

LITERATURE REVIEW

Calpain System in meat tenderization: A molecular approach

El sistema proteolítico calpaina en la tenderización de la carne: Un enfoque molecular

María S. Coria^{1,2} Lic, Pedro G. Carranza^{2,3} Ph.D, Gustavo A. Palma^{1,2*} Ph.D.

¹Laboratorio de Producción Animal, Instituto de Bionanotecnología del NOA (INBIONATEC), RN 9, Km 1125, G4206XCP Villa El Zanjón, Santiago del Estero, Argentina. ²Universidad Nacional de Santiago del Estero (UNSE), Belgrano (S) 1912, Santiago del Estero, Argentina. ³Centro de Investigaciones y Transferencia Santiago del Estero (CITSE). RN9, Km 1125, G4206XCP Santiago del Estero, Argentina.

*Correspondence: gustavo.palma@reprobiotec.com

Received: October 2017; Accepted: December 2017.

ABSTRACT

Tenderness is considered the most important meat quality trait regarding its eating quality. Post mortem meat tenderization is primarily the result of calpain mediated degradation of key proteins within muscles fibers. The calpain system originally comprised three molecules: two Ca²⁺-dependent proteases and a specific inhibitor. Numerous studies have shown that the calpain system plays a central role in postmortem proteolysis and meat tenderization. The objective of this review is to describe the last biochemical and molecular findings in connection with this proteolytic system and their relation with meat tenderness in bovine. Findings of DNA polymorphisms and mRNA and protein expression are described as tools to predict meat tenderness. Understanding the molecular basis of meat tenderization may be useful particularly to the meat industry and may allow amendment of pre-slaughter handling practices and postmortem treatments that improves meat quality.

Keywords: Bovine, Molecular Markers, Tenderness (*Source: AGROVOC*).

RESUMEN

La ternera de la carne es considerada como el atributo de mayor importancia en el concepto de calidad de carne. El proceso de tenderización de la carne post mortem es principalmente el resultado de la degradación de proteínas clave de las fibras musculares, mediado por las proteasas del sistema calpaína. Este sistema proteico está compuesto por tres moléculas: dos proteasas calcio-dependientes y su inhibidor específico. Numerosos estudios han demostrado que el sistema calpaína desempeña un papel central en la proteólisis postmortem y en la tenderización de la carne. El objetivo de esta revisión es describir los últimos descubrimientos bioquímicos y moleculares de este sistema proteolítico y su relación con la ternera de la carne bovina. Se describen los hallazgos de polimorfismos de ADN y de expresión de ARNm y proteínas, como herramientas para predecir la ternera de la carne. La comprensión de las bases moleculares de la tenderización de la carne puede ser de utilidad para la industria cárnica, permitiendo la modificación de las prácticas de manipulación antes del sacrificio y los tratamientos post mortem, mejorando la calidad de la carne bovina.

Palabras claves: Bovinos, marcadores moleculares, ternera (*Fuente: AGROVOC*).

INTRODUCTION

Meat quality is a main concern for livestock industries and consumers' needs. Some of the most important sensory attributes of meats are appearance, juiciness, flavour and tenderness (1). Previous studies have shown that the meat tenderization process is complex and could be affected by several different pathways including pre- and post-slaughter factors and their interaction (2).

The implementation of high-throughput analytical tools over the last two decades was an important step toward a better understanding of the complex biological systems that define muscle to meat conversion. It is well recognized that the biochemical postmortem processes are key steps in meat tenderization (3). At present, tenderization is unanimously regarded as an enzymatic process of proteolytic systems. Numerous authors suggest that calpains are the only proteases responsible for meat tenderization (4). Thus, numerous studies have focused on the factors influencing meat tenderness and their relation with calpain system. The present revision highlight the importance of the use of molecular approaches to unravel the mechanisms behind the variations in meat tenderization. The exploitation of these methodologies could deepen our understanding of the biological processes driving meat production. The thorough knowledge of the molecular mechanisms of the muscle-to-meat conversion would have a strong economic impact thanks to the improvements of the quality of the final products that would increase consumers' purchase.

CALPAIN SYSTEM

The calpain system in skeletal muscle comprises two Ca^{2+} dependent proteases, calpain 1 and 2, and a third polypeptide, calpastatin, whose only known function is to inhibit the two calpains. This system has a number of different roles in cells, including but not limited to the "remodeling" of cytoskeletal attachments to the plasma membrane during cell fusion and cell motility, the proteolytic modification of molecules in signal transduction pathways, the degradation of enzymes controlling progression through the cell cycle, the regulation of gene expression, substrate degradation in some apoptotic pathways, and involvement in long-term potentiation (5).

Calpains. Calpains are Ca^{2+} -dependent, cysteine proteases. So far, 15 calpains have been described in mammalian (6) The two most often

INTRODUCCION

La calidad de la carne es una de las principales preocupaciones de la industria ganadera y de los consumidores. Algunos de los atributos sensoriales más importantes de la carne son el aspecto, la jugosidad, el sabor y la terneza (1). Estudios anteriores han demostrado que el proceso de tenderización de la carne es complejo y podría verse afectado por varias vías diferentes, incluidos factores previos y posteriores al sacrificio y su interacción (2).

La implementación de herramientas analíticas de alto rendimiento durante las últimas dos décadas fue un paso importante hacia una mejor comprensión de los complejos sistemas biológicos que definen la conversión de músculo a carne. Se ha establecido que los procesos bioquímicos post-mortem son pasos clave en la tenderización de la carne (3). En la actualidad, se considera de manera unánime que la tenderización es un proceso enzimático. Numerosos autores sugieren que las calpaínas son las únicas proteasas responsables de este proceso (4). Así, numerosos estudios se han centrado en los factores que influyen en la terneza de la carne y su relación con el sistema calpaína. La presente revisión destaca la importancia del uso de enfoques moleculares para desentrañar los mecanismos detrás de las variaciones en la terneza de la carne. El aprovechamiento de estas metodologías permitirá profundizar nuestra comprensión de los procesos biológicos involucrados en la producción de carne. El conocimiento de los mecanismos moleculares que determinan la conversión de músculo en carne podrá generar un fuerte impacto económico produciendo mejoras en la calidad de los productos finales aumentando su compra.

SISTEMA CALPAÍNA

El sistema calpaína en el músculo esquelético comprende dos proteasas calcio dependientes, la calpaína 1 y 2, y un tercer polipéptido, la calpastatina, cuya única función conocida es inhibir las dos calpaínas. Este sistema tiene diferentes funciones en las células, incluyendo pero no limitando, la "remodelación" de las uniones citoesqueléticas de la membrana plasmática durante la fusión celular y la motilidad celular; la modificación proteolítica de las moléculas en las vías de transducción de señales; la degradación de las enzimas que controlan la progresión del ciclo celular; la regulación de la expresión génica; la degradación de sustratos en algunas vías apoptóticas y la participación en la potenciación a largo plazo (5).

Calpains. Las calpaínas son cistein-proteasas, dependientes de calcio. Hasta ahora, se han

described proteases are CAPN1 and CAPN2, termed μ - and m-calpain, alluding to their micromolar and millimolar Ca^{2+} requirement (5). Both proteases are heterodimeric, each composed of an 80 kDa catalytic subunit and a regulatory subunit of 28kDa (7).

The 80 kDa subunits are different gene products (genes on chromosomes 29 and 16 in bovine, respectively). These subunits can be divided into four domains on the basis of their amino acid: the N-terminal anchor helix region; the protease core domains: PC1, an NH2-terminal domain, and PC2, the catalytic domain with a triad residue (Cys-His-Asn) characteristic of cysteine proteases; the C2-like domain (C2L); and the penta-EF-hand domain of the large subunit PEF(L) (8) (Figure 1). The 28 kDa subunit, common to both calpains, has two domains: the GR (glycine-rich) and PEF of the small (S) subunit (8) (Figure 1).

