

Capítulo LXXXVIII

La terneza de la carne: conceptos innovadores

Jorge Ruiz Ramírez
Carolina Flores

La terneza en la carne de res es uno de los principales atributos que el consumidor evalúa al momento de consumirla. Es por ello que en Venezuela y en otros muchos países la clasificación de las canales de res se basa en este atributo, el cual depende de muchos factores, entre los cuales destaca la madurez fisiológica, condición sexual, la grasa intramuscular (Nishimura *et al.*, 1996; Hocquette *et al.*, 2010), al igual que la especie dentro del género, encontrándose marcada diferencia si la carne proviene de un *Bos taurus* o *Bos indicus*. Esta diferencia, se debe entre otros, a la presencia de factores inhibitorios presentes en mayor proporción en los *Bos indicus* tal como la calpastatina, proteína inhibidora de la acción de las calpaínas, principales enzimas proteolíticas del músculo esquelético. Todos estos factores influyen sobre la cantidad y la solubilidad del conectivo y el grosor de las fibras musculares.

Otro de los factores que afectan la terneza de la carne, tienen que ver con la longitud del sarcómero durante el desarrollo del rigor y de la proteólisis postmortem de la estructura miofibrilar (Koohmaraie & Geesink, 2006). Sobre este último, centraremos el tema de este Capítulo, teniendo en cuenta la bioquímica de los procesos enzimáticos y mostrando algunas evidencias que apoyan o rechazan la importancia de la proteólisis postmortem en el proceso de ablandamiento de las carnes. Hasta la fecha, los científicos han centrado su atención en las catepsinas, calpaínas y proteasomas.

CATEPSINAS

Las catepsinas son un grupo de enzimas compuestas de exo y endo-peptidasas, y son clasificadas en cisteína (catesina B, H, L y X), aspártico (catepsinas D y E) y serina (catepsina G) peptidasas (Sentandreu, *et al.*, 2002). Muchos grupos de investigadores han descartado la contribución de las catepsinas para el ablandamiento de la carne en base a numerosas observaciones. Primero, no hay una degradación a gran escala de la actina y la miosina en el periodo de acondicionamiento postmortem (Koohmaraie *et al.*, 1991). Segundo, las catepsinas están localizadas en los lisosomas y deben ser liberados para tener acceso a las proteínas miofibrilares para provocar el ablanda-

miento de la carne (Hopkins & Taylor, 2002), aunque el pH bajo y la alta temperatura de las canales pueden provocar la disrupción de la membrana lisosomal (O'Halloran *et al.*, 1997). Tercero, existe poca asociación entre la actividad de las catepsinas y la variación de la ternera en las muestras de carne (Whipple *et al.*, 1990). Sin embargo, se ha encontrado una correlación positiva entre la ternera de la carne y la actividad de las catepsinas B y L, a las 8h posmortem. (O'Halloran *et al.*, 1997). La catepsina L hidroliza un gran número de proteínas miofibrilares, incluyendo la troponina T, I y C, la nebulina, la titina y la tropomiosina, las cuales son degradadas durante la maduración posmortem, al igual que la miosina y la actina, en las miofibrillas de carne de res, conejo y pollo (Mikami *et al.*, 1987).

Las catepsinas tienen sus propios inhibidores, las cistatinas (Dubin, 2005), término que hace referencia a un grupo de homólogos y peptidasas cisteínas (Barrett, 1987), las cuales son inactivas contra otras clases de peptidasas (serina, aspartil y metalo peptidasas). En base a su estructura primaria, existen cuatro familias de inhibidores de las cisteínas peptidasas que son reconocidos como pertenecientes a la superfamilia de las cistatinas (Rawlings & Barrett, 1990). Familia 1 cistatinas, también denominadas estefinas, son proteínas de bajo peso molecular (10-14 kDa) que contiene una copia de la estructura inhibidora, pero no hay puentes de disulfuro intramoleculares; los miembros característicos de esta familia son la estefina A y la estefina B. Como las estefinas carecen de la secuencia de la señal presente en las proteínas secretadas, generalmente se encuentran dentro de la célula. Familia 2 cistatinas, también conocidas como cistatinas, son proteínas de bajo peso molecular (10-14 kDa) que contienen una copia de la estructura básica y al menos un inhibidor de puente disulfuro intramolecular. Las cistatinas son predominantemente extracelulares. La cistatina C y la cistatina Aviar son las más representativas de esta familia.

