



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ÉVELYN RANGEL DOS SANTOS

**DESEMPENHO, EXPRESSÃO GÊNICA DA μ -CALPAÍNA E
CALPASTATINA E QUALIDADE DA CARNE DE SUÍNOS
MACHOS NÃO CASTRADOS E IMUNOCASTRADOS**

Londrina
2021

ÉVELYN RANGEL DOS SANTOS

**DESEMPENHO, EXPRESSÃO GÊNICA DA μ -CALPAÍNA E
CALPASTATINA E QUALIDADE DA CARNE DE SUÍNOS
MACHOS NÃO CASTRADOS E IMUNOCASTRADOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora.

Orientadora: Prof. Dra. Ana Maria Bridi

Londrina
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

E93 Santos, Evelyn Rangel dos .
Desempenho, expressão gênica da μ -calpaína e calpastatina e qualidade da carne de suínos machos não castrados e imunocastrados / Evelyn Rangel dos Santos. - Londrina, 2021.
106 f. : il.

Orientador: Ana Maria Bridi.
Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2021.
Inclui bibliografia.

1. Uso de suínos machos não castrados e imunocastrados - Tese. 2. Expressão gênica da μ -calpaína e calpastatina - Tese. 3. Qualidade de carne - Tese. 4. Desempenho - Tese. I. Bridi, Ana Maria . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 636

ÉVELYN RANGEL DOS SANTOS

**DESEMPENHO, EXPRESSÃO GÊNICA DA μ -CALPAÍNA E
CALPASTATINA E QUALIDADE DA CARNE DE SUÍNOS MACHOS
NÃO CASTRADOS E IMUNOCASTRADOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof. Dra. Ana Maria Bridi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Caio Abércio da Silva
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Leandro Dalcin Castilha
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Dra. Luiene Moura Rocha
Centre de Développement du porc de Québec
inc.

Prof. Dr. Mario Luiz Chizzotti
Universidade Federal de Viçosa - UFV

Londrina, 23 de fevereiro de 2021.

Dedico...

*Aos meus pais Antonio e Selma, minha base e meus maiores
incentivadores. Aqueles que não medem esforços para a
realização dos meus objetivos e sonhos, o meu amor infinito.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à **Deus** e a minha mãezinha **Nossa Senhora Aparecida**, a quem recorro em todos os momentos de minha vida. Gratidão por todas as bênçãos a mim concedidas.

Aos meus pais **Antonio Dimas dos Santos** e **Selma Regina da Silva Rangel Santos**, que são tudo para mim. Não existem palavras que expressem o quanto sou grata por existirem em minha vida, obrigada por me guiarem, por sempre me incentivarem e não me deixar nunca desistir de um sonho. Todas as vezes em que eu caio, são vocês que me levantam, por isso todas as minhas vitórias também são suas. Amo vocês com todo meu coração. Ao meu irmão **Ewerton Rangel dos Santos**, meu parceiro e meu maior exemplo, a quem sempre irei me inspirar. Obrigada por me apoiar em todas as etapas da vida. Te amo muito maninho. Agradeço também a minha cunhada **Gisele Rodrigues de Araújo Rangel** e ao xodozinho e alegria da família meu sobrinho e afilhado **Arthur Araújo dos Santos**. Amo muito vocês.

À minha orientadora **Dra. Ana Maria Bridi**, muito obrigada por esses 11 anos de convivência. Todo meu respeito e admiração pela excelente profissional que me inspirou e sempre irá me inspirar. Muito obrigada por todos os ensinamentos, puxadas de orelha, elogios e incentivos, que me impulsionaram e me fizeram adquirir conhecimento, crescer academicamente e pessoalmente, e superar os desafios ao longo desses anos. A senhora não só fez parte, mas tem uma grande parcela em muitas de minhas conquistas, serei eternamente grata por isso. Muito obrigada por tudo.

Ao professor **Dr. Caio Abécio da Silva**, obrigada por ser um exemplo de profissional para mim. Agradeço por todo suporte, ensinamentos e por sempre estar disposto a me ajudar. O senhor foi imprescindível em todos esses anos, sempre somando conhecimento. Sou muito grata por tudo e por contribuir em mais uma etapa da minha vida acadêmica.

Ao **Dr. Cleandro Pazinato Dias**, a quem eu muito admiro profissionalmente, e foi de extrema importância. Obrigada por agregar muito conhecimento durante esses anos na pós-graduação e pela disponibilidade em contribuir novamente nessa etapa.

Ao professor **Dr. Leandro Dalcin Castilha**, a **Dra. Luiene Moura Rocha** e ao professor **Dr. Mario Luiz Chizzotti**, pelo aceite e disposição em contribuir e agregar seus conhecimentos a essa tese, meus sinceros agradecimentos.

A todos professores do Departamento de Zootecnia e do programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina. Às secretárias **Sandra da Silva** e **Helenice Kieski**, pela atenção e por estarem sempre dispostas a me auxiliar. Aos

*funcionários da Fazenda Escola, em especial ao Sr. **Pedro, José e Jorge**, que muito contribuíram para a condução prática dessa tese.*

*Ao projeto de extensão “Desenvolvimento participativo da cadeia produtiva sustentável de aves e leite em assentamentos rurais”. Aos membros, em especial as professoras Dras. **Ana Bridi, Carolina Muniz e Amanda Schuntzemberger** por todo suporte. E a minha parceira e amiga **Lais Santana**, que contribuiu imensamente para que eu participasse do projeto ao mesmo tempo em que realizava o experimento da tese, toda minha gratidão a você. A **Secretaria da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SETI)** pela concessão da bolsa.*

*Ao **Programa de Doutorado Sanduiche no Exterior (PDSE)/CAPES** e à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão das bolsas de estudos no **Canada** e no **Brasil**. Ao **Centro de Pesquisa Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC)**. Ao meu coorientador no exterior Dr. **Luigi Faucitano**, obrigada por tornar possível minha estada no **Canada**, pelos ensinamentos e por me proporcionar essa experiência inesquecível. Agradeço a sua equipe, Dra. **Sabine Conte** e Dra. **Genevieve Drouin**, que me receberam muito bem e compartilharam muito conhecimento, e em especial a Dra **Luiene Moura Rocha** que sempre se mostrou paciente e muito disposta em me ensinar seus valiosos conhecimentos. Agradeço também aos amigos que o **Canada** me deu, vocês tornaram tudo ainda mais especial, **Aliny Novais, Pier-Luc Larrivé, Normand Dery, Fernanda Balderas, Mengqi Wang, Thaís Maia, Danyel Dalto** e a minha best friend **Olivia**.*

*A todos integrantes e ex-integrantes da graduação e pós-graduação do **Grupo de Pesquisa e Avaliação de Carnes e Carcaças (GPAC)**. Sem vocês a condução deste trabalho não seria possível, esforço coletivo traz resultados ainda mais positivos. Aprendi muito com todos e serei eternamente grata por toda ajuda e por tudo que aprendi com todos. Em especial, aos meus amigos e parceiros da pós-graduação, minha família em Londrina, que muito me apoiaram em todos esses anos e fizeram tudo ser melhor. Muito obrigada por tudo e sentirei muitas saudades, meus sinceros agradecimentos à **Amanda Barro, Guilherme Agostinis, Daniela Terto, Jéssica Vero, Louise Peres, Nayara Andreo, Ana Paula Ayub, Evelyn Stivaletti, Catia Barata, Camila Rogel, Barbara Giangareli, Fernanda Lisboa, Edmara Correia e Victor Furlan**.*

*Às minhas amigas **Ní nive Corletto e Carla Rosolém** que me acompanharam em todas as fases durante a realização dessa tese, estando sempre dispostas a me escutar e a me apoiar. Muito obrigada por tudo. Por fim, a todos que contribuíram de alguma forma para a realização dessa tese, os meus sinceros agradecimentos.*

*“Without data, you are just another person
with an opinion.”*

Deming, W. E.

SANTOS, Évelyn Rangel dos. **Desempenho, expressão gênica da μ -calpaína e calpastatina e qualidade da carne de suínos machos não castrados e imunocastrados**. 2021. 106 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar o desempenho, a expressão gênica da μ -calpaína e calpastatina e a qualidade da carne de suínos machos não castrados e imunocastrados. O presente estudo foi dividido em dois artigos. Ambos utilizaram 40 suínos machos de genética comercial no período de terminação, divididos em dois tratamentos de 20 animais cada: não castrados e imunocastrados. **Artigo A:** Foram avaliados o desempenho, indicadores de estresse e qualidade da carne de suínos machos. Suínos não castrados apresentaram maiores órgãos reprodutivos do que imunocastrados, exceto a glândula bulbouretral. Suínos não castrados apresentaram menor ingestão diária de ração e melhor conversão alimentar do que imunocastrados. Suínos não castrados apresentaram maior grau de lesão nas carcaças do que suínos imunocastrados. Em média, as carcaças de suínos não castrados foram classificadas como ligeiramente lesionadas e as carcaças de suínos imunocastrados foram classificadas como não lesionadas. Para níveis de cortisol e valor de R, não houve diferença entre tratamentos. Suínos não castrados apresentaram níveis de escatol e níveis de corte de escatol mais altos do que imunocastrados. A carne de suínos não castrados apresentou maiores níveis de umidade, proporções de ácidos graxos insaturados, poliinsaturados, ômega 6 e relação poliinsaturados:saturados e menores porcentagens de proteína e níveis de ácidos graxos saturados do que a carne de imunocastrados. Na avaliação sensorial realizada por provadores não treinados avaliando a carne em geral (odor e sabor), suínos não castrados apresentaram maiores pontuações do que imunocastrados. Na avaliação sensorial realizada por painelistas treinados, a carne e gordura de suínos não castrados foram avaliadas com maiores pontuações para as características de: odor geral na gordura e na carne; odor sexual na gordura e odor e sabor sexual na carne; odor de escatol e androstenona na gordura e na carne em relação a carne e gordura de suínos imunocastrados. Este estudo promove evidências de que existem diferenças estabelecidas entre os sexos, mas estas diferenças não comprometeram a qualidade e a aceitabilidade da carne de suínos não castrados. Entretanto, a fim de possibilitar a produção e o consumo da carne de suínos não castrados no Brasil, estes resultados precisam ser mais explorados. **Artigo B:** Foram avaliadas a expressão gênica da calpaína-1 e da calpastatina e a qualidade da carne de suínos machos. Quanto às medidas de carcaça e qualidade da carne, suínos não castrados apresentaram menores valores de profundidade de músculo, espessura de gordura subcutânea, valor de L* e perda de água por cozimento do que imunocastrados. Suínos não castrados apresentaram maior expressão do gene calpaína-1 e menor expressão do gene calpastatina do que imunocastrados. Este estudo mostra que combinada a outros fatores, a expressão gênica pode contribuir para maior maciez na carne de suínos não castrados devido à sua maior expressão de calpaína-1 e menor expressão de calpastatina, comparada à suínos imunocastrados.

Palavras-chave: Escatol. Imunocastração. Maciez. Odor sexual. Sensorial.