Calpains (1 and 2) have been detected in every vertebrate cell carefully examined for their presence (5). Different tissues/cells, however, differ widely in their protein ratios. Immunolocalization studies have shown that both, CAPN1 and CAPN2, are located intracellularly along the Z disk/I band regions in the form of intracellular stores (9). Raynaud et al (10) found that CAPN1 is concentrated on the N1 and N2 line region of titin and suggested that this might constitute a reservoir for the cell. Many calpain substrates, including titin, nebulin, filamin, troponin-T and desmin, which attaches the sarcolemma to the Z-disc, are co-localized and proteolyzed during meat tenderization (9). Although calpains are considered to be cytoplasmic enzymes, recent researches have shown that they are also presents in several subcellular organelles such as caveolae vesicles (11), endoplasmic reticulum (ER) (12,13), mitochondria (14), Golgi apparatus and nucleus (15,16) showing the multifunction of this family.

Due to the recent increase in the number of calpain-like molecules, Goll et al (5) proposed a nomenclature system. In this system, calpain genes have been named numerically, *capn1* through *capn15*, and the polypeptides encoded by these genes have also be named numerically, CAPN1 through CAPN15 (Table 1). At present, two small subunits, CAPNS1 and CAPNS2, have been identified as well. The CAPNS1 subunit is an absolute requirement for the stability of both conventional calpain catalytic subunits in vivo, whereas CAPNS2, similar to CAPNS1, has no clear physiological clear role to date (8).

Calpains, based on their domain composition, can be divided into two general classes: "typical"

descrito 15 calpaínas en mamíferos (6). Las dos proteasas más frecuentemente descritas son CAPN1 y CAPN2, denominadas μ - y m-calpaína, aludiendo a la concentración de calcio requerida, micromolar y milimolar, respectivamente (5). Ambas proteasas son heterodiméricas, compuestas cada una de ellas por una subunidad catalítica de 80 kDa y una subunidad reguladora de 28 kDa (7).

Las subunidades de 80 kDa son productos génicos diferentes (genes en los cromosomas 29 y 16 en bovinos, respectivamente). Estas subunidades se pueden dividir en cuatro dominios en función de sus aminoácidos: la región N-terminal; los dominios núcleo de la proteasa: PC1, dominio NH2-terminal, y PC2, dominio catalítico con la tríada característica de las cistein - proteasas (Cys-His-Asn); el dominio tipo C2 (C2L); y el dominio penta - mano - EF de la subunidad grande PEF(L) (8) (Figura 1). La subunidad de 28 kDa, común a ambas calpaínas, tiene dos dominios: el GR (rico en glicina) y el PEF de la subunidad pequeña (S) (8)(Figura 1).

Se ha examinado la presencia de las calpaínas (1 y 2) en las células de vertebrados y se ha detectado la presencia las mismas. (5). Los diferentes tejidos y células difieren ampliamente en la proporción de estas proteínas. Los estudios de inmunolocalización, han demostrado que ambas calpaínas están localizadas intracelularmente a lo largo de las regiones de la banda I de los discos Z en forma de reservas intracelulares (9). Raynaud et al (10) encontraron que la CAPN1 está concentrada en la región de la línea N1 y N2 de la titina y sugirieron que esto podría constituir un reservorio para la célula. Muchos de los sustratos de la calpaína, incluyendo la titina, nebulina, filamina, troponina-T y desmina, cuya funcion es la adherencia del sarcolema al disco Z, son co-localizados y proteolizados durante la tenderización de la carne (9). Aunque las calpaínas se consideran enzimas citoplasmáticas, investigaciones recientes han demostrado que también están presentes en varios orgánulos subcelulares como las vesículas caveolares (11), el retículo endoplásmico (RE) (12,13), las mitocondrias (14), el aparato de Golgi y el núcleo (15,16), mostrando la multifuncionalidad de esta familia.

Debido al reciente aumento del número de calpaínas, Goll et al (5) propusieron un sistema de nomenclatura. En este sistema, los genes de la calpaína han sido nombrados numéricamente, de *capn1* a *capn15*, y los polipéptidos codificados por estos genes también han sido nombrados numéricamente, de CAPN1 a CAPN15 (Tabla 1). En la actualidad, también se han identificado dos pequeñas subunidades, CAPNS1 y CAPNS2.

calpains, those possessing a calmodulin-like domain at their C-terminus, and "atypical" calpains, those lacking a calmodulin-like domain IV at their COOH terminus. Considering their tissue distribution, calpains can also be classified into ubiquitous or tissue-specific calpains (7). The calpain-like molecules reported in bovine to date are described in Table 1.

Calpastatin. Calpastatin (CAST) is the only known endogenous protein inhibitor for calpains. Although only a single calpastatin gene exists in humans, pigs, mice and bovine, more than eight calpastatin isoforms have been identified in the tissues of those organisms, suggesting different levels of translation start at the promoter or alternative splicing mechanisms (6,17).

The genomic sequence of bovine CAST contains 35 exons spanning nearly 130 kbp (18). Based on amino acid sequences, six different domains can be recognized. The XL domain, presents three protein kinase A (PKA) phosphorylation sites, the L domain, which varies in size due to alternative splicing and has been reported to be involved in binding calpastatin to biological membranes having a central role in the regulation of Ca^{2+} channel (19).

Domains I, II, III and IV can inhibit proteolytic activity of either CAPN1 or CAPN2. Each domain has three conserved amino acid sequences, termed subdomains A, B and C respectively. Subdomain A is a 14- amino acid sequence which binds specifically to domain IV of calpain in a Ca^{2+} -dependent manner (7). Subdomain B is a 12-amino acid sequence essential for inhibitory activity. Subdomain C is also a 14-amino acid sequence that binds specifically to domain VI of calpain (Figure 2). The intact protein is capable of simultaneously binding to and inhibiting four calpain molecules (20).

The variation in meat tenderness between species, breeds and individuals is partly responsible for the variation in calpastatin expression and differential transcriptional activity of calpastatin gene promoters (21), therefore it is very important to determine its concentration.

MOLECULAR APPROACH

In this section we highlight data collected about the calpain system polymorphisms at DNA level, expression at RNA level and activity at protein level, and their involvement in the tenderization process.

La subunidad CAPNS1 es un requerimiento indispensable para la estabilidad de las subunidades catalíticas de las calpains convencionales mientras que CAPNS2, similar a CAPNS1, no presenta un claro papel fisiológico hasta la fecha (8).

Las calpaínas, en función de la composición de sus dominios, pueden dividirse en dos clases generales: las calpaínas "típicas", que poseen un dominio tipo-calmodulina en su extremo C-terminal, y las calpaínas "atípicas", que carecen de este dominio en el extremo C-terminal. Considerando su distribución tisular, las calpaínas también pueden clasificarse en ubicuas o específicas (7). Las calpaínas descritas en bovinos hasta la fecha, se describen en la Tabla 1.

Calpastatina. La calpastatina (CAST) es el único inhibidor protéico conocido para las calpaínas. Aunque sólo existe un único gen de calpastatina en humanos, cerdos, ratones y bovinos, se han identificado más de ocho isoformas en los tejidos de estos organismos, lo que sugiere diferentes niveles de traducción desde el promotor o mecanismos alternativos de empalme (6,17).

La secuencia genómica de CAST bovina contiene 35 exones que abarcan casi 130 kbp (18). En base a la secuencia de aminoácidos, se pueden reconocer seis dominios diferentes. El dominio XL, presenta tres sitios de fosforilación de la proteína quinasa A (PKA), el dominio L, que varía en tamaño debido al empalme alternativo y se ha reportado que está involucrado en la unión de la calpastatina a las membranas biológicas, teniendo un rol central en la regulación del canal Ca^{2+} (19).