La Familia 3 de las cistatinas, denominados quininógenos, son cistatinas de alto peso molecular (> 50 kDa), que contienen, generalmente, tres copias de la estructura básica inhibitoria y varios puentes disulfuro. La familia quininógenos se compone de tres subclases, las de bajo peso molecular (BPM), las de alto peso molecular (HMW) y los T-quininógenos que difieren por sus masas moleculares y su especificidad frente a las cisteínas peptidasas. La Familia 4 de cistatinas, son proteínas inhibitoras glicosiladas de peso molecular intermedio que contienen dos copias de la estructura básica inhibitoria y varios puentes disulfuro intramoleculares.

Todos los miembros de la superfamilia de cistatinas inhiben las cisteínas peptidasas, como la papaína y las principales peptidasas lisosomales incluyendo catepsinas B, H y L. Además, los quininógenos, han demostrado que inhiben las omnipresentes calpaínas, las cuales son cisteína peptidasas, calcio dependientes (Ishiguro *et al.*, 1987). En el tejido muscular, han sido descritas varias proteínas de bajo peso molecular similares a las cisteínas (Bige *et al.*, 1985, Schwartz & Bird, 1977), pero al no haber disponible una secuencia, fue y aun es imposible certificar que estas son en realidad miembros de la super-familia de las cisteínas. De hecho, su identificación como cistatinas se basa solo en la gran similitud de su masa molecular.

Existen reportes de la presencia de peptidasas serinas en el músculo esquelético, aunque existe un debate de si la actividad de estas peptidasas está identificada en los homogeneizados de los músculos. En el estudio realizado por Zamora *et al.* (2005), la

actividad del inhibidor de las peptidasas serinas semi-purificadas fue relacionado positivamente con la dureza y cuando fue combinada con otras seis variables, que incluían la actividad de la μ -calpaínas, fue predictiva de la dureza de la carne de res, después del almacenamiento post-mortem.

PROTEASOMAS

Los proteasomas involucran un complejo de proteasas multicatalíticas relacionadas con la regulación del número de vías celulares básicas, por degradación del citosol y del núcleo de la proteína (Coux *et al.*, 1996). Los proteasomas están en todo el cuerpo y son abundantes en el músculo esquelético (Robert *et al.*, 1999). El proteasoma (20S) consiste de una unidad (19S) que tiene actividad proteolítica; el proteasoma (20S) también conocido como proteína compleja multicatalítica (MCP) es el núcleo catalítico de estos proteasomas (Dahlmann *et al.*, 2001).

La proteólisis por el proteasoma es un proceso ubiquitina dependiente, en el cual al menos cuatro de las proteínas de la ubiquitina deben adherirse al residuo de la lisina del sustrato deseado. Las proteínas poli-ubiquitinadas son reconocidas por el proteasoma, que retira la cadena de ubiquitina y degrada el sustrato (Taillandier *et al.*, 2004); este proceso es ATP dependiente y al momento de estar completado, el proteasoma 26S se disocia en la sub unidad 19S y en el proteasoma 20S, el cual no requiere ATP o ubiquitina (Peters *et al.*, 1994).

Esta última observación, ha llevado a distintos grupos de investigadores, a examinar el papel potencial del proteasoma 20S en la proteólisis postmortem. Taylor *et al.* (1995b) y Robert *et al.* (1999) encontraron que los proteasomas eran capaces de causar la proteólisis de las proteínas miofibrilares incluyendo la nebulina, miosina, actina y tropomiosina en las miofibrillas de la especie bovina. La actividad del proteasoma se mantiene durante el periodo de acondicionamiento postmortem. Se detecta su actividad a los 7 días post-mortem y a pH < 6 (Lamare *et al.*, 2002). Adicionalmente, Dutaud *et al.* (2006) mostraron cambios estructurales en las fibras musculares incubadas con el proteasoma 20S, incluyendo un incremento en el ancho de los discos Z, estirándose hasta la banda I, observación que no está reportada en las fibras tratadas con calpaínas o catepsinas. Aunque, como fue enfatizado por Koohmaraie & Geesink (2006), el patrón de degradación de las proteínas miofibrilares en incubaciones con el proteasoma 20S no son las mismas que han sido vistas en el músculo postmortem, pero esto no parece excluir a los proteasomas de contribuir en la proteólisis postmortem (Houbak *et al.*, 2008).

