulação de processos como a apoptose e a proteólise, impactando diretamente a qualidade da carne.

Além de clivarem os mesmos substratos que as calpaínas, há evidências de que o sistema calpaína-calpastatina e o sistema caspase interagem e atuam em conjunto [66]. É interessante notar que a calpastatina, o principal inibidor das calpaínas, também é um substrato das caspases, especialmente das caspases 3 e 7 [67]. Dessa forma, se as caspases estiverem ativas no músculo post-mortem, elas podem influenciar a qualidade da carne ao degradar a calpastatina, o que resulta em um aumento na quantidade de calpaínas ativas, favorecendo o processo proteolítico [68].

Essa interação entre os dois sistemas enzimáticos sugere que a ativação das caspases no período post-mortem não apenas regula a apoptose, mas também pode facilitar a degradação proteica ao reduzir a inibição das calpaínas. Esse processo contribui diretamente para o amaciamento da carne, impactando suas características sensoriais e a qualidade final.

Embora a caspase 3 não seja uma protease de cisteína dependente de cálcio, o uso de Ca^{2+} tem sido associado ao aumento da atividade dessa enzima [52]. No contexto das caspases 3 e 7, [69] indicam que essas enzimas são indicadores preferíveis para detectar diferenças que influenciam a qualidade da carne, pois ativam as proteases responsáveis pela transformação muscular. Além disso, esses autores sugerem que a avaliação da apoptose no músculo post-mortem pode representar uma nova abordagem para investigar a influência do manejo animal no metabolismo muscular e na morte celular, com importantes consequências para a qualidade da carne.

Nessa linha, alguns estudos identificaram uma maior expressão da subunidade grande da caspase 3 em amostras de carne bovina do tipo DFD (Dark, Firm, Dry), caracterizadas por uma textura escura, firme e seca, 24 horas após o abate [70]. No



entanto, a maciez da carne pode ser considerada um sistema complexo, com uma intrincada rede de proteínas envolvidas no processo de amaciamento [71] [22] [72], reforçando a importância de uma abordagem multifatorial para compreender plenamente os mecanismos que influenciam essa característica sensorial.

6. RT-qPCR - Genes Endógenos

Para ser considerado um gene normalizador, é necessário que ele apresente uma expressão estável e desregulada no tipo de amostra analisada. Os genes endógenos geralmente atendem a esses critérios, desempenhando um papel crucial na normalização dos resultados experimentais [73]. O uso de um gene normalizador adequado tem grande impacto nos resultados da análise, pois ele deve ter uma expressão significativa e invariável no tecido estudado. Além disso, como a expressão gênica pode ser influenciada por condições metabólicas e fisiológicas, é fundamental avaliar o comportamento desse gene em cada condição experimental [74].

Para que um gene possa ser utilizado como referência, é necessário comprovar sua adequação por meio de experimentos rigorosos, assegurando que ele possua as características necessárias para cumprir sua função de normalização de maneira eficaz [75].

No entanto, é essencial reforçar que a escolha dos genes normalizadores deve ser validada para cada condição experimental específica, uma vez que a expressão desses genes pode variar de acordo com o estado fisiológico ou metabólico dos animais. A seleção de mais de um gene normalizador, como foi feito no estudo de [76] Silva et al. (2023), oferece maior robustez à análise, reduzindo a possibilidade de variações indesejadas nos resultados devido à dependência de um único gene de referência.

Ainda de acordo com [76], foi identificada a combinação dos genes hidroximetilbilanossintase (HMBS) e β -2-microglobulina (B2M) como os normalizadores mais estáveis para a análise da expressão dos genes CASP3, CAPN1, CAPN2 e CAST em músculo de ovinos alimentados com três planos nutricionais



diferentes. Embora os genes HMBS e da proteína de ligação à caixa TATA (TBT) pudessem ser utilizados isoladamente como normalizadores, a combinação de HMBS e B2M foi preferida. Isso ocorre porque o uso de um único gene de referência aumenta a probabilidade de variações na expressão, o que poderia comprometer a confiabilidade dos resultados experimentais.