SANTOS, Evelyn Rangel dos. **Performance, μ -calpain and calpastatin gene expression and meat quality of boars and immunocastrated pigs.** 2021. 106 pp. Thesis (PhD in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the performance, gene expression of μ -calpain and calpastatin and meat quality of boars and immunocastrated pigs. The present study was divided in two articles. Both used 40 male pigs from commercial genetics at finishing period, assigned in two treatments of 20 animals each: entire male (boars) and immunocastrated. **Artigo A:** The performance, stress indicators and meat quality of male pigs were evaluated. Boars presented higher reproductive organs than immunocastrated pigs, except the bulbourethral gland. Boars presented lower daily feed intake and better feed conversion than immunocastrated pigs. Boars showed a higher degree of lesion in the carcass than immunocastrated pigs. In average, boar carcasses classified as lightly lesioned and immunocastrated pig carcasses classified as no lesion. For cortisol levels and R-value there was no difference between treatments. Boars presented higher skatole levels and skatole cut-off levels than immunocastrated pigs. Meat of boars presented higher levels of moisture, unsaturated, polyunsaturated, omega 6, and polyunsaturated and saturated ratio of fatty acids and lower percentage of protein and saturated fatty acids than meat of immunocastrated pigs. In the sensory evaluation performed by untrained tasters evaluating meat in general (odor and flavor), boars scored higher than immunocastrated. In the sensory evaluation performed by trained panelists, the meat and fat of boars were evaluated with higher scores for: general odor in fat and meat; boar taint odor in fat and boar taint odor and flavor in meat; skatole and androstenone odor in fat and meat, than the meat and fat of immunocastrated pigs. This study promotes evidence that there are established differences between genders, but these differences did not compromise the quality and acceptability of boar meat. However, to enable the production and consumption of boar meat in Brazil, these results need to be further explored. **Artigo B:** The calpain-1 and the calpastatin gene expression and meat quality of male pigs were evaluated. Regarding carcass measurements and meat quality, boars presented lower values of muscle depth, subcutaneous fat thickness, L* value and cook loss than the immunocastrated pigs. The boars presented greater calpain-1 gene expression and lower calpastatin gene expression than immunocastrated pigs. This study shows that combined with other factors the gene expression can contribute to a tender meat from boars due to their higher calpain-1 expression and lower calpastatin expression than those of immunocastrated male pigs.

Keywords: Boar taint. Immunocastration. Sensory. Skatole. Tenderness.

LISTA DE FIGURAS

- Artigo A – Desempenho, indicadores de estresse e qualidade da carne de suínos machos não castrados e imunocastrados44**
- Figura 1 – Avaliação semanal da largura testicular em suínos não castrados e imunocastrados na fazenda. As diferenças médias em cada semana são indicadas por * e *** para $P < 0,05$ e $P < 0,001$, respectivamente80**
- Figura 2 – Percentual de provadores não treinados em cada pontuação geral, odor e sabor, na avaliação sensorial da carne de suínos não castrados e imunocastrados. As diferenças medias em cada pontuação são indicadas por * para $P < 0,05$81**
- Figura 3 – Odor geral da gordura e da carne e sabor geral da carne de suínos machos na avaliação sensorial de provadores treinados. As diferenças médias em cada parâmetro sensorial são indicadas por ** e *** para $P < 0,01$ e $P < 0,001$, respectivamente. Pontuação: (1) extremamente bom, (2) muito bom, (3) bom (4) indiferente, (5) ruim, (6) muito ruim e (7) extremamente ruim82**
- Figura 4 – Odor e sabor sexual (A), escatol (B) e androstenona (C) na gordura e carne de suínos machos na avaliação sensorial de provadores treinados. As diferenças médias em cada parâmetro sensorial são indicadas por *, ** e *** para $P < 0,05$, $P < 0,01$ e $P < 0,001$, respectivamente. Escala: (1) nenhum, (2) extremamente fraco, (3) muito fraco, (4) fraco, (5) forte, (6) muito forte e (7) extremamente forte83**

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA	16
Tabela 1 – Alternativas a castração cirúrgica de suínos machos.....	19
Artigo A – Desempenho, indicadores de estresse e qualidade da carne de suínos machos não castrados e imunocastrados	44
Tabela 1 – Composição nutricional e percentual de energia das rações fornecidas aos suínos machos não castrados e imunocastrados no período de terminação	75
Tabela 2 – Órgãos reprodutivos de suínos machos não castrados e imunocastrados pós-abate	76
Tabela 3 – Desempenho de suínos machos não castrados e imunocastrados no período de terminação.	77
Tabela 4 – Indicadores de estresse, compostos de odor sexual e composição química da carne de suínos machos não castrados e imunocastrados.....	78
Tabela 5 – Perfil de ácidos graxos e oxidação lipídica em <i>Longissimus thoracis et lumborum</i> de suínos machos não castrados e imunocastrados.....	79
Artigo B – Efeitos do gênero na qualidade da carne suína e na expressão gênica da calpaina-1 e calpastatina no músculo de suínos machos	84
Tabela 1 – Efeitos do gênero (suínos machos não castrados x imunocastrados) sobre as características de carcaça.	103
Tabela 2 – Efeitos do gênero (suínos machos não castrados x imunocastrados) sobre a qualidade da carne	104
Tabela 3 – Efeitos de gênero (suínos machos não castrados x imunocastrados) sobre a expressão gênica da calpaina-1 e calpastatina no músculo <i>Longissimus thoracis et lumborum</i>	105

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	MERCADO DA CARNE SUÍNA	17
2.2	CONTEMPORIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE SUÍNOS NÃO CASTRADOS	18
2.2.1	Cenário Europeu	18
2.2.2	Cenário Brasileiro.....	20
2.3	SUÍNOS NÃO CASTRADOS	21
2.3.1	Odor Sexual na Carne de Suínos Não Castrados.....	22
2.4	CASTRAÇÃO CIRÚRGICA.....	25
2.5	IMUNOCASTRAÇÃO.....	26
2.6	BEM-ESTAR DE SUÍNOS MACHOS	27
2.7	<i>RIGOR MORTIS</i>	30
2.8	EXPRESSÃO DOS GENES μ -CALPAÍNA E CALPASTATINA.....	31
3	REFERÊNCIAS	35
4	HIPÓTESE	42
5.	OBJETIVOS	43
5.1	OBJETIVO GERAL.....	43
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
6	ARTIGO A – Desempenho, indicadores de estresse e qualidade da carne de suínos machos não castrados e imunocastrados	44
	RESUMO.....	44
	INTRODUÇÃO	45
	MATERIAL E MÉTODOS	47
	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
	CONCLUSÃO.....	63
	REFERÊNCIAS	64

7	ARTIGO B – Efeitos do gênero na qualidade da carne suína e na expressão gênica da calpaina-1 e calpastatina no músculo de suínos machos	84
	RESUMO	84
	INTRODUÇÃO	84
	MATERIAL E MÉTODOS	85
	RESULTADOS	91
	DISCUSSÃO	92
	CONCLUSÃO.....	95
	REFERÊNCIAS	95
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	106

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um importante *player* no mercado mundial de suínos, ocupando o quarto lugar como produtor e exportador de carne suína (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL, 2020). Considerando o cômputo do abate anual, todos os suínos machos vêm sendo submetidos à castração cirúrgica ou à imunocastração em decorrência da legislação nacional que, desde 1952 até 2020, estabelecia esta conduta como obrigatória. Essa condição foi baseada no fato de que esses animais poderiam apresentar odor desagradável na carne, conhecido como odor sexual. Esse defeito sensorial é causado por dois compostos, escatol e androstenona, que, quando acumulados no tecido adiposo e expostos ao calor (cocção), exalam odor de fezes e de urina e suor, respectivamente (CLAUS; WEILER; HERZOG, 1994). Entretanto, desde 18 de agosto de 2020 o abate de suínos não castrados passou a ser permitido no Brasil de acordo com o Decreto nº 10.468, art. 3 (BRASIL, 2020a).

Esta decisão se insere nas fortes tendências mundiais de atendimento dos preceitos de melhorar o bem-estar animal. Reflexo da preocupação de produtores e consumidores, além da busca por novos mercados de exportação que também seguem estas premissas. Sendo assim, é inevitável a procura por alternativas à castração cirúrgica para evitar ou diminuir a dor e estresse causados aos animais (SILVA; RIBEIRO, 2020). A imunocastração surgiu como uma tecnologia que por meio de uma vacina pode evitar o odor sexual na carne, permitindo paralelamente que os animais sejam beneficiados com os efeitos dos esteroides testiculares no momento de crescimento e deposição de músculo na carcaça (DUNSHEA *et al.*, 2001).

Os suínos não castrados possuem vantagens em relação aos suínos castrados cirurgicamente, como menor ingestão diária de ração, melhor conversão alimentar, maior deposição de proteína, menor porcentagem de gordura subcutânea e menor excreção de fezes e de poluentes como nitrogênio (ALUWÉ *et al.*, 2019). Entretanto, esses animais tendem a ser mais agressivos e exibir um comportamento sexual crescente. Adicionalmente, a carne de suínos não castrados é mais susceptível à apresentação do odor sexual, tem em geral pior capacidade de retenção de água, menor presença de gordura (o que torna a carne menos adequada para produtos secos curados, tais como presuntos) e menor maciez em relação aos suínos castrados cirurgicamente (IPEMA WEBINAR, 2020).

Muitos fatores podem influenciar a qualidade da carne, como a classe sexual do animal, que, paralelamente, é determinante no crescimento muscular (LAWRIE, 2005). O principal mecanismo relacionado à proteólise que conduz ao amaciamento da carne é o sistema enzimático denominado calpaínas. Esse sistema é formado por duas calpaínas, μ -calpaína e m-calpaína, ativadas pelo cálcio livre e inibidas por uma proteína, denominada calpastatina. Assim, quanto maior for a atividade da calpastatina, maior será a força de cisalhamento e menor será a maciez da carne (KOOHMARAIE, 1992).

A mudança da produção de suínos castrados cirurgicamente para a produção de suínos não castrados ou imunocastrados pode afetar o processamento e as propriedades da carne *in natura* e de produtos cárneos devido às mudanças na qualidade/quantidade de gordura e na qualidade da carne. O reconhecimento das possíveis diferenças entre as categorias sexuais, além do completo monitoramento da qualidade da matéria prima, é essencial para superar as variações e otimizar o processamento desta proteína animal. Estratégias de gerenciamento para evitar uma diminuição da qualidade precisam ser consideradas em fazendas, frigoríficos e fábricas de processamento (ŠKRLEP *et al.*, 2020).

Portanto, com a permissão do abate de suínos não castrados no Brasil, é premente o desenvolvimento de estudos que explorem as diferenças entre os estados reprodutivos dos suínos machos, buscando assim soluções que viabilizem sua produção, comercialização e o consumo desta carne. Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi investigar o efeito do gênero de suínos machos (imunocastrados e não castrados) no desempenho, na expressão gênica da μ -calpaína e calpastatina e na qualidade da carne.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MERCADO DA CARNE SUÍNA

O desenvolvimento do setor produtivo de carne suína depende da globalização da economia mundial e dos processos associados à liberalização do comércio, fluxos de capital e tecnologias empregadas (SZYMAŃSKA, 2017). A produção mundial de carne suína em 2019 foi de 101.977 mil Toneladas e o Brasil ocupa a quarta posição no ranking mundial (China: 42.550 mil/Ton; União Europeia: 23.935 mil/Ton; Estados Unidos: 12.542 mil/Ton; Brasil: 3.983 mil/Ton; Rússia: 3.321 mil/Ton e outros Países: 15.646 mil/Ton). Além disso, o Brasil também ocupa a quarta posição na exportação mundial de carne suína (União Europeia: 3.551 mil/Ton; Estados Unidos: 2.867 mil/Ton; Canadá: 1.284 mil/Ton; Brasil: 750 mil/Ton; México: 230 mil/Ton e outros Países: 540 mil/Ton) (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL, 2020).