EL SISTEMA CALPAÍNA

Las calpaínas, son probablemente la familia de proteasas más investigadas en la ciencia de la carne y está comúnmente aceptado que la actividad proteolítica de la calpaína si contribuye al ablandamiento de la carne (Koohmaraie & Geesink, 2006; Sentandreu *et al.*, 2002). Las calpaínas son una gran familia de cisteínas proteasas intracelulares, de las cuales se han identificado 14 miembros, ubicados en tejidos específicos (Goll *et al.*, 2003). En el músculo esquelético el sistema calpaínas consiste en 3 proteasas o isoformas, la μ -calpaína, la m-calpaína y p94 (o calpaína 3). Las μ y m-calpaínas

son proteasas activadas por calcio, estas requieren concentraciones de Ca^{2+} micro y milimolares para su activación respectivamente (Goll *et al.*, 2003). Asociada con estas enzimas proteolíticas se encuentra un inhibidor endógeno catalítico, específico de la calpaína, la calpastatina (Wendt *et al.*, 2004).

Ahora, existe considerable evidencia de la asociación de la calpaína con la terniza de la carne de res, oveja y cerdo. Las correlaciones han demostrado que las diferentes tasas de terniza en las diferentes especies (res < oveja < cerdo) se asocia inversamente a la relación calpastatina y calpaína (res > oveja > cerdo) (Koohmaraie *et al.*, 1991). Otra evidencia proviene de la observación de los efectos de los β -adrenérgicos, que reducen significativamente la degradación de la proteína muscular (Bohorov *et al.*, 1987). En los animales tratados existió una elevada actividad de la calpastatina y de la expresión mRNA, obteniéndose carnes más duras (Bardsley *et al.*, 1992).

En la hipertrofia muscular encontrada en las ovejas de fenotipo callipyge ("nalgas hermosas" en griego) existen altos niveles de calpastatina, una gran reducción de la proteólisis postmortem y una disminución significativa de la terniza de la carne (Geesink & Koohmaraie, 1999). Aunque estas observaciones indican el papel principal de la proteólisis postmortem, no indican cuál de las isoformas proteolíticas de las calpaínas es la responsable de la degradación post-mortem.

La calpaína 3/p94 esta expresada casi exclusivamente en el músculo esquelético. (Sorimachi *et al.*, 1989) y fue originalmente de interés para los científicos de la ciencia de carne, por las uniones con la proteína del citoesqueleto titina, en la línea N₂, que se encuentra dentro de la banda I (Sorimachi *et al.*, 1995), lugar de proteólisis que ha sido relacionado con la terniza de la carne (Taylor *et al.*, 1995a).

La μ -calpaína es activada al inicio del periodo postmortem (tres días después de la matanza) (Taylor *et al.*, 1995). La m-calpaína persiste por mucho más tiempo que la menos estable μ -calpaína en la maduración del músculo (Sensky *et al.*, 1996), sugiriendo que no es activada al principio del proceso postmortem. Adicionalmente, las concentraciones de Ca^{2+} que existen en el músculo postmortem son menos que las requeridas por la m-calpaína para su activación (Goll *et al.*, 1998; Boehm *et al.*, 2003). La evidencia experimental disponible sugiere que la μ -calpaína es el componente enzimático del sistema de calpaína que tiene la mayor significancia en la proteólisis postmortem y en la terniza de la carne.

La calpastatina es la proteína que inhibe a la μ y m-calpaínas, proceso que requiere de concentraciones de calcio, cerca o debajo de las reportadas para activar a la calpaína (Goll *et al.*, 2003). Aunque la calpastatina es susceptible a la proteólisis, los fragmentos resultantes retienen la actividad inhibidora. La calpastatina es una proteína sin estructura, pero cuando se une a la calpaína adquiere una estructura que permite que se lleve a cabo la inhibición. La calpastatina contienen cuatro dominios inhibidores, cada uno puede inhibir la actividad de la calpaína. Entre estos dominios existen tres regiones A, B y C dispuestos a interactuar con la calpaína. La unión del calcio a la calpaína causa cambios en la molécula de la calpaína ayudándola a activarse, pero también permitiendo la interacción de la calpastatina con la enzima. Estos experimento explican la observación que la calpastatina requiere calcio para interactuar con las calpaínas (Goll *et al.*, 2003). Parte de esta ruptura puedes ser causada por otras

proteasas como las caspasas, las cuales presumiblemente modificarían la actividad de las calpastatinas.