O uso do gene HMBS como normalizador é particularmente interessante na avaliação da expressão gênica em músculo, pois ele está envolvido no metabolismo da porfirina, um pigmento de origem natural. HMBS atua como um intermediário metabólico na biossíntese do grupo heme, essencial para a produção de hemeproteínas [77]. Entre as hemeproteínas, a hemoglobina é uma das mais conhecidas, responsável pelo transporte de O₂ no sangue e pela cor vermelha característica do sangue. Outro exemplo importante é a mioglobina, uma proteína sarcoplasmática presente nas fibras musculares. As hemeproteínas desempenham funções cruciais, como a ligação e transporte de oxigênio, transferência de elétrons, catálise e sinalização celular [78].

Além disso, o gene B2M desempenha uma função essencial associando-se à proteína HFE, regulando conjuntamente a expressão de hepcidina no fígado. A hepcidina atua sobre o transportador de ferro, ferroportina, presente na membrana basolateral dos enterócitos e na membrana dos macrófagos, promovendo sua degradação. Esse mecanismo reduz a absorção de ferro dos alimentos e diminui a liberação de ferro reciclado dos glóbulos vermelhos pelo sistema fagocítico mononuclear. A perda dessa função pode resultar em acúmulo excessivo de ferro no organismo, levando a condições como a hemocromatose [79].

Por fim, a proteína de ligação da caixa TATA (TBP) é outro gene com potencial para ser usado como normalizador. TBP é um fator de transcrição (TF) que se liga especificamente à sequência de DNA conhecida como caixa TATA, facilitando a transcrição dos genes. Os fatores de transcrição, como a TBP, desempenham um papel crucial ao permitir a ligação da enzima RNA polimerase ao DNA em células



eucarióticas, promovendo a transcrição e, posteriormente, a tradução dos genes [80]. A inclusão de genes como TBP na escolha de normalizadores pode aumentar a precisão na análise da expressão gênica, garantindo maior confiabilidade nos resultados experimentais.

7. **Considerações finais**

Estudos mostram que, há anos, o complexo calpaína-calpastatina tem um papel fundamental na proteólise muscular e na transformação do músculo em carne, sendo responsável pela sua qualidade final. No entanto, a expressão dos genes que codificam essas enzimas ainda apresenta resultados divergentes na literatura. Por exemplo, alguns autores associam uma força de cisalhamento consideravelmente maior à carne de animais que expressam o gene CAST, enquanto carnes de animais que não expressam esse gene tendem a ser mais macias.

Por outro lado, alguns estudos não encontraram relação clara entre a maciez da carne e a expressão de genes responsáveis pela proteólise muscular. Embora seja sabido que a nutrição animal interfere na ação das enzimas, ainda não está totalmente claro se essa mesma nutrição afeta a expressão gênica de CAPN1, CAPN2 ou CAST, o que pode variar de acordo com a espécie animal, o momento do estudo ou, principalmente, a raça.

Uma questão importante que emerge da literatura é a divergência nos resultados relativos à expressão de genes, como CAPN1, CAPN2 e CAST, e sua relação com a maciez da carne. Enquanto alguns autores relatam uma associação direta entre a maior expressão do gene CAST e a resistência à maciez, outros não encontraram essa relação. Essas divergências podem ser explicadas por diversos fatores.

Uma possível explicação é a variação nos métodos experimentais, como a diferença no tipo de amostra de carne utilizada, no momento da análise post-mortem ou no tipo de dieta oferecida aos animais. Além disso, fatores como raça, idade e manejo podem influenciar a expressão gênica, o que sugere a necessidade de estudos mais detalhados que controlem essas variáveis. Essas diferenças também indicam que as

interações entre a genética, nutrição e manejo ainda não são completamente compreendidas e podem ter um impacto maior do que se conhece.

8. **Biografias**



Isabella Guartieri da Silva, Doutoranda no PPG Ciência Animal (UNOESTE), Mestra em Ciência Animal pela mesma instituição (2021), Especialista em Produção de Ruminantes (FACUMINAS), Zootecnista (UNOESTE, 2013). Com trajetória acadêmica e profissional marcada pela experiência em docência nas áreas de produção animal, com ênfase em Ovinocultura. As principais áreas de atuação incluem qualidade da carne, sanidade do rebanho, nutrição animal, produção de cordeiros e biologia molecular

<http://lattes.cnpq.br/6990110577493757>



Lorraine Pissinin Dutra, Técnica em Agropecuária (ETEC, 2020), graduanda em Zootecnia UNOESTE. Bolsista Fapesp (2024). Membro do grupo de estudos e pesquisa em ovinos, participando de pesquisas na área de nutrição animal e produção de pequenos ruminantes, além de interesse na área de bovinocultura de leite.