Los dominios I, II, III y IV pueden inhibir la actividad proteolítica de la CAPN1 o de la CAPN2. Cada dominio tiene tres secuencias de aminoácidos conservadas, denominadas subdominios A, B y C respectivamente. El subdominio A es una secuencia de 14 aminoácidos que se une específicamente al dominio IV de la calpaína de manera dependiente del calcio (7). El subdominio B es una secuencia de 12 aminoácidos esencial para la actividad inhibitoria. El subdominio C es también una secuencia de 14 aminoácidos que se une específicamente al dominio VI de calpaína (Figura 2). La proteína intacta es capaz de unirse e inhibir simultáneamente cuatro moléculas de calpaína (20).

La variación en la terniza de la carne entre especies, razas e individuos es en parte debido a la variación en la expresión de calpastatina y la actividad transcripcional diferencial de los promotores del gen de la calpastatina (21), por lo que es muy importante determinar su concentración.

Table 1. Bovine genes for calpains and their regulatory subunit

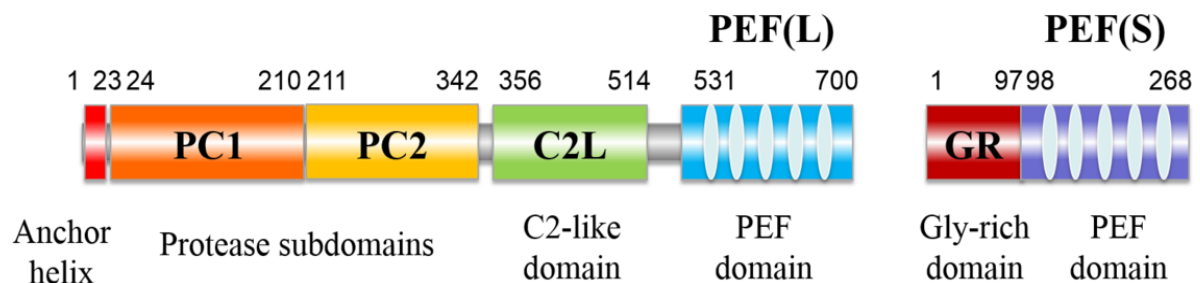
| Gene/ Protein | mRNA accession code | pb | Aliases | protein accession code | Aa | Chrom | Typical/ Atypical | Distribution | Phenotype of gene deficiency in mice | Domains ^a | | | | Splice Variants ^b |
|----------------------------|------------------------|------|-------------------|------------------------------|------|-------|----------------------|--|---|----------------------|------|------|------|---------------------------------|
| | | | | | | | | | | PC | C2L | C2 | PEF | |
| Catalytic subunits | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>capn1</i> | NM_174259 | 2948 | μ-calpain μ80k | NP_776684 | 716 | 29 | Typical | ubiquitously | Platelet dysfunción | + | + | - | + | - |
| <i>capn2</i> | NM_001103086 | 3216 | m-calpain m80K | NP_001096556 | 700 | 16 | Typical | ubiquitously | Embryonic lethal | + | + | - | + | - |
| <i>capn3</i> | NM_174260 | 2955 | nCL-1 p94 | NP_776685 | 822 | 10 | Typical | skeletal muscle, retina and lens specific | Muscular dystrophy | + | + | - | + | + |
| <i>capn5</i> | NM_001192894 | 4487 | nCL-3 hTRA-3 | NP_001179823 | 640 | 15 | Atypical | ubiquitously | Sudden death | + | + | + | - | + |
| <i>capn6</i> | NM_001192231 | 2522 | calpamodulin | NP_001179160 | 641 | X | Atypical | placenta, uterus | Development of embryonic skeletal muscle | + | + | + | - | - |
| <i>capn7</i> | NM_001193181 | 3522 | palBH | NP_001180110 | 813 | 1 | Atypical | ubiquitously | n.r. | + | + | - | - | - |
| <i>capn8</i> | NM_001081619 | 1952 | nCL-2 | NP_001075088 | 381 | 16 | Typical | exclusive to stomach mucosa and the GI track | stress- induced gastric ulcer | + | + | - | - | - |
| <i>capn9</i> | n.r. ^c | n.r. | nCL-4 | n.r. | n.r. | 26 | Typical | exclusive to stomach mucosa and the GI track | stress- induced gastric ulcer | n.r. | n.r. | n.r. | n.r. | n.r. |
| <i>capn10</i> | XM_01082719 | 2103 | calpain 10 | XP_010825497 | 565 | 3 | Atypical | ubiquitously | No significant phenotype | + | + | - | - | + |
| <i>capn11</i> | XM_010818270 | 2402 | calpain 11 | XP_010816572 | 783 | 23 | Typical | testis | n.r. | + | + | - | + | + |
| <i>capn12</i> | NM_001192697 | 2166 | | NP_001179626 | 721 | 18 | Typical | hair follicle | n.r. | + | + | - | + | + |
| <i>capn13</i> | NM_001035360 | 2442 | | NP_001030437 | 516 | 11 | Atypical | ubiquitously | n.r. | + | + | - | - | + |
| <i>capn14</i> | NM_001192425 | 2178 | | NP_001179354 | 685 | 11 | Typical | ubiquitously | n.r. | + | + | - | + | + |
| <i>capn15</i> | XM_005224584 | 5216 | SOLH | XP_005224641 | 1139 | 25 | Atypical | ubiquitously | n.r. | + | - | - | - | + |
| Regulatory subunits | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>capns1</i> | NM_174261 | 1315 | css1 30K | NP_776686 | 263 | 18 | ^d | ubiquitously | Embryonic lethal | - | - | - | + | - |
| <i>capns2</i> | XM_002694786 | 2150 | css2 | XP_002694832 | 246 | 18 | ^d | ubiquitously | n.r. | - | - | - | + | - |

^a+ or - indicates that the molecule has, or does not have, a corresponding domain. For acronyms, see Figure 1,

^b+ or - indicates the presence or absence of splice variants

^c Not yet reported

^d CAPNS1 and CAPNS2 are not calpains according to the definition adopted in this review

**Figure 1.** Schematic structure of calpain.

Conventional calpains are composed of catalytic and small regulatory subunits. Domain structures are defined according to the text. The Anchor helix, the protease core domains (PC1 and PC2); the C2-like domain (C2L); the penta-EF-hand domains of the large and small subunits (PEF(L) and PEF(S)), and the glycine-rich (GR) domain of the small subunit. Residue numbers flanking each domain indicate domain boundaries. Adapted from Sorimachi et al.(8).

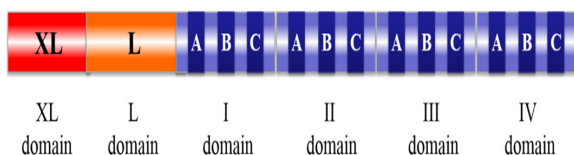


Figure 2. Schematic structure of calpastatin.

Domain structures are defined according to the text. The XL domain contains three protein kinase A (PKA) phosphorylation sites; the L domain, which varies in size due to alternative splicing and has a central role in Ca²⁺ channel regulation; domains I, II, III and IV have three conserved amino acid sequences, termed subdomains A, B and C respectively. Subdomain A binds specifically to domain IV of calpain in a Ca²⁺-dependent manner; subdomain B is essential for inhibitory activity and subdomain C binds specifically to domain VI of calpain.

DNA polymorphisms. There are many single nucleotide polymorphisms (SNPs), however in this review, we will focused in those that are used in commercial tenderness test.