Una observación concluyente de que las calpaínas están involucradas en la terneza, se basa en que los niveles altos de calpastatina están asociados con carne de baja calidad; el modelo es que, niveles altos de calpastatina reducen la actividad de las calpaínas, reduciendo la proteólisis requerida para la terneza de la carne. En rumiantes existe una relación entre la actividad de la calpastatina en el músculo a las 24h después de la matanza y el grado de terneza (Shackelford *et al.*, 1994). Por lo tanto, el monitorear la calpastatina varias horas, sería potencialmente útil para predecir si la canal tendrá una terneza en un grado aceptable. Muchos estudios se han realizado basados en la actividad de las calpastatinas para predecir la calidad de la carne (Geesink *et al.*, 2005; Grant *et al.*, 2005).

El uso de métodos basado en los anticuerpos para la detección de calpastatina es complicado por el hecho de que existe una micro-heterogeneidad en las formas de la calpastatina que generan rupturas alternativas y fosforilación (Parr *et al.*, 2001). La identificación de esa variabilidad puede servir para controlar la actividad inhibidora de la calpastatina; de esa manera, la identificación de las isoformas y las especies de mRNA de donde se originan, puede llevar a un predictor más cercano de dureza/terneza.

Actualmente existen marcadores dentro de los genes de calpastatina y μ -calpaína que son capaces de identificar al ganado, con un potencial genético para producir carnes tiernas (Casas *et al.*, 2006), los cuales están disponibles comercialmente. Complejas investigaciones sobre el genoma bovino, recientemente finalizadas, han permitido identificar los genes que llevan la información para la síntesis de las **calpaínas** y **calpastatinas**, así como la identificación de algunas variantes en estos genes que proporcionan mayor o menor terneza.

En el laboratorio de biología molecular de Facultad de Veterinaria de la Universidad del Zulia se han desarrollado y puesto a punto las técnicas para realizar estos análisis a partir de ADN de muestras de sangre, tejido o semen. Estudios realizados para caracterizar los genes de CAPN530 y CAST2959 en raza Brahman (Aranguren-Méndez *et al.*, 2010) han determinado la frecuencia para el locus de la CAPN530, encontrándose que para el alelo A (0,17) y para el alelo G (0,83) las frecuencias genotípicas fueron AA (0,01), AG (0,31) y GG (0,68), mientras que para CAST las frecuencias fueron A (0,67) y B (0,33) con frecuencias genotípicas de AA (0,46), AB (0,42) y BB (0,12). De esos resultados se desprende que estos rebaños Brahman al presentar una alta frecuencia de individuos GG (CAPN530), pero muy baja de genotipos AA (CAST), hace que sus carnes posiblemente sean menos tiernas, al contrario de lo reportado para Criollo Limonero (Portillo *et al.*, 2010) quienes encontraron valores intermedios de GG (CAPN530) y altos de AA (CAST), lo que hace presumir que las carnes provenientes de estos animales sean más blandas.

En la actualidad, se evalúan diferentes hipótesis susceptibles que permiten abrir una nueva puerta para una investigación más amplia en el campo de la ciencia de la carne. Parece evidente el hecho que después del desangrado de las reses, las células musculares no tienen otra alternativa que entrar a la muerte celular o apoptosis.

EL SISTEMA DE CASPASAS

El concepto de muerte celular programada o apoptosis es más antiguo que lo sugerido en la mayoría de los reportes. De hecho, de acuerdo con Clarke & Clarke (1995), la muerte celular ocurrida naturalmente, incluyendo el concepto de apoptosis, era tema floreciente a finales del siglo 19. El primer reporte de que las células mueren naturalmente durante su desarrollo fue publicado por Carl Vogt en 1842 (cit. Clarke & Clarke, 1995). La muerte celular programada es un mecanismo fisiológico natural que ocurre en los organismos vivos y que elimina células excesivamente dañadas o potencialmente peligrosas de un organismo, sin dañar las otras células a su alrededor (Fidzianska *et al.*, 1991). Esta limpieza celular sistemática es necesaria tanto para el normal desarrollo de un organismo multicelular durante la embriogénesis, como para el mantenimiento de la homeostasis del tejido en adultos (Meier *et al.*, 2000).