<http://lattes.cnpq.br/0254552498238735>



Ines Cristina Giometti, Médica Veterinária (Unoeste, 1999), Mestra em Medicina Veterinária pela (UFMS, 2002), Doutora em Medicina Veterinária (UNESP Botucatu, 2006) e Pós-doutora (USP). Atualmente é docente da UNOESTE e pesquisadora e orientadora no PPG em Ciência Animal. Tem experiência na área de Medicina Veterinária, com ênfase em Fisiopatologia da Reprodução Animal, atuando principalmente nos seguintes temas: fisiologia molecular da reprodução animal, espermatogênese e oôgenese, nutrição, metabolismo e treinamento resistido.

<http://lattes.cnpq.br/5461216137094368>



Caliê Castilho, Médica Veterinária (UNOESTE, 1994), residência em Reprodução Animal (UNESP Botucatu, 1996) Mestra em Ciências Biológicas (Farmacologia) (UNESP Botucatu, 1999), Doutora em Medicina Veterinária (UNESP Jaboticabal, 2003). Tem experiência na área de Medicina Veterinária, com ênfase em Reprodução Animal, atuando principalmente nos seguintes temas: biotécnicas reprodutivas, foliculogênese, endocrinologia.

<http://lattes.cnpq.br/4860674666647521>



Gabriella Capitane Sena, Zootecnista (UNOESTE, 2021) e Médica Veterinária (UNOESTE, 2024), Mestranda em Ciência Animal no PPG Ciência Animal (UNOESTE). Atua na área de produção animal, com foco em Ovinocultura, tem experiência em julgamento de ovinos e manejo geral.

<http://lattes.cnpq.br/8290507469849852>



Letícia Jalloul Guimarães, Doutora em Ciência Animal (UNOESTE, 2023). Mestre em Ciência Animal com ênfase em Produção Animal (UEL). Zootecnista (UNOESTE, 2017). Docente do Curso de Medicina Veterinária (Unifatecie), ministrando as disciplinas: Bioquímica Animal, Nutrição Animal, Zootecnia de Ruminantes, Zootecnia de Não Ruminantes e Tecnologia de Produtos de Origem Animal. Desenvolve pesquisas na área de nutrição animal e produção de pequenos ruminantes, avaliação de alimentos e avaliação e qualidade de carcaça e carne.

<http://lattes.cnpq.br/6318084951528088>



Natália Carolina Vieira, Zootecnista (UNESP/FCAT, Dracena, 2020), Mestre em Ciência e Tecnologia Animal (UNESP, Ilha Solteira e Dracena, 2023). Atualmente é Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, na área de nutrição, e professora Substituta da UNESP - Campus de Dracena. Tem experiência na área de Zootecnia, com ênfase em Produção Animal; Ovinocultura de Corte e leite, Característica da carcaça; Qualidade da carne e Tecnologia e Microbiologia de Produtos de Origem Animal.

<http://lattes.cnpq.br/8251110901540074>



Quézia Hadassa Machado Leite, Bacharel em Ciências Biológicas, formada pela Universidade do Oeste Paulista (2021). Licenciada em Biologia, formada pelo Centro Universitário Ingá (2023). Graduada em Pedagogia, na Faculdade Anhanguera. Atualmente, trabalha como professora de Ciência no Colégio Criativo Objetivo de Rancharia SP.

<http://lattes.cnpq.br/0959564486209793>



Maria Fernanda Gibim, Médica Veterinária (UNOESTE, 2019), Possui aprimoramento profissional em Clínica Médica de Grandes Animais. (UNOESTE, 2020). Pós-graduada em Clínica Médica e Reprodução de Bovinos (Faculdade Unyleya), Pós-graduada em Produção Intensiva em Bovinocultura de Corte (Unoeste), Mestranda em Ciência Animal (Unoeste)

<http://lattes.cnpq.br/3451696512149767>



Zootecnista, pós graduada em Processamento, Higiene e Inspeção de alimentos, tecnóloga em Gestão da Qualidade. Possui mais de 5 anos de experiência em controle de qualidade com abrangência em indústria frigorífica, fabricação de temperos desidratados e produção de embalagens flexíveis para alimentos.