Em 2019 a produção brasileira de carne suína foi de 3.983 milhões de toneladas, havendo um aumento de 0,23% e 5,65% em relação aos anos de 2018 e 2017, respectivamente. Desse total, 81% foram destinadas ao mercado interno e 19% às exportações. O consumo *per capita* de carne suína no Brasil em 2019 foi de 15,3 kg/habitante e, do total de suínos abatidos no Brasil, destacaram-se os Estados de Santa Catarina (29,59%); Paraná (19,85%); Rio Grande do Sul (19,26%); Minas gerais (11,16%); Mato grosso (6,71%); São Paulo (6,71%); Mato Grosso do Sul (6,71%) e Goiás (3,54%) (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL, 2020).

A crescente inserção da suinocultura brasileira no mercado mundial e o aumento do consumo interno de carne suína são consequências de uma trajetória de sucesso econômico deste segmento, que se estrutura em mudanças organizacionais e no contínuo incremento tecnológico ocorrido no Brasil (VIEIRA, 2014). A qualidade da carne suína é resultado de diversos elos da cadeia produtiva, sendo o manejo produtivo parte essencial, envolvendo a incorporação de metodologias, processos, produtos e tecnologias. Nesse contexto, englobam-se ainda as práticas de alimentação animal, biossegurança, bem-estar animal, boas práticas de produção, rastreabilidade e cuidados com o meio ambiente (EMBRAPA, 2020).

A carne suína é fonte de proteína, vitaminas do complexo B, zinco e selênio, havendo variações em sua composição de acordo com o corte cárneo. Com

exceção da costela, os principais cortes de carne suína desprovidos de gordura de cobertura apresentam conteúdo acima de 18% de proteína, 2% a 7% de gordura e entre 60 mg/kg e 70 mg/kg de colesterol. Os ácidos graxos predominantes na gordura suína são os monoinsaturados, que representam mais de 40% dos ácidos graxos totais. Já o conteúdo de ácidos graxos ômega-3 é baixo (entre 0,5% e 1%).

Além da composição química, as características sensoriais da carne suína influenciam diretamente a decisão dos consumidores, incluindo aroma, textura, maciez, cor e aparência. Portanto, a indústria direciona seus esforços de produção na busca de produtos que estejam dentro de um determinado padrão de qualidade, embora as expectativas dos consumidores possam apresentar algumas variações dependendo da localização geográfica e da etnia (BERTOL; OLIVEIRA; SANTOS FILHO, 2019).

2.2 CONTEMPORIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE SUÍNOS NÃO CASTRADOS

2.2.1 Cenário Europeu

Na Europa, a proporção de suínos machos não castrados aumentou nas Ilhas Britânicas, Península Ibérica, Holanda, Alemanha e França (BEE, CHEVILLON; BONNEAU, 2015; MCGLONE, 2012). A castração de suínos na Europa está regulamentada pela Diretiva 2008/120 do Conselho da União Europeia, de 18 de dezembro de 2008, relativa às normas mínimas para a proteção dos suínos, na qual estabelece que a castração cirúrgica pode ser realizada por um médico veterinário ou por pessoas treinadas e sem anestesia até 7º dia de vida, por meios que não sejam por descolamento dos testículos e sob condições higiênicas. Além disso, acima do 7º dia de idade, a castração pode ser realizada somente por um Médico Veterinário, sob anestesia seguida de analgesia prolongada (CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA, 2008).

Preocupados em priorizar o bem-estar na produção de suínos machos e evitar o sofrimento dos animais submetidos a castração cirúrgica, em 2010 foi assinada a Declaração Europeia sobre alternativas à castração de suínos (Tabela 1) e a proposta de abandonar voluntariamente, na Europa, a castração cirúrgica até 1 de janeiro de 2018 (EUROPEAN COMMISSION, 2010; POVOD; LOZYNSKA; SAMOKHINA, 2019).

Tabela 1 - Alternativas a castração cirúrgica de suínos machos.

Alternativa	Vantagens	Desvantagens
Castração		
Castração cirúrgica com anestesia e/ou analgesia	Redução da dor durante a castração cirúrgica	Aumento dos custos; necessidade de profissionais treinados
Imunocastração	Sem dor da castração; vantagem econômica de melhor desempenho; aplicável em sistemas de produção com engorda prolongada	Risco de auto injeção pelo operador; custos operacionais; aceitabilidade questionável pelos consumidores e produtores
Criação de suínos machos não castrados		
Abate em idade mais jovem/ menor peso (antes de puberdade)	Sem conflito com o bem-estar animal; redução do risco de altos níveis de androstenona e escatol; vantagem econômica de melhor desempenho	Sem garantia de eliminação total do odor sexual; Eficiência econômica questionável
Manipulações dietéticas	Sem conflito com o bem-estar animal; redução do risco de altos níveis de escatol; vantagem econômica de melhor desempenho	Sem garantia de eliminação total do odor sexual; custos elevados de ingredientes; não é uma solução para sistemas de produção com engorda prolongada
Seleção contra odor sexual	Nenhum conflito com bem-estar animal; redução do risco de altos níveis de androstenona e escatol; vantagem econômica de melhor desempenho	Sem garantia de total eliminação do odor sexual; não é uma solução para sistemas de produção com engorda prolongada; redução dos níveis de hormônios anabolizantes (efeitos negativos sobre o crescimento e desempenho de suínos machos)
Separação de sexo		
Sexagem espermática	Produção somente de rebanhos de fêmeas	Custos elevados, baixa saída espermática; técnica para seleção de gênero não é comercialmente disponível

Fonte: Čandek-Potokar, Škrlep e Zamaratskaia (2017, p.111).

Com o aumento da produção de suínos não castrados e imunocastrados, a indústria europeia está enfrentando grandes desafios para adaptar o processamento da carne *in natura* e de produtos cárneos devido às mudanças nas propriedades da qualidade de carne. Essa adaptação torna-se possível por meio de

estudos e pesquisas das diferenças entre as categorias sexuais, buscando soluções aplicáveis à cadeia suinícola (ŠKRLEP *et al.*, 2020).

2.2.2 Cenário Brasileiro

No Brasil, o Decreto nº 30.691, art. 121, de 29 de março de 1952, do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), proibia o abate de suínos não castrados ou de suínos que demonstrassem sinais de castração recente. Além disso, no art. 172, ainda definia: “[...] carnes repugnantes - são assim consideradas e condenadas as carcaças que apresentem mau aspecto, coloração anormal ou que exalem odores medicamentosos, excrementícias, sexuais e outros considerados anormais” (BRASIL, 1952, p.35).

Em 2014 a portaria nº 60, art. 1, de 26 de março da Agência de Defesa Agropecuária do Paraná (ADAPAR), normatizou o abate de suínos não castrados no Estado do Paraná, desde que os mesmos apresentassem idade inferior a seis meses, as carcaças e vísceras fossem identificadas e separadas das demais nas câmaras frias e todas as carcaças fossem submetidas ao teste de cocção e degustação, a fim de detectar e eliminar carcaças que apresentassem odor sexual (PARANÁ, 2014).

O Decreto nº 30.691 de 1952 foi atualizado em 2017 pelo RIISPOA, entretanto, ainda assim, no Decreto nº 9.013, art. 104, de 29 março de 2017, permanecia proibido o abate de suínos não castrados ou que mostrassem sinais de castração recente (BRASIL, 2017). Em 2020, o Decreto nº 10.468, art. 3, de 18 de agosto, revogou o art. 104 do Decreto nº 9.013 de 2017. Assim, no Brasil, o abate de suínos não castrados é permitido e conforme disposto no art. 198, os estabelecimentos passam a ser responsáveis pela segregação e destinação industrial de carcaças com odor sexual (BRASIL, 2020a). A permissão do abate de suínos não castrados foi concedida pois segundo o RIISPOA:

[...] não há correlação entre a presença de testículos e condições sanitárias ou fraude e adulteração da carne. Odor sexual pode estar presente, inclusive, em animais criptorquidas, monorquidas ou hermafroditas, implicando, apenas, no aspecto sensorial da carne ou dos produtos com ela elaborados” (BRASIL, 2020b, p. 28).

2.3 SUÍNOS NÃO CASTRADOS

Devido ao aumento das concentrações de andrógenos e estrogênios durante o desenvolvimento pubertário, o potencial de crescimento dos suínos machos não castrados é superior em relação aos suínos castrados cirurgicamente. Somada a esta características, são evidenciadas menor ingestão diária de ração; ganho de peso superior; melhor conversão alimentar; maior deposição proteica; menor porcentagem de gordura subcutânea; menor idade de abate para o mesmo peso que o castrado; menor excreção de fezes e de poluentes como nitrogênio, fósforo e CO₂; melhora no bem-estar dos animais pela ausência de dor e sofrimento causados pela castração; e menor custo com ração e mão-de-obra utilizada na castração (ALUWÉ *et al.*, 2019; BABOL; SQUIRES, 1995; ROEST *et al.*, 2009).

Embora a produção de suínos machos não castrados apresente vantagens, esses animais demonstram maiores comportamentos agressivos e sexuais, que favorecem à maior incidência de lesões na pele, o que contribui negativamente para a qualidade da carcaça e da carne (TURNER *et al.*, 2006). Neste tema, algumas medidas para minimizar estes danos podem ser adotadas, como o alojamento separadamente destes das fêmeas, a fim de evitar prenhez prematura indesejada e estabelecer grupos homogêneos, com densidade adequada e em baias estruturadas com enriquecimento ambiental (IPEMA WEBINAR, 2020).

Algumas desvantagens em relação a qualidade da carne dos suínos não castrados podem ser observadas. Além da possível presença do odor sexual na carne, pode haver uma maior ocorrência de anomalias DFD (*dark, firm e dry*), aumento da gordura insaturada (podendo ser prejudicial para o processamento de produtos curados a seco) e o menor teor lipídico intramuscular, o que pode fazer com que a carne seja menos macia em relação aos suínos castrados (BONNEAU *et al.*, 2018). Assim, para este gênero, é aconselhável aumentar o conteúdo de gordura intramuscular por meio da criação seletiva ou da nutrição, o que pode contribuir para aliviar a questão da maciez da carne (IPEMA WEBINAR, 2020).

O odor sexual afeta a aceitabilidade e o consumo de carne suína *in natura* e de produtos cárneos. O efeito dos compostos que causam o odor sexual é mais elevado no odor que no sabor da carne, entretanto o odor afeta diretamente o consumo. A aceitabilidade da carne suína depende dos níveis de androstenona e escatol. Embora existam pessoas anósmicas a androstenona (ou seja, não

conseguem detectar a presença desse composto), estas podem detectar a presença de escatol, constituindo um risco quando os níveis de escatol forem muito altos. A sensibilidade dos consumidores à androstenona é maior nas mulheres e geralmente consumidores sensíveis têm uma menor aceitabilidade da carne suína. Entretanto, os métodos e condições de preparação e cocção podem modificar a percepção do odor sexual (FONT-I-FURNOLS, 2012).