La apoptosis es usualmente mediada por una maquinaria compleja, que se está haciendo bien conocida en humanos (Green & Amarante-Mendes, 1998; Fuentes-Prior & Salvesen, 2004). Es por ello que es aceptado que la disregulación de la apoptosis no solo está asociada con frecuencia a diversos trastornos del desarrollo, sino también con una fuerte mortalidad (Sanmartín *et al.*, 2005). La apoptosis es mediada por un grupo particular de cisteína peptidasas llamadas caspasas.

El concepto de apoptosis fue introducido por Kerr *et al.* (1972) para indicar una forma de muerte celular totalmente diferente de la necrosis, tanto desde el punto de vista morfológico como bioquímico. El análisis comparativo de la muerte de la célula muscular conllevó a la misma conclusión (Fidzianska *et al.*, 1991). Las células en apoptosis son aisladas por la pérdida de contacto con las células vecinas; la condensación del núcleo y del citoplasma induce una reducción significativa del volumen celular, las mitocondrias de las células apoptóticas sufren varias modificaciones mayores, liberación del citocromo c en el citoplasma, reducción del potencial de membrana y deterioro de la permeabilidad de membrana con la apertura de poros especializados y difusión de diversas proteínas pro-apoptóticas. Luego de la condensación del núcleo, la cromatina es separada en fragmentos regulares de aproximadamente 180 pares de bases. Algunas veces, la membrana plasmática se divide y forma cuerpos apoptóticos, conteniendo parte del citoplasma celular.

Las caspasas son peptidasas generalmente clasificadas de acuerdo a la naturaleza del aminoácido que toma parte en la reacción hidrolítica, puede ser una serina (peptidasa sérica), una cisteína (cisteína peptidasa) o un ácido aspártico (aspartil peptidasa). En el caso de las cisteína peptidasas, el residuo cisteína es el aminoácido, el cual cataliza la reacción de hidrólisis del enlace peptídico.

Todas las peptidasas generadoras de apoptosis son llamadas caspasas. La primera letra del nombre "c" representa la cisteína del sitio activo, "asp" define la especificidad estricta de división después de un residuo de ácido aspártico y "ase" es el sufijo común a todas las enzimas. ICE (interleucina-1 β -enzima convertidora) que fue cronológicamente la primera caspasa caracterizada, fue rebautizada con toda naturalidad como caspasa 1. Hasta ahora se han caracterizado 14 caspasas, aunque no hay duda que esta lista no es exhaustiva. Algunas caspasas son específicas a especies animales; por lo tanto, la caspasa 11 fue encontrada solo en ratas donde la caspasa 13 parece estar

expresada solo en bovinos. La caspasa 12 puede estar presente solo en ratones. La estructura de estas caspasas (caspasa 11-13) está menos documentada que las otras (1-10).

De acuerdo con Fuentes *et al.* (2004), en base a su función biológica y su papel en la apoptosis se distinguen tres grupos de caspasas; las primeras intervienen en los procesos inflamatorios (caspasas 1, 4 y 5). El conocimiento sobre la función precisa de estas caspasas está menos desarrollado que en las otras dos clases. El segundo grupo interviene en la fase de iniciación de la apoptosis (caspasas 8-10); se caracteriza por grandes prodominios que a menudo contienen áreas esenciales para su interacciones con otras proteínas. El tercer grupo está formado por las caspasas efectoras que cortan o interrumpen la célula cuando se activan (caspasas 3, 6 y 7). En comparación con las caspasas de iniciación, estas generalmente tienen prodominios pequeños.

La caspasa 8 o 10 también pueden ser inactivadas por IAPs (inhibidores de apoptosis), los cuales son inhibidores de proteínas unidas cerca de los sitios activos de las caspasas, bloqueando su acceso a los sustratos. Si este no es el caso, las caspasas mencionadas pueden activar caspasas efectoras (caspasas 3 y 7), las cuales son responsables de la ruptura celular.