<http://lattes.cnpq.br/2652639870120030>



Fabiola Cristine de Almeida Rêgo, Doutora em Zootecnia (UEM, 2004) na área de Nutrição de ruminantes; e Mestre em Zootecnia (UEM, 2001) na área de Forragicultura; Graduada em Zootecnia (UEM, 1997). Tem experiência na área de Zootecnia, com ênfase em Nutrição de Ruminantes, atuando principalmente nos seguintes temas: sistema de produção de ruminantes, bovinocultura de leite e corte, ovinocultura, produção animal a pasto. Coordenadora do Programa stricto sensu Mestrado em Saúde e Produção Animal, UNOPAR.

<http://lattes.cnpq.br/7872941464229041>



Marilice Zundt, Zootecnista (ESAPP, 1998) e Doutora em Produção Animal (UEM, 2004). Professora da UNOESTE, ministrando disciplinas na área de Bromatologia e Nutrição Animal e Ovinocaprinocultura e pesquisadora Do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da UNOESTE -SP (mestrado e doutorado). Desenvolve pesquisas na área de nutrição animal e produção de pequenos ruminantes, com ênfase no desempenho, avaliação de alimentos, qualidade da carne, avaliação de carcaças e bem-estar animal.

<http://lattes.cnpq.br/0348914985726046>

9. Declaração de Direitos

As autoras declaram ser detentoras dos direitos autorais da presente obra, que o artigo não foi publicado anteriormente e que não está sendo considerado por outra(o) Revista/Journal. Declaram que as imagens e textos publicados são de responsabilidade das autoras, e não possuem direitos autorais reservados à terceiros. Textos e/ou imagens de terceiros são devidamente citados ou devidamente autorizados com concessão de direitos para publicação quando necessário. Declaram respeitar os direitos de terceiros e de Instituições públicas e privadas. Declaram não cometer plágio ou auto plágio e não ter considerado/gerado conteúdos falsos e que a obra é original e de responsabilidade das autoras.



10. **Bibliografia**

1. DELIZA, R. et al. Avaliação dos Hábitos de Compra do Consumidor Brasileiro e Consumo de Carne Ovina. 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1110438/Avaliacao-Dos-Habitos-de-Compra-Do-Consumidor-Brasileiro-e-Consumo-de-Carne-Ovina>.
2. ALVAREZ, C.; KOOLMAN, L.; WHELAN, M.; MOLONEY, A. Effect of Pre-Slaughter Practises and Early Post-Mortem Interventions on Sheep Meat Tenderness and Its Impact on Microbial Status. *Foods*, v. 11, n. 2, p. 181, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods11020181>.
3. HUANG, F. et al. Contribution of mitochondria to postmortem muscle tenderization: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, p. 1–17, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2266767>.
4. PINHEIRO, R. S. B. et al. Physicochemical Quality and Fatty Acid Profile in the Meat of Goats Fed Forage Cactus as a Substitute for Tifton 85 Hay. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, v. 13, n. 6, p. 957, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani13060957>
5. MARCHEWKA, J. et al. Linking key husbandry factors to the intrinsic quality of broiler meat. *Poultry Science*, v. 102, n. 2, p. 102384, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102384>
6. REXROAD, C. et al. Genome to Phenome: Improving Animal Health, Production, and Well-Being – A New USDA Blueprint for Animal Genome Research 2018–2027. *Frontiers in Genetics*, v. 10, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00327>
7. LEAL, R. S. et al. Desempenho e rendimento de carcaça de suínos na fase de terminação, recebendo dietas com diferentes níveis de ractopamina. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 16, p. 582-590, 2015.