In 2000, the bovine *capn1* gene was mapped to the telomeric end of BTA29 (*Bos taurus* autosome 29) (22) and a QTL (quantitative trait locus) for tenderness was found to segregate in this region (23,24). The markers CAPN1 316, a guanine to cytosine transversion in exon 14 (CC, CG or GG genotype) and CAPN1 530, an adenine to guanine transition in exon 9 (AA, AG, or GG genotype) were identified and associated with shear force values in *Bos Taurus* (25)(Figure 3). Animals homozygous for the C allele at marker 316 had lower shear force than animals of the CG or GG genotype while animals with homozygous G genotype at marker 530 had lower shear force than animals of the AG or AA genotype (26,27). The groups of animals, which were also analyzed with both markers fitted simultaneously, showed that specimens homozygous for the C/G haplotype are associated with the most favourable shear force phenotype. Nevertheless, these markers were not validated in

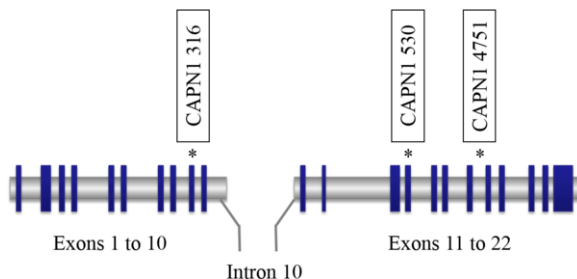


Figure 3. Genomic locations of SNP markers used to predict meat tenderness in *capn1* gene.

Blue boxes represent exon sequences and the grey connective line represents the intron sequence. The SNP encoding meat tenderness is shown as asterisks. The CAPN1 316 marker is a cytidine/guanosine (C/G) transversion in exon 9 (base 5709 of AF252504) found by Page et al. (25). The CAPN1 530 marker is an adenine/guanosine (A/G) transition in exon 14 (base 4558 of AF248054) found by Page et al. (25). CAPN 4751 is a cytidine/thymine (C/T) transition in intron 17 (base 6545 of AF248054) found by White et al. (31).

ENFOQUE MOLECULAR

Esta sección se enfoca en la información descripta sobre el sistema calpaína, destacando los polimorfismos a nivel del ADN, la expresión de genes a nivel de ARN y la actividad a nivel de proteínas, y su implicación en el proceso de la tenderización de la carne.

Polimorfismos de ADN. Se describieron muchos polimorfismos de nucleótidos únicos (SNPs) sin embargo, en esta revisión, nos centraremos en los que se utilizan en las pruebas de terneza comercial.

En el año 2000, el gen bovino *capn1* se mapeó hasta el extremo telomérico de BTA29 (*Bos taurus* autosome 29) (22) y se encontró que un QTL (locus de rasgo cuantitativo) para la terneza se segregaba en esta región (23,24). Los marcadores CAPN1 316, una transversión de guanina a citosina en el exón 14 (genotipo CC, CG o GG) y CAPN1 530, una transición de adenina a guanina en el exón 9 (genotipo AA, AG o GG) fueron identificados y asociados con la dureza en *Bos Taurus* (25) (Figura 3). Los animales homocigóticos para el alelo C en el marcador 316 tuvieron menor dureza que los animales del genotipo CG o GG, mientras que los animales con genotipo G homocigótico en el marcador 530 tuvieron menor dureza que los animales del genotipo AG o AA (26,27). Los genotipos de los animales fueron analizados con ambos marcadores de manera simultánea, y los animales homocigotos para el haplotipo C/G fueron asociados con el fenotipo de dureza mas favorable. Sin embargo, estos marcadores no pudieron validarse en animales *Bos indicus* (28,29). En las razas argentinas, a diferencia de los estudios anteriores, los novillos que heredaron el genotipo AG en el marcador CAPN1 530, presentaron menores valores de dureza (30).

El nuevo marcador CAPN1 4751 fue útil en poblaciones de bovinos de las especies *Bos taurus*, *Bos indicus*, o *Bos indicus* x *Bos taurus* (28,31,33) (Figure 3). Varios estudios realizados en animales de diferentes razas, demostraron que los animales con el genotipo CC para el marcador CAPN 4751 tenían carne mas tierna que aquellos que heredaron el genotipo TT (32-34). Sin embargo, otros autores encontraron que el genotipo CT fue el más favorable en animales *Bos indicus* y en sus cruza con *Bos taurus* (35).

El gen CAST, mapeado en el BTA7, se considera un gen candidato para la terneza de la carne. Se encontraron varios SNP en el gen de la calpastatina (29,36-38). Una transición de adenina a guanina en la región del exón

Bos indicus animals (28,29). In Argentinean breeds, contrary to previous studies, steers inheriting the AG genotype at marker CAPN1 530 had lower shear force (30).

The new marker CAPN1 4751 was useful in populations of *Bos taurus*, *Bos indicus*, or *Bos indicus* x *Bos taurus* crossbred cattle (28,31,32) (Figure 3). Several studies in animals from different breeds demonstrated that those with the CC genotype at CAPN1 4751 had more tender meat than those inheriting the TT genotype (32–34). However, other authors found that the most favourable genotype in *Bos indicus* and its crosses with *Bos taurus* were CT alleles (35).

The *cast* gene, mapped to BTA7, is considered a candidate gene for beef tenderness. Several SNPs were found in calpastatin gene (29,36–38). One adenine to guanine transition in the exon 30/3'UTR region, termed as CAST T1; one guanine to cytosine transversion intron 5, termed UOGCAST, and a cytosine to thymine transition in exon 3 called WSUCAST (Figure 4). Schenkel et al. found a relationship between meat tenderness, measured as WBSF, and genotype in *Bos taurus* (38). Genotype CC yielded beef that was more tender than GG while CG showed intermediate tenderness. All these results indicate that the effects of the markers are breed-specific and cannot be extended to all breeds (29).

Epistasis studies to evaluate possible interactions between SNPs on the CAPN1 gene and SNPs on the CAST gene were conducted and demonstrated that marker CAPN1 4751 has a significant additive-by-additive interaction with the markers WSUCAST and UOGCAST (32). These studies suggest that WSUCAST and UOGCAST are linked and are probably heredity like haplotypes.

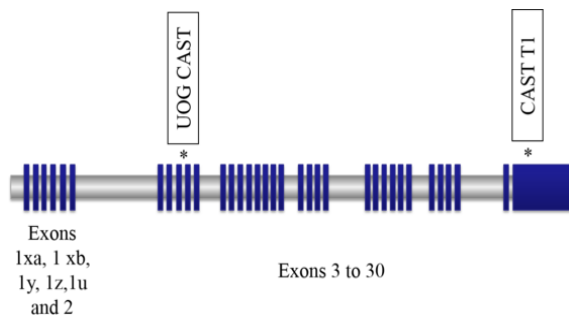


Figure 4. Genomic locations of SNP markers used to predict meat tenderness in cast gene.

Blue boxes represent exon sequences and the grey connective line represents the intron sequence. The SNPs encoding meat tenderness are shown as asterisks. The UOGCAST marker is a cytosine/guanosine (C/G) substitution in intron 5 (base 282 of AY008267) found by Schenkel et al (38). The CAST T1 marker is an adenosine/guanosine (A/G) transition in exon 30 (base 2959 of AF159246) of the 3'UTR region found by Barendse (36).

30/3'UTR, llamada CAST T1; una transversión de guanina a citosina en el intrón 5, llamada UOGCAST, y una transición de citosina a timina en el exón 3 llamada WSUCAST (Figura 4). Schenkel et al. encontraron una relación entre la ternera de la carne, medida como WBSF, y el genotipo en *Bos taurus* para el marcador UOGCAST (38). El genotipo CC produjo carne más tierna que el genotipo GG, mientras que el genotipo CG mostró valores de ternera intermedios. Todos estos resultados indican que los efectos de los marcadores son específicos de las razas y no pueden extenderse a todas las razas (29).