Al igual que para otros aspectos de la biología, los tejidos del músculo esquelético está lejos de ser un modelo actual para las investigaciones de apoptosis. En los humanos, la apoptosis en el tejido muscular ha sido estudiado principalmente en su relación a ciertas patologías, incluyendo desordenes neuromusculares, miositis o atrofia muscular (Liu & Ahearn, 2001; Sandri, 2002; Leeuwenburgh, 2003; Yuan *et al.*, 2003; Tews, 2005).

En animales de carne, sea cual sea la especie animal y cualquiera que sea la tecnología de aturdimiento utilizada, la última fase de la faena es el desangrado. En consecuencia, todas las células y tejidos serán desprovistos de oxígeno y nutrientes. Bajo estas condiciones ambientales peligrosas, las células musculares no tendrán otra alternativa que el suicidio con todas las consecuencias descritas anteriormente. El objetivo será tomar uno por uno todos los cambios celulares asociados a la apoptosis y establecer un vínculo con la modificación observada en el músculo durante la maduración, en relación con las características organolépticas y particularmente la terneza, que es el atributo más importante para el consumidor.

La participación de la apoptosis es difícil de disputar, tomando en cuenta las condiciones ambientales, las cuales existen luego del desangrado del animal. Basado en los conocimientos adquiridos desde 1995 sobre la apoptosis, especialmente en los seres humanos, el análisis de las consecuencias de la apoptosis en las células dedicadas a la muerte celular programada trae respuestas a muchas preguntas a las que se enfrentan los científicos que estudian la conversión del músculo en carne.

Debido a que las caspasas se especializan en la desestructuración, probablemente primero degradan las proteínas claves, que participan en la compleja organización espacial de las miofibrillas en las células musculares y en la hidrólisis de los componentes celulares, para luego seguir con otros sistemas proteolíticos, como catépsinas, calpaínas y proteasomas.

CONCLUSIONES

El ablandamiento de la carne resulta probablemente, de la acción sinérgica de varios sistemas enzimáticos endógenos. Incluso, si la participación de las caspasas no lo explica todo, es probable que sea un elemento esencial para facilitar la acción de otros sistemas intracelulares proteolíticos, es decir, catepsinas, calpaínas, proteasomas y puede ser, otras enzimas proteolíticas que no se han considerado hasta ahora como caspasas. Por tanto, es necesario integrar los conocimientos disponibles en las actuales y futuras investigaciones sobre el ablandamiento de las carnes, incluyendo la búsqueda de marcadores predictivos esenciales de calidad para el consumidor. La búsqueda de la diversidad biológica, para el ablandamiento de la carne es una necesidad absoluta para mejorar la valorización de las canales dirigiéndolas poco después del sacrificio hacia un uso óptimo basada en su calidad. Esta revisión prospectiva es el primer paso sobre las nuevas consideraciones sobre el proceso de maduración de la carne y nuevos enfoques experimentales en este campo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aranguren-Méndez J, Ruiz-Ramírez J, Portillo M, Rojas I, Flores C, Mendez K. 2010. Polimorfismo genético de los genes calpaína y calpastatina en un rebaño Brahman en Venezuela. XV Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal. UCLA, Bto, 28-30 Octubre. (Resumen).
- Bardsley RG, Allock SM J, Dawson JM, Dumelow NW, Higgins JA, Lasslett YV, Lockley AK, Parr T, Buttery PJ. 1992. Effects of beta-agonists on the expression of calpain and calpastatin activity in skeletal muscle. *Biochimie* 74: 267-273.
- Barrett AJ. 1987. The cystatins: A new class of peptidase inhibitors. *Trends in Biochemical Sciences* 12: 193-196.
- Bige L, Ouali A, Valin C. 1985. Purification and characterization of a low molecular weight cysteine proteinase inhibitor from bovine muscle. *Bioch Bioph Acta* 843: 269-275.
- Boehm ML, Kendall TL, Thompson VF, Goll DE. 1998. Changes in the calpains and calpastatin during postmortem storage of bovine muscle. *J Anim Sci* 76: 2415-2434.
- Bohorov O, Buttery PJ, Correia JH, Soar JB. 1987. The effect of the b-2-adrenergic agonist clenbuterol or implantation with oestradiol plus trenbolone acetate on protein metabolism in wether lambs. *Brit J Nutr* 57: 99-107.
- Casas E, White SN, Whccler TL, Shackelford SD, Koohmaraie M, Riley DG, Chase CC, Jr, Johnson DD, Smith TPL. 2006. Effects of calpastatin and μ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *J Anim Sci* 84: 520-525.
- Clarke PGH, Clarke S. 1995. Historic apoptosis. *Nature* 378: 230.
- Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. 1996. Structure and functions of the 20S and 26S proteasome. *Ann Rev Bioch* 65: 801-847.
- Dahlmann B, Ruppert T, Kloetzel PM, Kuehn L. 2001. Subtypes of 20S proteasomes from skeletal muscle. *Biochimie* 83: 295-299.
- Dubin G. 2005. Proteinaceous cysteine protease inhibitors. *Cellular and Molecular. Life Sci.* 62: 653-669.