8. KAUR, L. et al. Endogenous Proteolytic Systems and Meat Tenderness: Influence of Post-Mortem Storage and Processing. *Food Science of Animal Resources*, v. 41, n. 4, p. 589–607, 2021. DOI: <https://doi.org/10.5851/kosfa.2021.e27>
9. LI, X. et al. The effect of caspase-3 in mitochondrial apoptosis activation on degradation of structure proteins of *Esox lucius* during postmortem storage. *Food Chemistry*, v. 367, p. 130767, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130767>
10. FARKAS, D. et al. Peripheral thickening of the sarcomeres and pointed end elongation of the thin filaments are both promoted by SALS and its formin interaction partners. *PLoS Genetics*, v. 20, n. 1, p. e1011117, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1011117>.
11. MADDOCK CARLIN, K. R. et al. Formation of the calpain-1/calpastatin complex promotes activation of calpain-1 under oxidizing conditions. *Journal of Animal Science*, v. 102, p. skae135, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1093/jas/skae135>
12. FOURNIER, T.; POULAIN, J. P. Eating according to one's genes? Exploring the French public's understanding of and reactions to personalized nutrition. *Qualitative Health Research*, v. 28, n. 14, p. 2195-2207, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1177/1049732318793417>.
13. SILVA, S. P. B.; HASS, I. AmEG–Ambientes e Expressão Gênica. *Legenda*, v. 9, p. 1, 2022.
14. GRAHAM, T. G. W. et al. Simple, Inexpensive RNA Isolation and One-Step RT-qPCR Methods for SARS-CoV-2 Detection and General Use. *Current Protocols*, v. 1, n. 4, p. e130, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/cpz1.130>.
15. GAGAOUA, M.; MONTEILS, V.; PICARD, B. Data from the farmgate-to-meat continuum including omics-based biomarkers to better understand the variability of beef tenderness: An integromics approach. *Journal of Agricultural and Food*



- Chemistry*, v. 66, n. 51, p. 13552-13563, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05744>.
16. FIRETTI, R. et al. Identificação de demanda e estimulada no consumo de carne ovina com apoio de técnicas de estatística multivariada. *Revista de Economia e Sociologia Rural*, v. 55, p. 679-692, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/1234-56781806-94790550404>.
17. GUERRERO, A. B.; SAÑUDO, C. Los desafíos reais pt o consumo de carnes frescas. Papel das marcas de qualidade. *Revista Eurocarne*, p. 71–82, 2019.
18. GOIS, G. C. et al. Qualidade da carne de ovinos terminados em confinamento com dietas com silagens de diferentes cultivares de sorgo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 69, n. 6, p. 1653–1659, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9231>.
19. ALVES, M. B.; SPERS, E. E.; SILVA, H. M. R. D.; CONTRERAS CASTILLO, C. J. Southeast Brazilian Consumers' Involvement and Willingness to Pay for Quality Cues in Fresh and Cooked Beef. *Journal of Food Products Marketing*, v. 28, n. 6, p. 276-293, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1080/10454446.2022.2129539>.
20. CONSTANTINO, P. A. L.; BENCHIMOL, M.; ANTUNES, A. P. Desenhando Terras Indígenas na Amazônia: Garantindo os Direitos Indígenas e a Conservação da Vida Selvagem por meio do Manejo da Caça. *Política de Uso da Terra*, v. 77, p. 652–660, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2018.06.016>.
21. HUANG, Y. et al. Feeding regimens affecting carcass and quality attributes of sheep and goat meat - A comprehensive review. *Animal Bioscience*, v. 36, n. 9, p. 1314–1326, 2023. DOI: <https://doi.org/10.5713/ab.23.0051>.
22. LANA, A.; ZOLLA, L. Proteolysis in meat tenderization from the point of view of each single protein: A proteomic perspective. *Journal of Proteomics*, v. 147, p. 85–97, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.02.011>