A carne com odor sexual pode, até certo ponto, ser utilizada de forma sustentável em produtos processados, desde que medidas apropriadas sejam tomadas (IPEMA WEBINAR, 2020). A redução do odor sexual e as estratégias de mascaramento, como as culturas microbianas iniciais, processamento térmico, uso de especiarias com sabor distinto, defumação e diluição com matéria prima não contaminada provaram ser uma solução viável para superar os problemas de odor sexual e outros problemas de qualidade (ŠKRLEP *et al.*, 2020).

2.3.1 Odor Sexual na Carne de Suínos Não Castrados

A carne dos suínos machos não castrados possui um odor sexual desagradável, causado principalmente por dois compostos, androstenona e escatol. A androstenona (5α -androst-16-ene-3-ona) é um esteroide produzido nos testículos que se acumula nos tecidos adiposos, associado ao odor de urina. O escatol (3-metilindol) é uma substância não específica dos animais machos, sendo um produto da degradação microbiológica do triptofano no intestino, estando associado ao odor fecal (DUNSHEA, 2001).

Assim, como a testosterona, a androstenona é um hormônio esteroide produzido nos testículos pelas células de Leydig. Porém, o efeito fisiológico da androstenona não é androgênico. Sua ação primária é como feromônio, estimulando funções as reprodutivas na fêmea suína (CLARKE *et al.*, 2008; ZAMARATSKAIA, 2004). A androstenona tem sua produção controlada pelo sistema neuroendócrino, particularmente pelo hormônio luteinizante (LH). O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), produzido pelo hipotálamo, é o principal regulador da secreção de LH, que se liga aos receptores na superfície das células de Leydig, resultando na indução das enzimas da esteroidogênese e no aumento dos níveis de esteroides testiculares (androstenona) (EINARSSON, 2006). Parte da androstenona é secretada e transportada via corrente sanguínea para as glândulas salivares,

servindo como feromônio, promovendo um comportamento sexual nas fêmeas, enquanto outra parte, devido a sua natureza lipofílica, é depositada no tecido adiposo, onde se acumula gerando odor (JAROS *et al.*, 2005; ZAMARATSKAIA, 2004).

A androstenona é metabolizada pelo fígado, podendo ser eliminada pela bile ou voltar para corrente sanguínea por meio de circulação entero-hepática. O acúmulo de androstenona pode ser afetado pela taxa de síntese de esteroides livres e sulfatados nas células de Leydig, pela taxa de metabolismo no fígado e pela taxa de circulação entero-hepática do intestino de volta para a corrente sanguínea (SQUIRES; BONE; CAMERON, 2020).

Para a síntese de androstenona, a expressão de genes correlacionados e a atividade das principais enzimas envolvidas em sua biossíntese devem ser avaliadas, assim como a extensão de sua sulfoconjugação e as diferenças no seu carreamento no sangue e subsequente desconjugação e absorção de esteroides (16-androstene) por adipócitos e células musculares. Para o metabolismo de androstenona, suínos que produzem altos níveis devem ser identificados, por exemplo, medindo os níveis deste composto no plasma aos 21 dias de idade (SQUIRES; BONE; CAMERON, 2020).

Ao contrário da androstenona o escatol é produzido tanto nos machos quanto nas fêmeas, sendo oriundo da ação da flora intestinal normal dos suínos, no cólon, que atuam na degradação do aminoácido triptofano (YOKOYAMA; CARLSON, 1979). O mesmo é na sequência absorvido pela corrente sanguínea e metabolizado pelo fígado e segue para o plasma e para o tecido adiposo, acumulando-se na gordura dos suínos machos à medida que se tornam maduros sexualmente (ANDRESSEN, 2006).

Os níveis de escatol são muito mais altos nos machos não castrados em relação as fêmeas, uma vez que os esteroides testiculares inibem sua degradação pelo fígado. Em suínos machos castrados, mesmo que baixos, ainda são encontrados níveis de escatol, assim a maior deposição de escatol em suínos machos não castrados pode estar associada à superprodução de androstenona, sendo possível concluir o envolvimento dos hormônios sexuais na regulação do citocromo hepático P450IIE1 (CYP2E1). O CYP2E1 é a principal enzima hepática responsável pelo metabolismo do escatol, e sua indução é antagonizada por altos níveis de androstenona, o que levaria a uma baixa expressão de CYP2E1 e por consequência,

uma elevada acumulação de escatol no tecido adiposo de suínos machos não castrados (DORAN *et al.*, 2002).

Os níveis de escatol podem ser afetados pela taxa de síntese no intestino, incluindo o efeito da composição da microbiota intestinal, taxa de captação do intestino e taxa de degradação no fígado e posterior excreção (SQUIRES; BONE; CAMERON, 2020). Como o escatol é um produto da degradação microbiana, existem estratégias que podem influenciar o ecossistema microbiano no intestino dos suínos para reduzir as bactérias formadoras de escatol. Tais estratégias incluem intervenções alimentares que ocasionam mudanças no pH intestinal. As bactérias produtoras de escatol são favorecidas sob condições ácidas (pH 5,0), enquanto as bactérias produtoras de indol predominam em condições básicas (pH 8,0) (JENSEN; COX; JENSEN, 1995; JENSEN; JENSEN, 1998). Alimentos com alto teor de fibra (AGERGAARD *et al.*, 1995) e com alto nível de carboidratos indigestíveis (CLAUS *et al.*, 1994) podem reduzir a produção e o armazenamento de escatol, visto que, uma grande disponibilidade de energia no intestino grosso estimula a proliferação de bactérias que usam o triptofano para a síntese proteica, ao invés de degradá-lo à escatol (BONNEAU; SQUIRES, 2000).

Estudos evidenciaram que a inclusão de beterraba doce (WHITTINGTON *et al.*, 2004; WOOD *et al.*, 1993), amido de batata cru (CLAUS *et al.*, 2003; ZAMARATSKAIA *et al.*, 2005), ou chicória (JENSEN; HANSEN, 2006; ØVERLAND *et al.*, 2011) nas dietas podem diminuir a deposição de escatol. A maior eficácia de uma intervenção alimentar para reduzir as concentrações de escatol no tecido adiposo ocorre se o alimento afetar várias etapas de sua síntese e deposição. Assim, as intervenções alimentares mais eficientes são a adição de inulina ou amido de batata cru, que influenciam o ecossistema microbiano, através do pH intestinal, da disponibilidade de energia para bactérias e da disponibilidade de triptofano através de possíveis efeitos anti-apoptóticos (WESOLY; WEILER, 2012). A atividade antimicrobiana de extratos vegetais selecionados ou componentes de óleo essencial de ervas e especiarias também podem oferecer estratégias adicionais para reduzir a formação de escatol (WESOLY; WEILER, 2012).

Outros compostos podem contribuir para o odor sexual e incluem aldeídos e ácidos graxos de cadeia curta, como fenóis (p-cresol, 4-etilfenol) e 4-fenil-3-buten-2-ona. Estes compostos podem agir aumentando os efeitos do escatol e androstenona para causar o odor sexual (ZAMARATSKAI; SQUIRES, 2009). O

acúmulo de androstenona e escatol é regulado pelo equilíbrio entre a síntese e a degradação desses compostos. Isto pode ser afetado por vários fatores, incluindo ambiente e práticas de gestão, maturidade sexual, nutrição e genética (SQUIRES; BONE; CAMERON, 2020).

2.4 CASTRAÇÃO CIRÚRGICA

Geralmente, a castração cirúrgica em leitões machos é realizada sem qualquer anestesia ou analgesia durante os primeiros dias ou semanas de vida. Após a contenção dos leitões é realizada uma única incisão em cada lado do escroto. Os testículos são removidos cortando ou puxando o cordão espermático para que ele se rompa. O corte do cordão espermático pode ser realizado com bisturi, ou com um emasculador que prende o cordão por alguns segundos para limitar sangramento. Um antisséptico é aplicado na ferida aberta e os leitões são devolvidos as suas baias. As consequências da castração sobre o bem-estar podem ser atribuídas ao próprio processo cirúrgico doloroso, bem como a privação dos hormônios testiculares (PRUNIER *et al.*, 2006).

A castração cirúrgica de leitões, sem administração de anestesia ou analgesia para o alívio da dor, muda o comportamento desses animais imediatamente após o procedimento. Leitões castrados cirurgicamente abanam menos a cauda, demonstram menor comportamento agressivo e ficam mais tempo em pé ou sentados inativos em comparação aos leitões não castrados, o que pode ser um indicativo de dor (YUN *et al.*, 2019). De acordo com Saller *et al.* (2020), a injeção intratesticular de anestésico local em leitões antes da castração reduz as respostas cardiovasculares (pressão arterial e frequência cardíaca) relacionadas à dor, em comparação à castração sem anestésico local. Entretanto, a injeção de anestésicos locais causa dor visível, como demonstrado pelo aumento dos movimentos dos membros locomotores dos leitões. Além disso, nesse estudo, os efeitos analgésicos da anestesia local durante a castração foram avaliados em leitões sob narcose leve, o que significa que a dor foi avaliada com a exclusão de estresse e medo, portanto, se os leitões fossem castrados conscientes, estes fatores poderiam influenciar no comportamento e na percepção da dor.

A utilização da anestesia geral ou local melhora a técnica de castração cirúrgica. Entretanto, a anestesia promove a redução de dor aguda no momento da

castração, mas não elimina o estresse e o desconforto devido a captura e o manejo dos animais antes da cirurgia, e tampouco impede que depois de passado seu efeito o animal sinta dor crônica (THUN; GAJEWSKI; JANETT, 2006). Embora a castração cirúrgica elimine a possibilidade de desenvolvimento do odor sexual na carne, o método leva à piora da conversão alimentar e da retenção de nitrogênio, além de propiciar uma menor relação carne magra: gordura, quando comparado aos animais não castrados, sendo ainda considerado um método altamente invasivo e estressante, prejudicando o bem-estar (SILVA, 2013).

2.5 IMUNOCASTRAÇÃO

A castração cirúrgica de machos inteiros é uma prática recorrente dentro do sistema de produção de suínos, porém aos poucos tem sido substituída pela castração imunológica. A imunocastração é um método menos invasivo e estressante ao animal, além de ser considerado benéfico ao sistema de produção de suínos, pois permite que o animal utilize seus próprios hormônios para maximizar seu desempenho e melhorar sua conformação corporal (SILVA, 2013). A imunocastração é definida pela aplicação de uma vacina anti-GnRH (fator liberador de gonadotrofinas) no animal, esta, por sua vez, atua no sistema imunológico do suíno, sendo temporária e controlando dessa maneira as substâncias envolvidas no odor sexual (DUNSHEA, 2001).

A vacina de imunocastração é administrada sob duas doses. A função da primeira dose é sensibilizar o sistema imune do suíno. A segunda dose estimula a resposta imunológica protetora que inibe a função dos testículos e reduz significativamente os níveis dos compostos que causam odor sexual. A aplicação da segunda dose deve ocorrer pelo menos 4 semanas depois da primeira dose. Recomenda-se que a segunda dose seja administrada no máximo até 4 ou 5 semanas antes do abate, a fim de garantir a efetividade da vacina, devido a seus efeitos temporários (HENNESSY, 2008).

O GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas), originado no hipotálamo, é um pequeno peptídeo (decapeptídeo) que chega à hipófise por meio da corrente sanguínea, agindo na porção pituitária, onde se liga ao seu receptor específico para induzir a secreção de LH (hormônio luteinizante) e FSH (hormônio folículo estimulante), que agem sobre as gônadas para estimular o crescimento dos

testículos e a produção de esteroides (testosterona e androstenona) (JAROS *et al.*, 2005). A imunocastração ocorre por meio da aplicação de uma vacina que contém uma forma modificada de GnRH (antígeno), sendo análogo sintético incompleto em veículo aquoso conjugado a uma proteína carreadora inerte, que atua no sistema imunológico, estimulando-o a produzir anticorpos naturais contra seu próprio fator de liberação de gonadotrofinas. Assim, a imunização contra a GnRH irá romper a linha central hipotálamo-pituitária-gônada, inibindo o crescimento dos testículos e a síntese de esteroides que, finalmente irá reduzir a ocorrência de odor sexual (JAROS *et al.*, 2005).

Uma das formas mais viáveis de diminuir as concentrações de androstenona, devido à biossíntese comum da androstenona e dos hormônios esteroides produzidos no testículo, seria por meio da imunização ativa e seletiva contra a própria androstenona e seus precursores (CLAUS; WEILER; HERZOG, 1994). Dessa forma, as substâncias de odores desagradáveis são metabolizadas progressivamente no suíno imunocastrado, permitindo que o animal seja abatido com um alto peso, sem odores desagradáveis na carne e com os benefícios do efeito dos esteroides testiculares sobre o crescimento do animal (DUNSHEA, 2001). Por ser um método praticamente indolor aos animais, a imunocastração visa o bem-estar dos mesmos, além de ganhos em qualidade na carne e rendimento de carcaça (DUNSHEA *et al.*, 2005).

2.6 BEM-ESTAR DE SUÍNOS MACHOS

O comprometimento do bem-estar animal pode ser avaliado pelo modelo dos cinco domínios. O modelo foi estruturado para primeiramente avaliar perturbações e desequilíbrios físicos/funcionais, bem como restrições de comportamento e, por fim, identificar os efeitos negativos específicos que afetam cada interrupção, desequilíbrio e/ou restrição seria provável de gerar. Assim, o modelo incorpora quatro domínios físicos/funcionais: "nutrição" (água e alimentos suficientes e dieta balanceada e variada), "meio ambiente" (ambiente físico confortável ou agradável), "saúde" (saudável, em forma e sem lesões) e "comportamento" (capaz de expressar comportamentos gratificantes), e um quinto domínio para concentrar a atenção em todos os efeitos negativos individuais identificados e seu impacto geral acumulado sobre o bem-estar: "mental" (prazer gustativo, prazer em beber e mastigar,

saciedade, conforto físico, vigor da boa saúde e da boa forma física, recompensa, tranquilidade, controle da sociabilidade afetiva, recompensa materna, brincadeiras animadas, sexualmente gratificados) (MELLOR, 2016).

O bem-estar de um indivíduo baseia-se no seu estado em relação às suas tentativas de adaptar-se ao ambiente em que está inserido (BROOM, 1986). Esse estado pode ser estimado através de indicadores fisiológicos ou comportamentais em uma escala variando de muito bom a muito ruim (BROOM; MOLENTO, 2004). O bem-estar dos animais é de crescente importância social e científica, pois não tem impacto somente sobre os animais, mas afeta toda a cadeia produtiva, desde a renda dos produtores até a qualidade da carne e de produtos cárneos (SMULDERS *et al.*, 2006).

Os consumidores começaram a se preocupar com a forma como os animais são criados, transportados e abatidos. Assim, as agroindústrias se sentiram pressionadas ao desafio de um novo modelo de criação e passaram a conceber que os animais devem ser tratados com cuidado. Respeitando sua capacidade de sentir (senciência) e melhorando não só a qualidade intrínseca dos produtos de origem animal, mas também a qualidade ética na criação dos mesmos (LUDTKE, 2010). Desta forma, qualquer sistema criatório que proceda dentro dos padrões sociais e éticos ao bem-estar animal é altamente considerável (MACHADO FILHO, 2000).

Na produção animal a avaliação do bem-estar é complexa por envolver aspectos relacionados ao animal, às instalações, ao manejo e ao ambiente (BAPTISTA; BERTANI; BARBOSA, 2011). Por isso, destacam-se a importância de métodos não invasivos ao avaliar o bem-estar dos animais (DÜPJEAN *et al.*, 2008). A avaliação do bem-estar pode ocorrer de forma quantitativa e os principais indicadores incluem comportamento, produtividade, saúde e fisiologia. O objetivo de mensurar esses indicadores é monitorar a qualidade de vida dos animais. Com isso, torna-se possível melhorar os sistemas de produção e ajudar no reconhecimento de práticas estressantes para que ações corretivas e preventivas possam ser tomadas em todo o ciclo de produção (CANDIANI *et al.*, 2008).

O conhecimento aprofundado da biologia do animal é necessário para avaliar seu bem-estar. Na avaliação, as mensurações do comportamento possuem grande importância. Um animal que se encontra impossibilitado de adotar uma postura preferida de repouso, apesar de repetidas tentativas, será considerado como tendo um pior bem-estar do que outro cuja situação permite a adoção da postura preferida.

Comportamentos anormais, como estereotípias, automutilação, canibalismo em suínos, ou comportamento excessivamente agressivo, indicam que o indivíduo em questão se encontra em condições inadequadas de bem-estar (BROOM; MOLENTO, 2004).

Problemas no comportamento dos suínos (como brigas entre os animais) podem estar relacionados aos níveis elevados de testosterona. Em suínos selvagens esse comportamento agressivo era naturalmente minimizado. Já em um espaço confinado, como uma granja de produção, os suínos não possuem meios práticos de evitar conflitos. Presume-se que sob níveis altos de testosterona os comportamentos tornem-se mais agressivos, afetando negativamente os três estados de bem-estar do animal (físico, mental e expressão do comportamento natural) (BRUNIUS, 2011).

Segundo Rydhmer, Lundström e Andersson (2010), quando se compara a criação de suínos imunocastrados com suínos machos não castrados, a imunocastração pode melhorar o bem-estar dos animais. Suínos imunocastrados possuem um comportamento menos agressivo e não realizam com tanta frequência o comportamento de monta, quando comparados a suínos machos não castrados, o que pode resultar em um ambiente mais calmo. Albrecht *et al.* (2012) também concluíram que a imunocastração reduz o comportamento sexual e agressivo quando comparados aos suínos machos não castrados e podem ser associadas a uma melhora no bem-estar dos animais, quando comparados aos suínos castrados cirurgicamente. No entanto, o comportamento sexual é intrínseco ao animal, ou seja, faz parte do comportamento natural dos suínos (HEMSWORTH; TILBROOK, 2007).

O comportamento agressivo, além de ser prejudicial ao bem-estar animal, pode causar lesões na carcaça, contribuindo negativamente para a qualidade da carne. A localização das lesões e o grau das lesões encontradas podem indicar expressamente o comportamento agressivo dos animais. É possível usar a localização das lesões para concluir como foram acumuladas. Mordidas recebidas durante brigas normalmente localizam-se na parte anterior dos suínos, já as mordidas na região traseira do animal, indicam que foi intimidado por outro suíno (TURNER *et al.*, 2006). O comportamento agressivo de suínos normalmente é expresso com cabeçadas, um confrontando o outro com a cabeça, e essas interações de brigas são menos propensas a causar lesões (STUKENBORG *et al.*, 2011).

Os danos na região traseira da carcaça também podem ser causados pelo comportamento sexual. Esse comportamento ocorre quando um suíno "monta" em outro suíno, e as unhas dos membros dianteiros podem gerar arranhões na pele. Contusões causadas por atividade de monta são facilmente reconhecíveis, uma vez que têm uma forma de vírgula, apresentando de 10 a 15 cm de comprimento e 0,5 a 1 cm de largura (FAUCITANO, 2001).

Levando em consideração o bem-estar dos suínos imunocastrados, a administração da vacina de imunocastração em sistemas de alojamento em grupos ou em sistemas ao ar livre pode causar algumas dificuldades práticas, podendo desencadear situações de estresse agudo aos suínos. Além disso, a injeção da vacina também pode causar reações adversas no local da aplicação, embora sejam frequentemente relatadas como reações leves (DUNSHEA *et al.*, 2001; EINARSSON, 2006).

Outro fator relacionado ao bem-estar dos suínos imunocastrados é a alimentação. Com o aumento do apetite dos suínos imunocastrados após a segunda dose da vacina, estratégias alimentares devem ser feitas a fim de garantir a saciedade dos animais, sem efeitos negativos. A alimentação restritiva para imunocastrados após a segunda dose mostrou um nível de agressão (incidência de lesões cutâneas na carcaça) semelhante aos suínos machos não castrados e superior aos suínos imunocastrados e castrados cirurgicamente alimentados *ad libitum* (BATOREK *et al.*, 2012).

2.7 RIGOR MORTIS

No músculo do animal vivo, o ATP (adenosina trifosfato) circula continuamente para a manutenção do metabolismo. Entretanto, após o abate, quando o suprimento de oxigênio é cessado por meio da sangria, o músculo torna-se anaeróbico e o ácido pirúvico não entra no ciclo de Krebs-Johnson e na cadeia citocrômica para formar ATP. Em anaerobiose há formação de ácido láctico e apenas 8% do ATP em relação ao ATP formado pelo metabolismo aeróbico. Desta forma, o metabolismo celular continua até as reservas de energia esgotarem (ATP, ADP (adenosina difosfato), fosfocreatina e glicogênio). A principal fonte de ATP para o metabolismo celular é o glicogênio armazenado no interior das células, que é encontrado em torno de 1,5%. O ATP é importante nos processos de contração

muscular, pois provoca o desligamento das proteínas contráteis, miosina e actina, e ativa a bomba ATP-dependente que transporta o Ca^{++} do citoplasma para o interior do retículo sarcoplasmático. Então, quando esgotam as reservas de ATP celular formam-se enlaces ou pontes permanentes entre actina e miosina e o músculo perde a elasticidade e não consegue mais relaxar, *rigor mortis*, e a concentração de Ca^{++} no citoplasma permanece alta (BRIDI, 2017; ROÇA, 2016).

A glicólise *post mortem* ocorre em um ambiente celular anaeróbico, onde o glicogênio é transformado em ácido pirúvico e este é convertido em ácido láctico. Como a circulação sanguínea cessou, o lactato formado permanece acumulado dentro das células, causando queda do pH. O rendimento líquido da glicose anaeróbica é de 3 moles de ATP e 4 íons de hidrogênio. A queda inicial do pH é devido à liberação de íons H^+ e posteriormente incrementada pela redução do piruvato a lactato. A quantidade de glicogênio armazenado no músculo no momento do abate é, portanto, decisiva no valor final de pH alcançado na carne. Normalmente, o valor de pH do músculo no momento do abate encontra-se entre 6,9 e 7,2 e se estabiliza 24h *post mortem* em torno de 5,8 quando as reservas de ATP esgotam e se estabelece o *rigor mortis* (BRIDI, 2017).