Se realizaron estudios de epistasis para evaluar las posibles interacciones entre los SNPs del gen CAPN1 y los SNPs del gen CAST, demostrando que el marcador CAPN1 4751 tiene una importante interacción aditiva con los marcadores WSUCAST y UOGCAST (32). Estos estudios sugieren que WSUCAST y UOGCAST están vinculados y probablemente son heredados como los haplotipos.

Expresión de ARN. La expresión de las calpaínas y de la calpastatina a nivel del ARNm y de proteínas, se han determinado como estrategia para entender el papel del sistema calpaína en el metabolismo de las proteínas miofibrilares y la tenderización de la carne. En general, la disminución de la expresión de las calpaínas o el aumento de la expresión de la calpastatina están asociados con la dureza de la carne (39).

Algunos autores sugieren que el tipo de músculo y/o el tipo de fibra pueden influir en la expresión y/o actividades de la calpaína y la calpastatina y por lo tanto podrían explicar la proteólisis post mortem y la tenderización de la carne (39–41). Se encontraron diferencias en la subunidad pequeña (CAPNS1) y variantes en la expresión de CAST en los músculos con fibras de tipo lento en comparación con los músculos con fibras de tipo rápido (40). La expresión génica de la calpastatina en promedio es 30% mayor en los grupos con altos valores de WBSF en comparación con los grupos con bajos valores de WBSF a los 6 días post-mortem (42). Además, la abundancia de ARNm de calpaína-1 fue ligeramente mayor, y el ARNm de calpastatina fue menor en el músculo *longissimus lumborum* que en el músculo *infraspinatus* (41), lo que sugiere que la mayor proporción de fibras glicolíticas podría mejorar la ternera de ciertos músculos acelerando la tenderización post mortem debido a la presencia de una mayor proporción de calpaína/calpastatina (43). Otros investigadores sugieren que la menor ternera de la carne de los animales cebúes, no es el resultado de una

RNA expression. The expressions of calpains and calpastatin at the mRNA and protein levels have been often determined in an attempt to understand the role of the calpain system in myofibrillar protein metabolism and meat tenderization. Generally decreased calpain expression or increased calpastatin expression is associated with toughness meat (39).

Some authors suggest that muscle type and/or fiber type can influence calpain and calpastatin expression and/or activities and therefore could account for post mortem proteolysis and meat tenderization (39–41). Differences in the small subunit (CAPNS1) and variants in CAST expression were found in slow-type muscles compared to fast-type muscles (40). Calpastatin gene expression has an average of nearly 30% in high WBSF groups compared with low WBSF at 6 days postmortem (42). Moreover, calpain-1 mRNA abundance was slightly higher and calpastatin mRNA was lower in *longissimus lumborum* than *infraspinatus* (41), suggesting that the higher proportion of glycolytic fibers could improve the tenderness of certain muscles by accelerating post mortem aging due to the presence of a higher calpain/calpastatin ratio (43). Other researcher reveal that the slightly lower tenderness of meat from Zebu animals is probably not a result of lower expression of genes encoding proteases, but rather is due to the increased expression of CAST (44).

Some researchers found that gender alter mRNA levels of the calpain system. They show that bulls had lower WBSF values than heifers, which were accompanied by higher levels of CAPN1 and similar levels of CAST (45). Suggesting that variation in beef tenderness could be modulated through the differential expression of the members of the calpain system.

The maternal energy status during gestation alters meat tenderness. In a recent study, Jennings et al. found up-regulation of CAPN1 in *longissimus muscle* of high diet treatment fetuses (46). Feeding strategies have also impact in meat tenderness. Supplementation with vitamin D and zilpaterol hydrochloride had no significant impact on the expression of calpain-1 and calpastatin mRNA levels (47). Nevertheless, in previous studies in ours laboratories, the supplementation with corn silage during finishing alter calpains (1 and 2) and calpastatin expression, and meat tenderness, suggesting that managing feeding system has a regulatory effect on biological processes that occur in the muscle, defining the final quality of the meat.

menor expresión de los genes que codifican las proteasas, sino que se debe a la mayor expresión de CAST (44).

Ademas, algunos investigadores encontraron que el sexo altera los niveles de ARNm del sistema calpaína. Los resultados muestran que, los toros presentan valores de WBSF menores que las vaquillonas, valores acompañados a niveles más altos de CAPN1 y similares de CAST (45). Sugiriendo que la variación en la terneza de la carne podría ser modulada a través de la expresión diferencial de los miembros del sistema calpaína.

El estado energético de las vacas durante la gestación altera la terneza de la carne. En un estudio reciente, Jennings et al. encontraron un aumento de la regulación del gen CAPN1 en el músculo *longissimus* de fetos sometidos a tratamientos nutricionales de alto contenido energético (46). Las estrategias de alimentación utilizadas también tienen un impacto en la terneza de la carne. La suplementación con vitamina D y clorhidrato de zilpaterol no tuvo un impacto significativo en la expresión de los niveles de mRNA de la calpaína-1 y la calpastatina (47). Sin embargo, en estudios previos realizados en nuestros laboratorios, la suplementación con silo de maíz durante la terminación altera la expresión de las proteasas calpaína (1 y 2) y del inhibidor calpastatina, como así también la terneza de la carne, sugiriendo que el manejo del sistema de alimentación tiene un efecto regulador sobre los procesos biológicos que ocurren en el músculo, definiendo la calidad final de la carne.

También se evaluó la relación entre los polimorfismos descritos anteriormente y la expresión génica. Niciura et al (48) encontraron que la expresión del gen CAST fue dos veces mayor en el músculo de los animales homocigotos para el genotipo GG con respecto a los animales con genotipo AG en el marcador CAST T1. Natrass et al (49) determinaron esta relación en ganado *Bos indicus* y *Bos taurus* y encontraron diferencias en la expresión de los genes de la CAPN1 y la CAST entre las variantes favorables y desfavorables de estos marcadores (marcadores CAPN1 4751 y CAST T1), sugiriendo un efecto polimórfico en la expresión génica. Estos hallazgos sugieren que las diferencias en la terneza de la carne explicadas por los marcadores genéticos podrían ser una consecuencia de la alteración en los niveles de ARNm, actividad, velocidad y (o) extensión de la proteólisis post mortem en el músculo esquelético. Los nuevos estudios deben tratar de identificar los eventos

The relationship between polymorphism described above and gene expression was also evaluated. Niciura et al (48) found that CAST was expressed twice as much in muscle of homozygous GG as in heterozygous AG in the CAST T1 marker. Natrass et al (49) investigated this relationship in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle and found differences in CAPN1 and CAST gene expression between favourable and unfavourable allelic variants of these genes (CAPN1 4751 and CAST T1 markers), indicating a polymorphic effect on gene expression. These findings suggest that differences in tenderness explained by gene markers could be a consequence of the alteration in their mRNA levels, protein activity and rate and (or) the extent of postmortem proteolysis in skeletal muscle. Studies should try to identify genetic and epigenetic events that may control the differential gene expression attributed to polymorphism.

Protein quantification and activity. Although Ca^{2+} -dependent proteases were identified in 1964, until the 90s there were no details of the procedures for extraction and determination of calpain proteolytic system activities.

It has been demonstrated that pH and temperature cause dramatic effects on CAPN1 autolysis and activity (50,51). Increased temperature or decreased pH cause a more rapid decline in CAPN1 activity. Calpastatin activity also decreased at elevated temperatures (51,52) while its inhibition of CAPN1 was apparently uninfluenced by pH (50). It is important to note that different temperatures and pH were studied by these authors, but during postmortem meat tenderness these parameters vary together; studies to perform these analyses are needed to determine the overall effect generated during aging.