23. VOLPELLI, L. A.; FAILLA, S.; SEPULCRI, A.; PIASENTIER, E. Calpain system in vitro activity and myofibril fragmentation index in fallow deer (*Dama dama*): effects of age and supplementary feeding. *Meat Science*, v. 69, n. 3, p. 579-582, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.09.009>.
24. HE, J. et al. Investigation of the relationships between different enzymes and postmortem duck muscle tenderization. *Poultry Science*, v. 98, n. 11, p. 6125–6130, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps/pez301>.
25. DA CRUZ, B. C. C. et al. Avaliação e composição centesimal e as características físico-químicas da carne de ovinos. *Pubvet*, v. 10, p. 111-189, 2015. DOI: <https://doi.org/10.22256/pubvet.v10n2.147-162>.
26. CRETOIU, D. et al. Myofibers. In: *ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY*, 1088, p. 23-46, 2018. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-13-1435-3_2.
27. GANDOLFI, G. et al. Investigation on CAST, CAPN1 and CAPN3 porcine gene polymorphisms and expression in relation to post-mortem calpain activity in muscle and meat quality. *Meat Science*, v. 88, n. 4, p. 694-700, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.02.031>.
28. GE, Y. et al. Effect of Postmortem Phases on Lamb Meat Quality: A Physicochemical, Microstructural and Water Mobility Approach. *Food Science of Animal Resources*, v. 41, n. 5, p. 802–815, 2021. DOI: <https://doi.org/10.5851/kosfa.2021.e37>.
29. VALADEZ-GARCÍA, K. M. et al. Free ferulic acid supplementation of heat-stressed hair ewe lambs: Oxidative status, feedlot performance, carcass traits and meat quality. *Meat Science*, v. 173, p. 108395, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108395>.
30. BAI, Y. et al. Phosphorylation of Calpastatin Negatively Regulates the Activity of Calpain. *Life (Basel, Switzerland)*, v. 13, n. 3, p. 854, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/life13030854>.



31. PFLANZER, S. B.; GOMES, C. L.; FELÍCIO, P. E. D. O resfriamento tardio da carcaça melhora a maciez do músculo glúteo médio bovino. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 54, 2019.
32. BRIDI, A. M.; CONSTANTINO, C.; TARSITANO, M. A. Qualidade da carne de bovino produzida em pasto. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO ANIMAL À PASTO, 1. Anais... [s.l.: s.n.], p. 311-332, 2011.
33. SILVA, P. C. G. et al. Carcass traits and meat quality of Texel lambs raised in Brachiaria pasture and feedlot systems. *Animal Science Journal = Nihon Chikusan Gakkaiho*, v. 91, n. 1, p. e13394, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/asj.13394>.
34. LYU, J.; ERTBJERG, P. Ca²⁺-induced binding of calpain-2 to myofibrils: Preliminary results in pork longissimus thoracis muscle supporting a role on myofibrillar protein degradation. *Meat Science*, v. 172, p. 108364, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108364>
35. WANG, D. et al. Changes in actomyosin dissociation and endogenous enzyme activities during heating and their relationship with duck meat tenderness. *Food Chemistry*, v. 141, n. 2, p. 675–679, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.034>.
36. CUI, W. et al. Free fatty acid induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis of β -cells by Ca²⁺/calpain-2 pathways. *PloS One*, v. 8, n. 3, p. e59921, 2013.
37. SORIMACHI, H.; HATA, S.; ONO, Y. Impact of genetic insights into calpain biology. *Journal of Biochemistry*, v. 150, n. 1, p. 23–37, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1093/jb/mvr070>.
38. LAFITA-NAVARRO, M. D. C.; CONACCI-SORRELL, M. Identification of Calpain-Activated Protein Functions. In: *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. New York: Springer, 2019, v. 1915, p. 149–160. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8988-1_12