A qualidade da carne depende de importantes características, estando entre elas à cor, capacidade de retenção de água, sabor, conteúdo da gordura, textura e maciez. A maciez *post mortem* é um complexo processo estrutural e funcional que depende da espécie, genética, estado metabólico do animal *ante mortem*, complemento de proteínas e atividade de enzimas no músculo, além de fatores ambientais (TAYLOR *et al.*, 1995). A proteólise muscular *post mortem*, afeta a qualidade da carne suína, tais como maciez, capacidade de retenção de água e cor, que, por sua vez, possuem forte efeito sobre a aceitação do consumidor. De acordo com Moeller *et al.* (2010), ao consumir uma carne de qualidade, a maciez é um dos parâmetros considerados mais importantes. Atribui-se que 65% da variação na maciez da carne pode ser explicada pela alteração na atividade da μ -calpaína (DRANSFIELD, 1993).

2.8 EXPRESSÃO DOS GENES μ -CALPAÍNA E CALPASTATINA

Na resolução do *rigor mortis* ocorre a maturação da carne. As atividades das enzimas pertencentes ao sistema denominado calpaínas iniciam o

processo de maturação. O sistema das calpaínas, também conhecido como enzimas fatoradas pelo cálcio, constitui-se de duas enzimas, a μ -calpaína, que necessita de 5 a 50 μ M de íons de cálcio para sua atividade e a *m-calpaína*, que requer 300 a 1000 μ M de íons de cálcio para sua atividade. Estas duas enzimas degradam a linha Z e as proteínas desmina, titina, nebulina, tropomiosina, troponina e proteína C. Apesar de não atuarem diretamente sobre a miosina e actina, a hidrólise da tropomiosina e troponina facilita a desestruturação e a liberação dos filamentos finos, resultando nos monômeros da actina e a hidrólise da proteína C, em monômeros da miosina. A degradação da titina, nebulina, desmina e outras proteínas da linha Z, também contribuem para enfraquecer a estrutura miofibrilar (ROÇA, 2016).

O sistema das calpaínas é ainda constituído pela presença da calpastatina, que por sua vez inibe a ação das calpaínas, diminuindo a degradação das proteínas miofibrilares durante o processo de maturação, reduzindo assim a maciez da carne. Transcorridas 24 horas após o abate, em carnes maturadas, a maciez sofre grande influência da calpastatina, cessando seus efeitos apenas quando a concentração de calpaína é exaurida ou o sistema enzimático é destruído por algum método de cocção. Carnes com alta atividade de calpastatina no primeiro dia *post mortem* necessitam de maior força para serem cisalhadas, ou seja, são menos macias (RÜBENSAM; FELÍCIO; TERMIGNONI, 1998).

A atividade das calpaínas nos músculos depende de vários fatores, como pH, nível de íons de cálcio e temperatura (BISWAS; TANDON; MANDAL, 2020). O pH pode afetar a atividade das calpaínas e a proteólise de seus substratos de proteínas miofibrilares. Em relação aos valores de pH e forças iônicas fisiologicamente encontradas no músculo *post mortem*, tanto a μ -calpaína como a *m-calpaína* apresentam menor atividade contra os substratos da proteína miofibrilar do que em pH 7. Mudanças no pH e nas forças iônicas podem causar modificações conformacionais nas enzimas, assim como em seus substratos, afetando a atividade das enzimas e a suscetibilidade dos substratos. Estas modificações podem tornar os substratos menos vulneráveis à clivagem por μ -calpaína (HUFF-LONERGAN; LONERGAN, 1999).

Melody *et al.* (2004) analisaram fatores bioquímicos *post mortem* precoces que influenciam a maciez de três músculos de suínos (*psoas maiores*, *longissimus thoracis e semimembranosus*). A autólise da subunidade de 80 kDa de μ -calpaína na fração sarcoplasmática ocorreu em 94% das amostras de *psoas maiores*

(pH 5,49) em 45 min *post mortem*, mas nas amostras de músculos *longissimus thoracis* (pH 5,96) e *semimembranosus* (pH 6,06) a autólise não foi evidente. Entretanto, às 6 h e 24 h *post mortem*, a autólise da subunidade de 80 kDa de μ -calpaína tinha ocorrido em todos os músculos (*psoas major* (pH 5,63 e 5,69), *longissimus thoracis* (pH 5,68 e pH 5,67) e *semimembranosus* (pH 5,71 e 5,69). Baseado nestes achados, é possível concluir que, quando o pH final é reduzido, as enzimas proteolíticas não são tão eficazes em sua capacidade de decompor proteínas miofibrilares, como titina e desmina.

O sistema das calpaínas possuem diferentes papéis nas células, incluindo a "remodelação" das ligações citoesqueléticas à membrana plasmática durante a fusão celular e a motilidade celular, a modificação proteolítica das moléculas nas vias de transdução de sinal, a degradação das enzimas que controlam a progressão por meio do ciclo celular, a regulação da expressão gênica, a degradação do substrato em algumas vias apoptóticas e o envolvimento na potencialização a longo prazo (GOLL *et al.*, 2003).

A regulação da expressão dos genes ocorre por processos que afetam as taxas em que os produtos gênicos são sintetizados e degradados. Grande parte dessa regulação ocorre no nível da iniciação da transcrição, mediada por proteínas regulatórias que ou reprimem a transcrição, regulação negativa, ou ativam a transcrição, regulação positiva, em promotores específicos (NELSON; COX, 2014).

De acordo com Goll *et al.* (1992), a expressão gênica do sistema das calpaínas pode estar relacionada aos hormônios esteroides, visto que ao avaliar a função fisiológica do sistema calpaínas, foi demonstrado, *in vitro*, que as calpaínas degradam três classes de proteínas de substrato: proteínas citoesqueléticas; kinases e fosfatases; e receptores hormonais. Portanto, os hormônios esteroides podem ativar a expressão gênica por vias nas quais são necessárias atividades dependentes e independentes dos receptores de esteroides para a ligação do DNA. Os receptores se ligam a elementos de resposta únicos ou múltiplos para ativação. Os locais de ligação dos receptores podem funcionar em sinergia ou em conjunto com os locais de ligação de outros fatores de transcrição. Assim, a interação proteica dos receptores e das proteínas não receptoras pode desempenhar um papel na ativação da expressão genética (CATO; PONTA; HERRLICH, 1992).

Os hormônios esteroides regulam a expressão gênica por meio de um mecanismo geral no qual os hormônios são transportados ao tecido alvo por soro

sanguíneo contendo proteínas, difundem-se por meio da membrana plasmática e se ligam a receptores de proteína específicos no núcleo. A ligação do hormônio altera a conformação do receptor (ativação ou transformação do receptor), forma homo ou heterodímeros com outros complexos receptores hormonais e se liga a regiões reguladoras específicas chamadas elementos de resposta hormonal no DNA adjacente a genes específicos. O receptor atrai proteínas co-ativadoras ou correlatas e, com elas, regula a transcrição de genes adjacentes, aumentando ou diminuindo a taxa de formação de mRNA. Níveis alterados do produto genético regulado pelo hormônio produzem a resposta celular ao hormônio (NELSON; COX, 2014).

3 REFERÊNCIAS

- AGERGAARD, N. *et al.* Absorption of skatole to the portal vein blood following tryptophan infusion to the hind gut. *In: Proceedings of the EAAP working group on production and utilisation of meat from entire male pigs*, Milton-Keynes, U.K., 1995. P. 27–29.
- ALBRECHT, A. K. *et al.* Influence of immunisation against GnRF on agonistic and mounting behaviour, serum testosterone concentration and body weight in male pigs compared with boars and barrows. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 138, n. 1–2, p. 28–35, 2012.
- ALUWÉ, M. *et al.* **Fact sheet: Pork production with entire males** by the COST (European cooperation in Science & Technology) action IPEMA Core Group. 2019. Disponível em: < http://www.ca-ipema.eu/download/415/documents/publications/Factsheet_Boars_8-2019.pdf>. Acesso em: 19 out. 2020.
- ANDRESSEN, O. Boar taint related compounds: androstenone/skatole/other substances. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 48, Aug. 2006.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL - ABPA. **Relatório Anual 2020**. Disponível em: <https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2020/05/abpa_relatorio_anual_2020_portugues_web.pdf>. Acesso em: 09 out. 2020.
- BABOL, J.; SQUIRES, E. J. Quality of meat from entire male pigs. **Food Research International**, v. 28, p. 210–212, 1995.
- BATISTA, I. A. A. B.; BERTANI, G. R.; BARBOSA, C. N. Indicadores do bem-estar em suínos. **Ciência Rural**, v. 41, n.10, p. 1823-1830, out. 2011.
- BATOREK, N. *et al.* Effect of feed restriction on hormones, performance, carcass traits, and meat quality in immunocastrated pigs. **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 4593-4603, 2012.
- BEE, G.; CHEVILLON, P.; BONNEAU, M. Entire male pig production in Europe. **Animal Production Science**, v. 55, p. 1347–1359, 2015.
- BERTOL, T. M.; OLIVEIRA, E. A. O.; SANTOS FILHO, J. I. Composição e aspectos de qualidade da carne suína. *In: BERTOL, T. M. Estratégias nutricionais para melhoria da qualidade da carne suína*. Editora técnica. Brasília, DF: Embrapa, 2019. p. 12-38.
- BISWAS, A. K.; TANDON, S.; MANDAL, P. K. Chapter 7 - Calpain-assisted postmortem aging of meat and its detection methods. *In: BISWAS, A. K.; MANDAL, P. K. Meat Quality Analysis*, Academic Press, 2020, p. 101-114.
- BONNEAU, M.; SQUIRES, E. J. O uso de machos inteiros na produção de suínos. *In: 1a Conferência Internacional Virtual sobre Qualidade de Carne Suína*, Concórdia, SC, 2000.

BONNEAU, M. *et al.* Potential sensitivity of pork production situations aiming at high-quality products to the use of entire male pigs as an alternative to surgical castrates. **Animal**, 2018, v. 12, p. 1287–1295.

BRASIL. Decreto, nº 30.691, de 29 de março de 1952. Aprova o Novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Brasília, D.F., 29 mar. 1952.

BRASIL. Decreto, nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Brasília, D.F., 29 mar. 2017.

BRASIL. Decreto, nº 10.468, de 18 de agosto de 2020. Altera o Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017, que regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre o regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Brasília, D.F., 18 ago. 2020a.

BRASIL. Decreto, nº 10.468, de 18 de agosto de 2020. Perguntas e respostas. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Brasília, D.F., 18 ago. 2020b.

BRIDI, A. M. **Importância dos Aspectos Físicos e Químicos na Qualidade da Carne**. Disponível em:
<<http://www.uel.br/pessoal/ambridi/Carnesecarcacasarquivos/Aspectos.pdf>>.
Acesso em: 24 set. 2017.

BROOM, D. Indicators of poor welfare. **British veterinary journal**, p. 524-526, 1986.

BROOM, D.; MOLENTO, C. Bem-estar animal: conceito e questões relacionadas–revisão. **Archives of Veterinary Science**, p. 1–11, 2004.

BRUNIUS, C. **Early Immunocastration of male pigs**: Effects on Physiology, Performance and Behaviour. 2011. Tese (Doutorado em Food Science) - Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, 2011.