During the storage period, the evidence suggest that CAPN1 and CAST activities declined significantly, whereas CAPN2 activity remained stable (9,53,54). In a recent research, calpain-1 activity was detected up to 42 days of post-mortem, and autolyzed calpain-1 up to 70 days post-mortem. The calpain-2 activity increase during the aging period, peaking at day 42 before decreasing sharply at day 70 (55). Differences in activity could be ascribed to the type of muscle chosen or the cattle breed. Although some researchers suggested that loss of CAPN1 and CAST activities is due to the proteolytic degradation of these molecules, while others attributed it to extensive autolysis of CAPN1 and the breakdown of CAST possibly by calpains (39,56), it is uncertain whether the masking effect proposed by Kristensen et al.

genéticos y epigenéticos que pueden controlar la expresión genética diferencial atribuida a los polimorfismos.

Cuantificación y actividad de proteínas.

Aunque las proteasas dependientes del Ca^{2+} fueron identificadas en 1964, hasta la década de los 90 no existían detalles de los procedimientos de extracción y determinación de la actividad de las proteínas del sistema calpaína.

Se ha demostrado que el pH y la temperatura producen efectos drásticos en la autólisis y actividad del CAPN1 (50,51). El aumento de la temperatura o la disminución del pH provoca una disminución rápida de la actividad proteica de la CAPN1. La actividad de la calpastatina también disminuye a temperaturas elevadas (51,52) mientras que la inhibición de la proteína CAPN1 no fue influenciada por el pH (50). Es importante señalar que estos autores estudiaron diferentes temperaturas y pH, pero durante la tenderización post mortem de la carne estos parámetros varían juntos; por esto, se necesitan nuevos estudios que determinen el efecto conjunto generado durante la maduración de la carne.

Durante el período de maduración de la carne, se ha determinado que las actividades de CAPN1 y CAST disminuyeron significativamente, mientras que la actividad de CAPN2 permaneció estable (9,53,54). En una investigación reciente, se detectó actividad de la proteína calpaína 1 hasta 42 días pos mortem, y actividad de la proteína autolizada hasta 70 días post mortem. Sin embargo, la actividad de la calpaína-2 se vio aumentada durante el período de maduración, alcanzando su punto máximo en el día 42 y luego disminuyó bruscamente (55). Las diferencias observadas por los diferentes autores en la actividad de las proteínas pueden atribuirse al tipo de músculo o a la raza del ganado elegido. Aunque algunos investigadores sugirieron que la pérdida de actividad de CAPN1 y CAST se debe a la degradación proteolítica de las mismas; otros autores atribuyeron la pérdida de actividad por autólisis de la CAPN1 y a la ruptura de CAST por las calpaínas (39,56), sin embargo, es incierto si el efecto de enmascaramiento propuesto por Kristensen et al (57) es la causa real de la disminución de la actividad de calpastatina. Estos autores demostraron que las proteínas del sistema de calpaína son estables durante el período de almacenamiento a -20°C o -80°C y que la actividad de la calpastatina está subestimada. Estos resultados sugieren que la calpaína 1 contribuye a al comienzo del proceso de tenderización de la carne post mortem y que la calpaína 2 es responsable de la tenderización durante procesos de maduración prolongados.

is the real cause of the decline in calpastatin activity (57). These authors demonstrated that the calpain system proteins are stable during the frozen storage period at -20°C or -80°C and that calpastatin activity is underestimated. These results suggest that calpain 1 contribute to early postmortem tenderization improvement and calpain 2 is responsible for additional tenderization during extended aging.

Calpastatin activity in muscle from older animals is more persistent postmortem than in muscle from growing animals (58). This difference may contribute to decreased protein degradation and increased toughness of beef from mature cattle, even after aging. These authors, also found that CAPN1 activity per unit of CAST activity in the muscle from growing animals is greater than in mature animals. Tissues with a greater CAPN1: total CAST ratio is expected to allow more postmortem protein degradation than tissues with a lesser CAPN1: total CAST ratio. Differences between young bulls and steers in CAPN1 and CAPN2 protein quantification were also detected (59). This effect could be the result of sex hormone action as previous studies have shown (60).

Feeding strategies during the growing and finishing phases have also impact in protein expression and meat tenderness (61). A recently study suggest that calpains, and most probably CAPN1, are more active in *longissimus dorsi* than in *infraspinatus* (63). In recently studies in our laboratories, finishing animals with corn-silage produced changes in CAPN1 and CAST activity (not published). Feeding strategies can modulate muscle protein turnover, muscle energy levels at slaughter and water holding capacity; and consequently, can modify meat tenderness, the pH/T decline curve and sensory characteristics of meats. Thus, one of the goals to successfully implement a compensatory feeding approach is to establish the length of the compensatory period which results in the highest muscle protein degradation potential at the time of slaughter.

In conclusion Calpain system plays a central role in postmortem proteolysis and meat tenderization. Studies over the last decade indicate that CAPN1, CAPN2 and CAST plays an important role in postmortem degradation of myofibrillar proteins and tenderization of muscle during refrigerated storage. Polymorphisms in CAPN1 and CAST were evaluated as tools to predict meat tenderness, nevertheless, the results indicate that the effects of the markers are breed-specific. Muscle type, fiber type, gender, age and feeding strategies can influence calpain and calpastatin expression and/or activities. Muscle conversion involves

La actividad de la calpastatina en el músculo de animales de mayor edad es más persistente post mortem que en el músculo de animales en crecimiento (58). Esta diferencia puede contribuir a la disminución de la degradación de las proteínas y al aumento de la dureza de la carne bovina, incluso después de la maduración. Estos autores también encontraron que la actividad de CAPN1 por unidad de actividad de CAST en el músculo de animales en crecimiento es mayor que en animales de mayor edad. Se espera que los tejidos con una mayor proporción CAPN1: CAST permitan una mayor degradación de las proteínas post mortem que los tejidos con una menor proporción CAPN1: CAST. También se detectaron diferencias entre toros jóvenes y novillos (59). Este efecto podría ser el resultado de la acción de las hormonas sexuales, como han sugerido otros autores en estudios anteriores (60).

Las estrategias de alimentación durante las fases de crecimiento y terminación también tienen un impacto en la expresión de proteínas y en la terneza de la carne (61). Un estudio reciente sugiere que las calpaínas, y muy probablemente CAPN1, son más activas en el músculo *longissimus dorsi* que en el músculo *infraspinatus* (62). En estudios recientes en nuestros laboratorios, la terminación de animales con silo de maíz produjo cambios en la actividad de CAPN1 y CAST (no publicado). Las estrategias de alimentación pueden modular el recambio o "turnover" de las proteínas musculares, los niveles de energía muscular al momento del sacrificio y la capacidad de retención de agua y, en consecuencia, pueden modificar la terneza de la carne, la curva de disminución del pH/T y las características sensoriales de la carne. Por lo tanto, uno de los objetivos para implementar con éxito estrategias de alimentación que generen un efecto compensatorio es establecer la duración del período compensatorio que resulte en el mayor potencial de degradación de la proteína muscular en el momento del sacrificio.

En conclusión el sistema calpaína juega un papel central en la proteólisis post mortem y tenderización de la carne. Los estudios realizados en la última década indican que CAPN1, CAPN2 y CAST desempeñan un papel importante en la degradación post mortem de las proteínas miofibrilares y la tenderización del músculo durante el proceso de maduración. Los polimorfismos descritos en los genes CAPN1 y CAST fueron evaluados como herramientas para predecir la terneza de la carne, sin embargo, los resultados indican que los efectos de los marcadores son específicos de la raza. El tipo de músculo, el tipo de fibra, el sexo, la edad y las

several complex processes influenced by pre- and postmortem handling. New studies should try to identify the genetic and epigenetic events that may control the differential gene expression to explain these processes. New researches should focus on understanding how these polymorphisms/genes/proteins interact with the environment or with other genes, affecting economic traits.