39. KOOHMARAIE, M. The role of Ca²⁺-dependent proteases (calpains) in post mortem proteolysis and meat tenderness. *Biochimie*, v. 74, n. 3, p. 239–245, 1992. DOI: [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(92\)90122-U](https://doi.org/10.1016/0300-9084(92)90122-U)
40. GAYA, L. G.; FERRAZ, J. B. S. Aspectos genético-quantitativos da qualidade da carne em frangos. *Ciência Rural*, v. 36, n. 1, p. 349–356, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782006000100058>.
41. HUFF LONERGAN, E.; ZHANG, W.; LONERGAN, S. M. Biochemistry of postmortem muscle — Lessons on mechanisms of meat tenderization. *Meat Science*, v. 86, n. 1, p. 184–195, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.05.004>.
42. KANAWA, R.; JI, J. R.; TAKAHASHI, K. Inactivity of μ -Calpain Throughout Postmortem Aging of Meat. *Journal of Food Science*, v. 67, n. 2, p. 635–638, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb10651.x>
43. SACCÀ, E.; CORAZZIN, M.; BOVOLENTA, S.; PIASENTIER, E. Meat quality traits and the expression of tenderness-related genes in the loins of young goats at different ages. *Animal*, v. 13, n. 10, p. 2419–2428, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1017/S1751731119000405>.
44. GOLL, D. E. et al. Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains. *Journal of Animal Science*, v. 86, n. suppl_14, p. E19-E35, 2008. DOI: <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0395>.
45. RAYNAUD, P. et al. Correlation between bovine calpastatin mRNA transcripts and protein isoforms. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 440, n. 1, p. 46-53, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.05.028>
46. FRAYSSE, B. et al. Fiber type-related changes in rat skeletal muscle calcium homeostasis during aging and restoration by growth hormone. *Neurobiology of Disease*, v. 21, n. 2, p. 372-380, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2005.07.012>.



47. DE BRITO, Gerlane F.; PONNAMPALAM, Eric N.; HOPKINS, David L. The effect of extensive feeding systems on growth rate, carcass traits, and meat quality of finishing lambs. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 16, n. 1, p. 23-38, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12230>
48. RUBIO LOZANO, M. S.; NGAPO, T. M.; HUERTA-LEIDENZ, N. Tropical Beef: Is There an Axiomatic Basis to Define the Concept?. *Foods (Basel, Switzerland)*, v. 10, n. 5, p. 1025, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods10051025>.
49. FERNANDES, M. H. M. R. et al. Human-edible protein contribution of tropical beef cattle production systems at different levels of intensification. *Animal : an international journal of animal bioscience*, v. 16, Suppl 3, p. 100538, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.animal.2022.100538>.
50. CORIA, M. S. et al. Feeding strategies alter gene expression of the calpain system and meat quality in the longissimus muscle of Braford steers. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, v. 33, n. 5, p. 753, 2020. DOI: <https://doi.org/10.5713/ajas.19.0163>.
51. ZAREIAN JAHROMI, E. et al. Allelic Polymorphism of Calpastatin Gene (CAST) in Khalkhali Goats: A Possible Marker for Meat Tenderness. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, v. 5, n. 4, p. 605–909, 2015. Disponível em: http://ijas.iaurasht.ac.ir/article_516542.html.
52. HUANG, Z. et al. Selenoprotein K Is a Novel Target of m-Calpain, and Cleavage Is Regulated by Toll-like Receptor-induced Calpastatin in Macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 40, p. 34830–34838, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.265520>.
53. QUREISCHI, M. et al. mRNA-based therapies: Preclinical and clinical applications. *International Review of Cell and Molecular Biology*, v. 372, p. 1–54, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2022.04.007>



54. GENTRY, R. C. et al. The mechanism of mRNA activation. *bioRxiv : the preprint server for biology*, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1101/2023.11.15.567265>.
55. MORGAN, J. B. et al. Meat tenderness and the calpain proteolytic system in longissimus muscle of young bulls and steers. *Journal of Animal Science*, v. 71, n. 6, p. 1471–1476, 1993. DOI: <https://doi.org/10.2527/1993.7161471x>
56. OTSUKA, Y.; GOLL, D. E. Purificação do inibidor de proteinase dependente de Ca⁺⁺ do músculo cardíaco bovino e sua interação com a proteinase dependente de Ca⁺⁺ milimolar. *Diário do Biológico Chemistry*, v. 262, p. 5839–5851, 1987.
57. GERI, C. et al. Arabidopsis mutants that suppress the phenotype induced by transgene-mediated expression of cauliflower mosaic virus (CaMV) gene VI are less susceptible to CaMV-infection and show reduced ethylene sensitivity. *Plant Molecular Biology*, v. 56, p. 111-124, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11103-004-2649-x>.
58. CARLSON, K. B. et al. Postmortem protein degradation is a key contributor to fresh pork loin tenderness. *Journal of Animal Science*, v. 95, n. 4, p. 1574-1586, 2017. DOI: <https://doi.org/10.2527/jas.2016.1032>.
59. KIM, Y. H. B. et al. Understanding postmortem biochemical processes and post-harvest aging factors to develop novel smart-aging strategies. *Meat Science*, v. 144, p. 74–90, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.04.031>
60. CHEN, L. et al. Effects of camptothecin, etoposide and Ca²⁺ on caspase-3 activity and myofibrillar disruption of chicken during postmortem ageing. *Meat Science*, v. 87, n. 3, p. 165-174, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.10.002>.
61. CHOUDHARY, G. S.; AL-HARBI, S.; ALMASAN, A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis. In: *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (CLIFTON, N.J.)*, 1219, p. 1-9, 2015. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1661-0_1.