ČANDEK-POTOKAR, M.; ŠKRLEP, M.; ZAMARATSKAIA, G. Immunocastration as Alternative to Surgical Castration in Pigs. *In: Theriogenology*. Intech, 2017. p. 109-126.

CANDIANI, D. *et al.* A combination of behavioral and physiological indicators for assessing pig welfare on the farm. **Journal of applied animal welfare science**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2008.

CATO, A. C. B.; PONTA, H.; HERRLICH, P. Regulation of gene expression by steroid hormones. *In: Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 1992. v. 43, p.1-36.

CLARKE, I.; WALKER, J.; HENNESSY, D. Inherent food safety 1 of a synthetic 2 gonadotropin-releasing factor (GnRF) vaccine for the control of boar taint in entire 3 male pigs. **Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 6, n. 1, 2008.

CLAUS, R. *et al.* Effects of butyrate on apoptosis in the pig colon and its consequences for skatole formation and tissue accumulation. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 239–248, 2003.

CLAUS, R.; WEILER, U.; HERZOG, A. Physiological aspects of androstenone and skatole formation in the boar: A review. **Meat Science**, v. 38, p. 289–305, 1994.

CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA. Diretiva 2008/120/CE do Conselho de 18 de dezembro de 2008 relativa às normas mínimas de proteção de suínos (Versão codificada). **Jornal Oficial da União Europeia**. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=celex:32008L0120>>. Acesso em: 15 out. 2020.

DORAN, E. *et al.* Cytochrome P450IIE1 (CYP2E1) is induced by skatole and this induction is blocked by androstenone in isolated pig hepatocytes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 140, n. 1, p. 81–92, 2002.

DRANSFIELD, E. Modeling postmortem tenderization. IV - Role of calpain and calpastatin in conditioning. **Meat Science**, v. 34, n. 2, p. 217-234, 1993.

DUNSHEA, F. R. *et al.* Effects of dietary factors and other metabolic modifiers on quality and nutritional value of meat. **Meat Science**, v. 71, p. 8-38, 2005.

DUNSHEA, F. R. *et al.* Vaccination of boars with a GnRH vaccine (Improvac) eliminates boar taint and increases growth performance. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 2524-2535, 2001.

DÜPJAN, S. *et al.* Differential vocal responses to physical and mental stressors in domestic pigs (*Sus scrofa*). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 114, n. 1–2, p. 105–115, 2008.

EINARSSON, S. Vaccination against GnRH: pros and cons. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 48, n. 10, 2006.

EMBRAPA. **Qualidade na produção de suínos**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/qualidade-da-carne/carne-suina/producao-de-suinos>>. Acesso em: 13 out. 2020.

EUROPEAN COMMISSION. **European Declaration on Alternatives to Surgical Castration of Pigs**. 2010. Disponível em: <https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/animals/docs/aw_prac_farm_pigs_cast_alt_declaration_en.pdf>. Acesso em: 15 out. 2020.

FAUCITANO, L. Causes of skin damage to pig carcasses. **Canadian Journal of Animal Science**. v. 81, p. 39-45, 2001.

FONT-I-FURNOLS, M. Consumer studies on sensory acceptability of boar taint: a review. **Meat Science**, v. 92, p. 319-329, 2012.

GOLL, D. E. *et al.* Role of the calpain system in muscle growth. **Biochimie**, v. 74, p. 225-237, 1992.

GOLL, D. E. *et al.* The Calpain System. **Physiological Reviews**, v. 83, p. 731–801, 2003.

HEMSWORTH, P. H.; TILBROOK, A. J. Sexual behavior of male pigs. **Hormones and Behavior**, v. 52, n. 1, p. 39–44, 2007.

HENNESSY, D. Improvac® Mode of Action. **Technical Bulletin Pfizer**. 2008. Disponível em: <<https://www.improvac.com/assets/document/pt/indesignmoatechbulletintim0509.pdf>>. Acesso em: 06 fev. 2021.

HUFF-LONERGAN, E.; LONERGAN, S. M. Postmortem mechanisms of meat tenderization: The roles of the structural proteins and the calpain system. *In*: XIONG, Y. L.; HO, C.T.; SHAHIDI, F. **Quality attributes of muscle foods**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999. p. 229-251.

IPEMA WEBINAR. **Practical solutions to the issue of piglet castration**. 2020. Disponível em: <http://www.ca-ipema.eu/download/451/documents/about_ipema/Press_release_final.pdf?view=attachment>. Acesso em: 20 out. 2020.

JAROS, P. *et al.* Effect of active immunization against GnRH on androstenone concentration, growth performance and carcass quality in intact male pigs. **Livestock Production Science**, v. 92, p. 31–38, 2005.

JENSEN, M. T.; COX, R. P.; JENSEN, B. B. 3-Methylindole (skatole) and indole production by mixed populations of pig fecal bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 3180-3184, 1995.

JENSEN, M. T.; HANSEN, L. L. Feeding with chicory roots reduces the amount of odorous compounds in colon and rectal contents of pigs. **Animal Science**, v. 82, p. 369–376, 2006.

JENSEN, B. B.; JENSEN, M. T. Microbial production of skatole in the digestive tract of entire male pigs. *In*: Jensen, W. K. **Skatole and boar taint**. Danish Meat Research Institute: Roskilde, Denmark, 1998. p. 41-76.

KOOHMARAIE, M. Role of the neutral proteinases in postmortem muscle protein degradation and meat tenderness. *In*: Reciprocal Meat Conference, 45., 1992, Knoxville. **Proceedings** [...]. Knoxville: American Meat Science Association, 1992. p. 63-71.

LAWRIE, R.A. **Ciência da Carne**. Tradução de Jane Maria Rubensam. 6 ed. Porto Alegre: Artmed. 384 p. Tradução de: Lawrie's Meat Science, 2005.

LUDTKE, C. **Especial Suinocultura – Bem-estar Animal: Qualidade Ética da Carne**. Jan. 2010. Disponível em: <<http://data.novo.gessulli.com.br/file/2011/03/17/E142916-F00001-B060.pdf>>. Acesso em: 18 set. 2017.

MACHADO FILHO, L. C. P. Bem-estar de suínos e qualidade da carne: uma visão brasileira. *In: Conferência Internacional virtual sobre qualidade de Carne Suína: Bem-estar, transporte, abate e consumidor, 1ª.*, 2000, Concórdia. **Anais...Concórdia: Embrapa Suínos e Aves**, 2001. p. 34-40.

MCGLONE, J. J. **Behavior of immunologically castrated boars compared to surgically castrated pigs**. 2012. Disponível em: <<http://www.depts.ttu.edu/animalwelfare/research/pigcastration/documents/BehaviorofimmunologicallycastratedboarscomparedtosurgicallycastratedpigsMarch2012.pdf>>. Acesso em: 14 out. 2020.

MELLOR, D. J. Updating Animal Welfare Thinking: Moving beyond the “Five Freedoms” towards “A Life Worth Living”. **Animals**, v. 6, p.21, 2016.

MELODY, J. L. *et al.* Early postmortem biochemical factors influence tenderness and water-holding capacity of three porcine muscles. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 7, p. 2209, 2004.

MOELLER, S. J. *et al.* Consumer perceptions of pork eating quality as affected by pork quality attributes and end-point cooked temperature. **Meat Science**, v. 84, p. 14–22, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

ØVERLAND, M. *et al.* Easily fermentable carbohydrates reduce skatole formation in the distal intestine of entire male pigs. **Livestock Science**, v. 40, p. 206-217, 2011.

PARANÁ. Portaria nº 60, de 26 de março de 2014. Aprova normas para abate de suínos não castrados e de suínos submetidos à castração imunológica por meio de vacina, nos estabelecimentos registrados da ADAPAR. **Secretaria da Agricultura e Abastecimento**. Curitiba, 26 mar. 2014.

POVOD, M.; LOZYNSKA, I.; SAMOKHINA, E. Biological and economic aspects of immunological castration in comparison with traditional (surgical) method. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 25, n. 2, p. 403–409, 2019.

PRUNIER, A. *et al.* A Review of the Welfare Consequences of Surgical Castration in Piglets and the Evaluation of Non-Surgical Methods. **Animal Welfare**, v. 15, p. 277–289, 2006.

ROÇA, R. O. **Modificações post-mortem**. Disponível em: <<http://www.fca.unesp.br/Home/Instituicao/Departamentos/Gestaoetecnologia/Teses/Roca105>>. Acesso em: 22 set. 2017.

ROEST, K. *et al.* Resource efficiency and economic implications of alternatives to surgical castration without anesthesia. **Animal**, v. 3, p. 1522–1531, 2009.

RÜBENSAM, J. M.; FELÍCIO, P. E.; TERMIGNONI, C. Influência do genótipo *Bos indicus* na atividade de calpastatina e na textura da carne de novilhos abatidos no Sul do Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.4, p. 405-409, 1998.

RYDHMER, L.; LUNDSTROM, K.; ANDERSSON, K. Immunocastration reduces aggressive and sexual behaviour in male pigs. **Animal**, v. 4, p. 965–972, 2010.

SALLER, A. M. *et al.* Local anesthesia in piglets undergoing castration—A comparative study to investigate the analgesic effects of four local anesthetics on the basis of acute physiological responses and limb movements. **Plos One**, v. 15, n. 7, 2020.

SILVA, D. M.; RIBEIRO, R. N. Desempenho de ganho de peso de leitões submetidos a um protocolo anestésico para castração. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária FAG**, v. 3, n. 1, jan./jun. 2020.

SILVA, L. R. **Ractopamina para suínos machos imunocastrados**. 2013. 128f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

ŠKRLEP, M. *et al.* The use of pork from entire male and immunocastrated pigs for meat products - An Overview with Recommendations. **Animals**, v. 10, p.1754, 2020.

SMULDERS, D. *et al.* Validation of a behavioral observation tool to assess pig welfare. **Physiology & Behavior**, v. 89, p. 438–447, 2006.

SQUIRES, E. J.; BONE, C.; CAMERON, J. Pork production with entire males: directions for control of boar taint. **Animals**, v. 10, p. 1665, 2020.

STUKENBORG, A. *et al.* Agonistic behaviour after mixing in pigs under commercial farm conditions. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 129, n. 1, p. 28–35, 2011.

SZYMAŃSKA, E. J. The development of the pork market in the world in terms of globalization. **Journal of Agribusiness and Rural Development**, v. 46, n. 4, p. 843–850, 2017.

TAYLOR, R. G. *et al.* Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization? **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 1351–1367, 1995.

THUN, R.; GAJEWSKI, Z.; JANETT F, F. Castration in male pigs: Techniques and animal welfare issues. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 57, n. 8, p. 189–194, 2006.

TURNER, S. P. *et al.* The accumulation of skin lesions and their use as a predictor of individual aggressiveness in pigs. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 96, n. 3–4, p. 245–259, 2006.

VIEIRA, C. L. **Inovação genética na suinocultura brasileira**. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Economia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

WESOLY, R.; WEILER, U. Nutritional Influences on Skatole Formation and Skatole Metabolism in the Pig. **Animals**, v. 2, p. 221-242, 2012.

WHITTINGTON, F. M. *et al.* Relationships between skatole and androstenone accumulation, and cytochrome P4502E1 expression in Meishan x Large White Pigs. **Meat Science**, v. 67, p. 569-576, 2004.