Acknowledgments

This work was supported in part by the Federal Projects of Productive Innovation (PFIP-ESPRO MINCYT N° 413/09) and by Research and Developmental Projects of National Agency of Ministry of Science and Technology of Argentina (PID, 007/20011).

estrategias de alimentación pueden influir en la expresión y/o las actividades de las calpaínas y la calpastatina. La conversión muscular involucra varios procesos complejos influenciados por el manejo pre y post mortem. Los nuevos estudios deben tratar de identificar los eventos genéticos y epigenéticos que puedan controlar la expresión génica diferencial para explicar estos procesos. Las nuevas investigaciones deben centrarse en comprender cómo estos polimorfismos/genes/proteínas interactúan con el medio ambiente o con otros genes, afectando los rasgos económicos.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por los Proyectos Federales de Innovación Productiva (PFIP-ESPRO MINCYT N° 413/09) y por los Proyectos de Investigación y Desarrollo de la Agencia Nacional del Ministerio de Ciencia y Tecnología de Argentina (PID, 007/20011).

REFERENCES

- Henchion MM, McCarthy M, Resconi VC. Beef quality attributes: A systematic review of consumer perspectives. *Meat Sci* 2017; 128:1–7.
- Destefanis G, Brugiapaglia A, Barge MT, Dal Molin E. Relationship between beef consumer tenderness perception and Warner–Bratzler shear force. *Meat Sci* 2008; 78(3):153–156.
- Herrera-Mendez CH, Becila S, Boudjellal A, Ouali A. Meat ageing: Reconsideration of the current concept. *Trends Food Sci Technol* 2006; 17(8):394–405.
- Koohmaraie M, Geesink GH. Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat Sci* 2006; 74(1):34–43.
- Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The Calpain System. *Physiol Rev* 2003; 83(3):731–801.
- Campbell RL, Davies PL. Structure–function relationships in calpains. *Biochem J* 2012; 447:335–351.
- Ono Y, Sorimachi H. Calpains - An elaborate proteolytic system. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* 2012; 1824(1):224–236.
- Sorimachi H, Hata S, Ono Y. Impact of genetic insights into calpain biology. *J Biochem* 2011; 150(1):23–37.
- Varricchio E, Russolillo MG, Maruccio L, Velotto S, Campanile G, Paolucci M, et al. Immunological detection of m- and μ -calpains in the skeletal muscle of Marchigiana cattle. *Eur J Histochem* 2013; 57:10–15.
- Raynaud F, Fernandez E, Coulis G, Aubry L, Vignon X, Bleimling N, et al. Calpain 1 – titin interactions concentrate calpain 1 in the Z-band edges and in the N2-line region within the skeletal myofibril. *FEBS J* 2005; 272:2578–2590.
- Shaikh S, Samanta K, Kar P, Roy S, Chakraborti T, Chakraborti S. m-Calpain-mediated cleavage of Na⁺/Ca²⁺ exchanger-1 in caveolae vesicles isolated from pulmonary artery smooth muscle. *Mol Cell Biochem* 2010; 341:167–180.
- Samanta K, Kar P, Chakraborti T, Chakraborti S. An Overview of Endoplasmic Reticulum Calpain System. In: Chakraborti S, Dhalla N, editors. *Proteases in Health and Disease Advances in Biochemistry in Health and Disease*. New York, NY: Springer; 2013.

13. Samanta K, Kar P, Chakraborti T, Shaikh S, Chakraborti S. Characteristic properties of endoplasmic reticulum membrane m-calpain, calpastatin and lumen m-calpain: A comparative study between membrane and lumen m-calpains. *J Biochem* 2010; 147(5):765-779.
14. Kar P, Samanta K, Shaikh S, Chowdhury A, Chakraborti T, Chakraborti S. Mitochondrial calpain system: An overview. *Arch Biochem Biophys* 2010; 495(1):1-7.
15. Hood JL, Logan BB, Sinai AP, Brooks WH, Roszman TL. Association of the calpain/calpastatin network with subcellular organelles. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310(4):1200-1212.
16. Honda S, Marumoto T, Hirota T, Nitta M, Arima Y, Ogawa M, et al. Activation of m-calpain is required for chromosome alignment on the metaphase plate during mitosis. *J Biol Chem* 2004; 279(11):10615-10623.
17. Raynaud P, Jayat-Vignoles C, Laforêt MP, Levéziel H, Amarger V. Four promoters direct expression of the calpastatin gene. *Arch Biochem Biophys* 2005; 437(1):69-77.
18. Raynaud P, Gillard M, Parr T, Bardsley R, Amarger V, Levéziel H. Correlation between bovine calpastatin mRNA transcripts and protein isoforms. *Arch Biochem Biophys* 2005; 440:46-53.
19. Djadjid ND, Nikmard M, Zakeri S, Gholizadeh S. Characterization of calpastatin gene in Iranian Afshari sheep. *Iran J Biotechnol* 2011; 9(2):145-149.
20. Hanna RA, Garcia-Diaz BE, Davies PL. Calpastatin simultaneously binds four calpains with different kinetic constants. *FEBS Lett* 2007; 581(16):2894-2898.
21. Kemp CM, Sensky PL, Bardsley RG, Buttery PJ, Parr T. Tenderness - An enzymatic view. *Meat Sci* 2010; 84(2):248-256.
22. Smith TPL, Casas E, Rexroad CE, Kappes SM, Keele JW, Smith TPL, et al. Bovine CAPN1 maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat tenderness. *J Anim Sci* 2000; 78:2589-2594.
23. Casas E, Shackelford SD, Keele JW, Stone RT, Kappes SM, Koohmaraie M. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. *J Anim Sci* 2000; 78:560-569.
24. Morris CA, Daly CC, Cullen NG, Hickey SM. Correlations among beef carcass composition and meat quality traits from a genetic marker trial. *Proc New Zeal Soc Anim Prod* 2001; 61:96-99.
25. Page BT, Casas E, Heaton MP, Cullen NG, Hyndman DL, Morris CA, et al. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. *J Anim Sci* 2002; 80:3077-3085.
26. Page BT, Casas E, Quaas RL, Thallman RM, Wheeler TL, Shackelford SD, et al. Association of markers in the bovine CAPN1 gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. *J Anim Sci* 2004; 82:3474-3481.
27. Morris CA, Cullen NG, Hickey SM, Dobbie PM, Veenvliet BA, Manley TR, et al. Genotypic effects of calpain 1 and calpastatin on the tenderness of cooked M. longissimus dorsi steaks from Jersey x Limousin, Angus and Hereford-cross cattle. *Anim Genet* 2006; 37:411-414.
28. Casas E, White SN, Riley DG, Smith TPL, Brenneman RA, Olson TA, et al. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. *J Anim Sci* 2005; 83(1):13-19.
29. Allais S, Journaux L, Levéziel H, Payet-Duprat N, Raynaud P, Hocquette JF, et al. Effects of polymorphisms in the calpastatin and μ -calpain genes on meat tenderness in 3 French beef breeds. *J Anim Sci* 2011; 89:1-11.
30. Corva PM, Soria L, Schor A, Villarreal E, Cenci MP, Motter M, et al. Association of CAPN1 and CAST gene polymorphisms with meat tenderness in *Bos taurus* beef cattle from Argentina. *Genet Mol Biol* 2007; 30:1064-1069.