62. NGUYEN, T. T. M.; GILLET, G.; POPGEORGIEV, N. Caspases in the Developing Central Nervous System: Apoptosis and Beyond. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 9, p. 702404, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.702404>
63. MCILWAIN, D. R.; BERGER, T.; MAK, T. W. Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 5, n. 4, a008656, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008656>
64. GUILLEMIN, N. et al. Functional analysis of beef tenderness. *Journal of Proteomics*, v. 75, n. 2, p. 352-365, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.07.026>.
65. LOPPNOW, H.; GUZIK, K.; PRYJMA, J. The Role of Caspases in Modulating Cytokines and Other Molecules in Apoptosis and Inflammation. In: *Madame Curie Bioscience Database [Internet]*. Landes Bioscience, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6184/>. Acesso em: [data de acesso].
66. CHUA, B. T.; GUO, K.; LI, P. Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 7, p. 5131-5135, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.275.7.5131>.
67. NAKAGAWA, T.; YUAN, J. Cross-Talk between Two Cysteine Protease Families. *Journal of Cell Biology*, v. 150, n. 4, p. 887–894, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.150.4.887>
68. WANG, K. K. W. et al. Caspase-Mediated Fragmentation of Calpain Inhibitor Protein Calpastatin during Apoptosis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 356, n. 2, p. 187–196, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.0748>.
69. FUENTE-GARCÍA, C. et al. Caspase activity in post mortem muscle and its relation to cattle handling practices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 101, n. 15, p. 6258–6264, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.11293>.



70. DÍAZ-LUIS, A. et al. Nuevos indicadores de carnes DFD: estrés oxidativo, autofagia y apoptosis. *Informacion Tecnica Economica Agraria*. 2020. DOI: <https://doi.org/10.12706/itea.2020.006>.
71. GUILLEMIN, N. et al. Variations in the abundance of 24 protein biomarkers of beef tenderness according to muscle and animal type. *Animal*, v. 5, n. 6, p. 885–894, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1017/S1751731110002612>.
72. PICARD, B.; GAGAOUA, M. Proteomic Investigations of Beef Tenderness. In: *Proteomics in Food Science*. Amsterdam: Elsevier, 2017. p. 177–197. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804007-2.00011-4>
73. ROMANOWSKI, T.; MARKIEWICZ, A.; BEDNARZ, N.; BIELAWSKI, K. P. Maintenance genes as a reference in real-time quantitative RT-PCR. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, v. 28, n. 61, p. 500–510, 2007. PMID: 17909518.
74. KOZERA, B.; RAPACZ, M. Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics*, v. 54, n. 4, p. 391–406, 2013.
75. CHERVONEVA, I. et al. Selection of optimal reference genes for normalization in quantitative RT-PCR. *BMC Bioinformatics*, v. 11, p. 253, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-253>.
76. SILVA, Isabella G. et al. Different nutritional systems influence the tenderness and lipid oxidation of ewe lamb meat without altering gene expression. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 95, n. suppl 2, p. e20220562, 2023.
77. SALWAY, J. *Metabolism at a Glance*. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 2017.
78. LIN, Y. W.; WANG, J. Structure and function of heme proteins in non-native states: A mini-review. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 129, p. 162–171, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.07.023>
79. HUNDALL, S. D. Ferro, Heme e Hemoglobina. In: EM HEMATOLOGIA: UMA ABORDAGEM FISIOPATOLÓGICA. Elsevier, 2011. p. 17–25.



80. DYNLACHT, B. D.; HOEY, T.; TJIJAN, R. Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell*, v. 66, n. 3, p. 563–576, 1991. DOI: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90019-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90019-2).