- Dutaud D, Aubry L, Sentandreu MA, Ouali A. 2006. Bovine muscle 20S proteasome: I. Simple purification procedure and enzymatic characterization in relation with postmortem conditions. *Meat Sci* 74: 327-336.
- Fidzianska A, Kaminska A, Glinka Z. 1991. Muscle cell death. Ultrastructural differences between muscle cell necrosis and apoptosis. *Neuropat Polska* 29: 19-28.
- Fuentes-Prior P, Salvesen GS. 2004. The protein structures that shape caspase-activity, specificity, activation, and inhibition. *Biochem J* 384: 201-232.
- Geesink GH, Koohmaraie M. 1999. Postmortem proteolysis and calpain /calpastatin activity in callipyge and normal lamb biceps femoris during extended postmortem storage. *J Anim Sci* 77: 1490-1501.
- Geesink GH, Van der Palen JGP, Kent MP, Veiseth E, Hemke G, Koohmaraie M. 2005. Quantification of calpastatin using an optical surface plasmon resonance biosensor. *Meat Sci* 71: 537-54.
- Goll DE, Thompson VF, Li HQ, Wei W, Cong JY. 2003. The calpain system. *Physiol Rev* 83: 731-801.
- Grant SA, Stringer RC, Studer S, Lichlyter D, Lorenzen CL. 2005. Viability of a FRET dual binding technique to detect calpastatin. *Biosens Bioelectr* 21: 438-444.
- Green DR, Amarante-Mendes GP. 1998. The point of no return: Mitochondria, caspases, and the commitment to cell death. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 24, 45-1.
- Hocquette JF, Gondret F, Baéza E, Médale F, Jurie C, Pethick DW. 2010. Intramuscular fat content in meat-producing animals: Development genetic and nutritional control and identification of putative markers. *Animal* 4 (2): 303-319.
- Hopkins DL, Taylor RG. 2002. Post-mortem muscle proteolysis and meat tenderisation. In M. te Pas, M. Everts, & H. Haagsman (Eds.), *Muscle development of livestock animals* (pp. 363-389). Cambridge, MA, USA: CAB International.
- Houbak MB, Ertbjerg P, Therkildsen M. 2008. In vitro study to evaluate the degradation of bovine muscle proteins post-mortem by proteasome and micro-calpain. *Meat Sci* 79: 77-85.
- Koohmaraie M, Geesink GH. 2006. Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat Sci* 74: 34-43.
- Koohmaraie M, Whipple G, Kretchmar DH, Crouse JD, Mersmann HJ. 1991. Postmortem proteolysis in longissimus muscle from beef, lamb and pork carcasses. *J Anim Sci* 69: 617-624.
- Lamare M, Taylor RG, Farout L, Briand Y, Briand M. 2002. Changes in proteasome activity during postmortem aging of bovine muscle. *Meat Sci* 61: 199-204.
- Leeuwenburgh C. 2003. Role of apoptosis in sarcopenia. *Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 58, 999-1001.
- Liu CC, Ahearn JM. 2001. Apoptosis of skeletal muscle cells and the pathogenesis of myositis: A perspective. *Current Rheumat Rep* 3: 325-333.
- Meier P, Finch A, Evan G. 2000. Apoptosis in development. *Nature* 407: 796-801.
- Mikami M, Whiting AH, Taylor MAJ, Maciewicz RA, Etherington DJ. 1987. Degradation of myofibrils from rabbit, chicken and beef by cathepsin L.