31. White SN, Casas E, Wheeler TL, Shackelford SD, Koohmaraie M, Riley DG, et al. A new single nucleotide polymorphism in CAPN1 extends the current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent. *J Anim Sci* 2005; 83:2001–2018.
32. Pinto LF, Ferraz JB, Meirelles F V., Eler JP, Rezende FM, Carvalho ME, et al. Association of SNPs on CAPN1 and CAST genes with tenderness in Nellore cattle. *Genet Mol Res* 2010; 9(3):1431–1442.
33. Casas E, White SN, Wheeler TL, Shackelford SD, Koohmaraie M, Riley DG, et al. Effects of calpastatin and u - calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *J Anim Sci* 2006; 84:520–5.
34. Mazzucco JP, Melucci LM, Villarreal EL, Mezzadra C a, Soria L, Corva P, et al. Effect of ageing and μ -calpain markers on meat quality from Brangus steers finished on pasture. *Meat Sci* 2010; 86(3):878–882.
35. Curi RA, Chardulo LAL, Mason MC, Arrigoni MDB, Silveira AC, De Oliveira HN. Effect of single nucleotide polymorphisms of CAPN1 and CAST genes on meat traits in Nellore beef cattle (*Bos indicus*) and in their crosses with *Bos taurus*. *Anim Genet* 2009; 40:456–462.
36. Barendse W. DNA markers for meat tenders. Queensland (AU); US 2004/0115678: 2002.
37. Garcia MD, Michal JJ, Gaskins CT, Reeves JJ, Ott TL, Liu Y, et al. Significant association of the calpastatin gene with fertility and longevity in dairy cattle. *Anim Genet* 2006; 37:304–305.
38. Schenkel F, Miller S, Jiang Z, Mandell I, Ye X, Li H, et al. Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *J Anim Sci* 2006; 84:291–299.
39. Ilian MA, Morton JD, Kent MP, Couteur CE Le, Hickford J, Cowley R, et al. Intermuscular variation in tenderness: Association with the ubiquitous and muscle-specific calpains. *J Anim Sci* 2001; 79:122–132.
40. Muroya S, Neath KE, Nakajima I, Oe M, Shibata M, Ojima K, et al. Differences in mRNA expression of calpains, calpastatin isoforms and calpain/calpastatin ratios among bovine skeletal muscles. *Anim Sci J* 2012; 83:252–259.
41. Saccà E, Corazzin M, Pizzutti N, Lippe G, Piasentier E. Early post mortem expression of genes related to tenderization in two Italian Simmental young bulls' skeletal muscles differing in contractile type. *Anim Sci J* 2015; 1-8
42. Gandolfi G, Pomponio L, Ertbjerg P, Karlsson AH, Nanni Costa L, Lametsch R, 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 Sci* 2011; 88:694–700.
43. Ouali A, Talmant A. Calpains and calpastatin distribution in bovine, porcine and ovine skeletal muscles. *Meat Sci* 1990; 28(4):331–348.
44. Giusti J, Castan E, Dal Pai M, Arrigoni MDB, Rodrigues Baldin S, De Oliveira HN. Expression of genes related to quality of Longissimus dorsi muscle meat in Nellore (*Bos indicus*) and Canchim (5/8 *Bos taurus* × 3/8 *Bos indicus*) cattle. *Meat Sci* 2013; 94:247–252.
45. Mberema CHH, Lietz G, Kyriazakis I, Sparagano OAE. The effects of gender and muscle type on the mRNA levels of the calpain proteolytic system and beef tenderness during post-mortem aging. *Livest Sci* 2016; 185:123–130.
46. Jennings TD, Gonda MG, Underwood KR, Wertz-Lutz AE, Blair AD. The influence of maternal nutrition on expression of genes responsible for adipogenesis and myogenesis in the bovine fetus. *Animal* 2017; 10(10):1697–1705.
47. Korn KT, Lemenager RP, Claeys MC, Waddell JN, Engstrom M, Schoonmaker JP. Supplemental vitamin D3 and zilpaterol hydrochloride. II. Effect on calcium concentration, muscle fiber type, and calpain gene expression of feedlot steers. *J Anim Sci* 2013; 91:3332–3340.
48. Niciura SCM, Ibelli AMG, Gouveia GV, Gromboni JGG, Rocha MIP, de Souza MM, et al. Polymorphism and parent-of-origin effects on gene expression of CAST, leptin and DGAT1 in cattle. *Meat Sci* 2012; 90(2):507–510.
49. Nattrass GS, Cafe LM, McIntyre BL, Gardner GE, McGilchrist P, Robinson DL, et al. A post-transcriptional mechanism regulates calpastatin expression in bovine skeletal muscle. *J Anim Sci* 2014; 92(2):443–455.

50. Maddock KR, Huff-Lonergan E, Rowe LJ, Lonergan SM. Effect of pH and ionic strength on mu- and m-calpain inhibition by calpastatin. *J Anim Sci* 2005; 83(6):1370-1376.
51. Pomponio L, Ertbjerg P. The effect of temperature on the activity of u- and m-calpain and calpastatin during post-mortem storage of porcine longissimus muscle. *Meat Sci* 2012; 91(1):50-55.
52. Geesink GH, Bekhit AD, Bickerstaffe R. Rigor temperature and meat quality characteristics of lamb longissimus muscle. *J Anim Sci* 2000; 78:2842-2848.
53. Camou JP, Marchello J a., Thompson VF, Mares SW, Goll DE. Effect of postmortem storage on activity of u- and m-calpain in five bovine muscles. *J Anim Sci* 2007; 85:2670-2681.
54. Colle MJ, Doumit ME. Effect of extended aging on calpain-1 and -2 activity in beef longissimus lumborum and semimembranosus muscles. *Meat Sci Elsevier*; 2017; 131:142-145.
55. Phelps KJ, Drouillard JS, Silva MB, Miranda LDF, Ebarb SM, Van Bibber-Krueger CL, et al. Effect of extended postmortem aging and steak location on myofibrillar protein degradation and warner-bratzler shear force of beef M. semitendinosus steaks. *J Anim Sci* 2016; 94(1):412-423.
56. Magolski JD, Berg EP, Hall NL, Anderson VL, Keller WL, Jeske TM, et al. Evaluation of feedlot cattle working chute behavior relative to temperament, tenderness, and postmortem proteolysis. *Meat Sci* 2013; 95:92-97.
57. Kristensen L, Christensen M, Ertbjerg P. Activities of calpastatin, u-calpain and m-calpain are stable during frozen storage of meat. *Meat Sci* 2006; 72:116-120.
58. Cruzen SM, Paulino PVR, Lonergan SM, Huff-Lonergan E. Postmortem proteolysis in three muscles from growing and mature beef cattle. *Meat Sci* 2014; 96(2):854-861.
59. Guillemin N, Jurie C, Cassar-Malek I, Hocquette JF, Renand G, Picard B. Variations in the abundance of 24 protein biomarkers of beef tenderness according to muscle and animal type. *Animal* 2011; 5(6):885-894.
60. Lee CE, McArdle A, Griffiths RD. The role of hormones, cytokines and heat shock proteins during age-related muscle loss. *Clin Nutr* 2007; 26(5):524-534.
61. Kristensen L, Therkildsen M, Riis B, Sørensen MT, Oksbjerg N, Purslow PP, et al. Dietary-induced changes of muscle growth rate in pigs : Effects on in vivo and postmortem muscle proteolysis and meat quality. *J Anim Sci* 2002; 820:2862-2871.
62. Saccà E, Pizzutti N, Corazzin M, Lippe G, Piasentier E. Assessment of calpain and caspase systems activities during ageing of two bovine muscles by degradation patterns of α II spectrin and PARP-1. *Anim Sci J* 2016; 87:462-466.