Nishimura T, Hattori A, Takahashi K. 1999. Structural changes in intramuscular connective tissue during the fattening of Japanese black cattle: Effect of marbling on beef tenderization. *J Anim Sci* 77: 93-104.

O'Halloran GR, Troy DJ, Buckley DJ, Reville WJ. 1997. The role of endogenous proteases in the tenderisation of fast glycolysing muscle. *Meat Sci* 47: 187-210.

Parr T, Sensky PL, Bardsley RG, Buttery PJ. 2001. Calpastatin expression in cardiac and skeletal muscle and partial gene structure. *Arch Biochem Biophys* 395: 1-13.

Peters JM, Franke WW, Kleinschmidt JA. 1994. Distinct 19S and 20S subcomplexes of the 26S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem* 269: 7709-7718.

Portillo M, Aranguren-Méndez J, Flores C, Villasmil Y, Torres P. 2010. Frecuencias alélicas de los genes calpaína (CAPN530) y calpastatina (CAST) en ganado criollo limonero. XV Cong Ven Prod Indust Anim. UCLA, Barquisimeto (Resumen).

Rawlings ND, Barrett AJ. 1990. Evolution of proteins of the cystatin superfamily. *J Mol Evol* 30: 60-71.

Robert N, Briand M, Taylor R, Briand Y. 1999. The effect of proteasome on myofibrillar structures in bovine skeletal muscle. *Meat Sci* 51: 149-153.

Sandri M. 2002. Apoptotic signaling in skeletal muscle fibers during atrophy. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 5: 249-253.

Sanmartín M, Jaroszewski L, Raikhel NV, Rojo E. 2005. Caspases. Regulating death since the origin of life. *Plant Physiology* 137: 841-847.

Sentandreu MA, Coulis G, Ouali A. 2002. Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends in Food Science and Technology* 13 (12): 400-421.

Schwartz W, Bird JWC. 1977. Degradation of myofibrillar proteins by cathepsins B and D. *Biochem J* 167: 811-820.

Sensky PL, Parr T, Scothern GP, Perry A, Bardsley RG, Buttery PJ, Wood JD, Warkup C. 1998. Differences in the calpain enzyme system in tough and tender samples of porcine longissimus dorsi. *Proc Brit Soc Anim Sci* 14.

Shackelford SD, Koohmaraie M, Cundiff LV, Gregory K E, Rohrer GA, Savell JW. 1994. Heritabilities and phenotypic and genetic correlations for bovine postrigor calpastatin activity, intramuscular fat content, Warner-Bratzler shear force, retail product yield, and growth rate. *J Anim Sci* 72: 857-863.

Sorimachi H, Imajoh-Ohmi S, Emori Y, Kawasaki H, Ohno S, Minami Y, Suzuki K. 1989. Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and mu-types. Specific expression of the mRNA in skeletal muscle. *J Biol Chem* 264: 20106-20111.

Taillandier D, Combaret L, Pouch MN, Samuels SE, Bechet D, Attaix D. 2004. The role of ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in the remodelling of skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 63: 357-361.

Taylor RG, Geesink GH, Thompson VF, Koohmaraie M, Goll, DE. 1995a. Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization? *J Anim Sci* 73: 1351-1367.

Taylor RG, Tassy C, Briand M, Robert N, Briand Y, Ouali A. 1995b. Proteolytic activity of proteasome on myofibrillar structures. *Mol Biol Rep* 21: 71-73.

Tews DS. 2005. Muscle-fiber apoptosis in neuromuscular diseases. *Muscle and Nerve* 32: 443-458.

- Wendt A, Thompson VF, Goll DE. 2004. Interaction of calpastatin with calpain: A review. *Biol Chem* 385: 465-472.
- Whipple G, Koohmaraie M, Dikeman ME, Crouse JD, Hunt MC, Klemm RD. 1990. Evaluation of attributes that affect longissimus muscle tenderness in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. *J Anim Sci* 68: 2716-2728.
- Yuan J, Wang MX, Murrell GA. 2003. Cell death and tendinopathy. *Clinics Sports Med* 22: 693-701.
- Zamora F, Aubry L, Sayd T, Lepetit J, Lebert A, Sentandreu MA, Ouali A. 2005. Serine peptidase inhibitors, the best predictor of beef ageing amongst a large set of quantitative variables. *Meat Sci* 71: 730-742.