WOOD, J. D. *et al.* Further observation on the effects of molassed sugar-beet feed on the eating quality of pig meat. **BSAP Occasional Publication**, v. 17, p. 102–103, 1993.

YOKOYAMA, M.T.; CARLSON, J.R. Microbial metabolites of tryptophan in the intestinal tract with special reference to skatole. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 32, p. 173-178, jan. 1979.

YUN, J. *et al.* Behavioural alterations in piglets after surgical castration: Effects of analgesia and anaesthesia. **Research in Veterinary Science**, v. 125, p. 36–42, 2019.

ZAMARATSKAIA, G.; SQUIRES, E.J. Biochemical, nutritional and genetic effects on boar taint in entire male pigs. **Animal**, v. 3, p. 1508–1521, 2009.

ZAMARATSKAIA, G. *et al.* Effect of liver weight and dietary supplement of raw potato starch on the levels of skatole, androstenone, testosterone and oestrone sulphate in entire male pigs. **Livestock Production Science**, v. 93, p. 235–243, 2005.

ZAMARATSKAIA, G. **Factors involved in the development of boar taint: Influence of breed, age, diet and raising conditions**. 2004. Tese (Doutorado em Food Science) - Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, 2004.

4 HIPÓTESE

Artigo A: Desempenho, indicadores de estresse e qualidade da carne de suínos machos não castrados e imunocastrados.

A hipótese deste estudo é que suínos machos não castrados apresentam melhor desempenho. No entanto, as diferenças entre os gêneros e a presença de compostos que causam o odor sexual podem comprometer a qualidade da carne e suas propriedades sensoriais, resultando em uma baixa aceitabilidade social, além do comprometimento da carcaça devido ao aumento da agressividade.

Artigo B: Efeitos do gênero na qualidade da carne suína e na expressão gênica da calpaina-1 e calpastatina no músculo de suínos machos.

A hipótese deste estudo é que suínos machos não castrados expressam menos calpaina-1 e têm maior expressão da calpastatina, resultando em uma diminuição da proteólise e, conseqüentemente, menos maciez na carne do que suínos machos imunocastrados.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos do gênero de suínos machos (não castrados e imunocastrados) no desempenho, na expressão gênica da μ -calpaína e calpastatina e na qualidade da carne.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Artigo A: Desempenho, indicadores de estresse e qualidade da carne de suínos machos não castrados e imunocastrados.

- Estimar o consumo, o ganho de peso e a conversão alimentar de suínos machos;
- Avaliar a regressão e o desenvolvimento dos testículos dos suínos imunocastrados e não castrados, respectivamente;
- Verificar os indicadores de estresse, nível de cortisol no plasma, grau de lesões nas carcaças e valor de R;
- Determinar a concentração de compostos que causam odor sexual, escatol e indol;
- Analisar a composição química, perfil de ácidos graxos e oxidação lipídica da carne;
- Estimar a aceitação da carne de suínos machos por meio de avaliação sensorial da carne e da gordura.

Artigo B: Efeitos do gênero na qualidade da carne suína e na expressão gênica da calpaina-1 e calpastatina no músculo de suínos machos.

- Avaliar as características de carcaça de suínos machos;
- Analisar a qualidade da carne de suínos machos;
- Estimar a expressão genica calpaina-1 e calpastatina suas associações com parâmetros ligados a maciez da carne.

1 **6 ARTIGO A - Performance, stress indicators, and meat quality of boars and**
2 **immunocastrated male pigs**

3

4 Artigo científico escrito segundo as normas da revista Livestock Science

5

6 **Abstract**

7 The release of boars slaughter in Brazil highlights the need for studies exploring the differences
8 between reproductive status of male pigs. Therefore, the aim of this study was to compare the
9 effects of reproductive status on the performance, stress indicators, and meat quality of male
10 pigs. A total of 40 male pigs with commercial genetics at the finishing period were assigned to
11 two treatments with 20 animals each: entire males (boars) and immunocastrated. Boars
12 presented larger reproductive organs than immunocastrated pigs, except for the bulbourethral
13 gland. In the performance evaluation, boars presented lower daily feed intake (at finishing phase
14 II) and better feed conversion (at finishing phase II) than immunocastrated pigs. Boars showed
15 a higher degree of lesions in the carcasses than immunocastrated pigs. There was no difference
16 in cortisol levels and R-values between treatments. Boars presented higher skatole levels and
17 skatole cut-off levels than immunocastrated pigs. There was no difference in indole levels and
18 indole cut-off levels between treatments. In terms of meat chemical composition, boars
19 presented higher levels of moisture and a lower percentage of protein than immunocastrated
20 pigs. Boar meat presented lower saturated fatty acids and higher unsaturated, polyunsaturated,
21 omega 6, and ratio of polyunsaturated and saturated fatty acids than the meat of
22 immunocastrated pigs. In the sensory evaluation performed by consumers, for general meat
23 (odor and flavor), boars had a higher score than immunocastrated pigs, and meat of both
24 treatments was classified as good. A higher number of consumers evaluated immunocastrated
25 pork as extremely good than that for boar meat. Sensory panels provided higher scores for the

26 general fat odor and pork odor of boars (bad and indifferent, respectively) than for that in
27 immunocastrated pigs (indifferent). Boars had higher scores for boar taint sensory in fat odor,
28 pork odor, and flavor than immunocastrated pigs, and meat of both treatments was classified as
29 extremely weak. In skatole fat odor and pork odor, boars exhibited higher scores (none and
30 extremely weak, respectively) than immunocastrated pigs (none). Regarding androstenone fat
31 odor and pork odor, boars also presented higher scores (very weak and extremely weak,
32 respectively) than immunocastrated pigs (extremely weak). Therefore, this study provides
33 evidence that there are established differences between reproductive status of males, but these
34 differences did not compromise the quality and acceptability of boar meat. However, to enable
35 the production and consumption of boar meat in Brazil, these results need to be further explored.

36

37 **Keywords:** boar taint, fat, immunocastration, indole, sensory evaluation, skatole.

38

39 **1. Introduction**

40

41 One of the biggest animal welfare concerns in world pig production is the surgical
42 castration of piglets without anesthesia, because of the pain and stress caused to these animals
43 (Bernau et al., 2018). In this context, the European declaration intended the elimination of
44 surgical castration of pigs without pain relief by 2012 and gradual elimination of surgical
45 castration by 2018. However, the deadline officially expired on January 1, 2018, and the
46 European pig chain has not yet completely adopted alternatives for favorable animal welfare,
47 such as surgical castration with anesthesia/analgesia or raising entire male pigs (boars) or
48 immunocastration of male pigs (Tomasevic et al., 2019).

49 It could be possible to eliminate boar taint and decrease aggressive and sexual behaviors
50 of boars. Immunocastration represents a substantial technological advance in providing a

51 painless and easy alternative (Grela et al., 2020). Pig immunocastration is widely used in Brazil,
52 Australia, and New Zealand, but it still faces problems of acceptance by consumers and the pig
53 production chain in North America and the European Union. Problems include the
54 modifications needed to apply the immunocastration vaccine, the risk of accidental self-
55 injection by workers, and the need to confirm the immunocastration efficacy (Squires et al.,
56 2020). In Brazil, besides the immunization technique, surgical castration is still widely used.
57 This is because the slaughter of boars has been forbidden in Brazil since 1952 and has remained
58 so for 68 years. However, since August 18, 2020, the slaughter of boars has been allowed in
59 Brazil according to Decree 10.468, art. 3 (Brazil, 2020).

60 Changing from surgically castrated pigs to the production of immunocastrated pigs or
61 boars may affect the processing and properties of fresh pork and meat products because of
62 changes in fat and meat quality. Knowledge of the differences between male reproductive
63 conditions, and full monitoring of the quality of the raw material, are essential to overcome
64 variation and optimize processing (Škrlep et al., 2020). Furthermore, changes in pig production
65 and the introduction of meat from boars into the market may affect consumer acceptability with
66 respect to boar taint. Therefore, studies are necessary to determine the views of consumers on
67 the sensory acceptance of pork and consumer attitudes toward pig production systems and their
68 consequences (Font-i-Furnols, 2012).

69 The hypothesis of this study is that boars exhibit better performance than
70 immunocastrated pigs. Differences between reproductive status and the presence of compounds
71 that cause boar taint could compromise the meat quality and its sensory properties, resulting in
72 low social acceptability. Furthermore, increased aggressiveness may compromise the carcass.
73 Therefore, the goal of this study was to compare the effects of reproductive status of males
74 (boars and immunocastrated pigs) on the performance, stress indicators, and meat quality.

75

76 2. Material and methods

77

78 The present study was submitted and approved by the Ethics Committee on the Use of
79 Animals of the State University of Londrina, under process nº 16367.2016.53.

80

81 2.1. Animals, housing, and treatments

82

83 A total of 40 male pigs from Agroceres PIC[™] × DB-DanBred[™] genetics were randomly
84 assigned to two treatments of 20 animals each: entire male pigs (boars) and immunocastrated
85 male pigs. The animals were housed in 20 pens (2 pigs of the same treatment per pen). Each
86 brickwork pen was 1.5 m wide × 1.5 m high, totaling 2.25 m² of area per pen (1.13 m²/pig),
87 with concrete and compact floors, one nipple-type drinker, and one trough for feed (semi-
88 automatic feeder for one mouth, model CAP 1BT[™], 250 mm deep × 360 mm width × 200 mm
89 height, capacity 30 kg; Industrial Agricultural Suin, Joinville - Santa Catarina, Brazil, 2010).

90 Immunocastration of each animal was conducted using a commercial vaccine (Vivax®),
91 with two doses of 2 mL, administered subcutaneously in the neck region near the base of the
92 ear, according to the manufacturer's instructions. They received the first and second doses at 9
93 and 5 weeks prior to slaughter, i.e., at 104 days of age (59.10 ± 4.35 kg of live weight (mean ±
94 SD)) and 132 days of age (88.2 ± 5.71 kg of live weight), respectively. The boars did not
95 undergo any type of intervention.

96 The experimental period was divided into two phases: finishing I (70 to 100 kg) and II
97 (100 to 125 kg). Pigs began finishing I at 119 days of age and 73.28 ± 5.27 kg live weight and
98 finishing II at 146 days of age, weighing 103.33 ± 6.83 kg, on average. Animals were
99 slaughtered at the end of finishing II, with an average weight of 126.62 ± 8.44 kg at 166 days
100 of age. Animals from both treatments received the same diets (Table 1) *ad libitum*, formulated

101 to meet the nutritional requirements recommended by Rostagno et al. (2011) for finishing
102 phases I and II.

103

104 *2.2. Performance, reproductive organs, and slaughter of male pigs*

105

106 To control performance, pigs were weighed at the beginning of each finishing phase (I
107 and II) and at the end of the finishing period (day of slaughter). Furthermore, feed provided and
108 wasted were quantified weekly, enabling the estimation of daily weight gain, daily feed intake,
109 and feed conversion of pigs. Testicular width was measured 9 weeks before slaughter and
110 weekly until the slaughter week, using a pachymeter in the mean portion of testes.

111 Preslaughter management consisted of a water diet until slaughter and 15 h of total solid
112 fasting. Animals were shipped 12 h after feed withdrawal and transported to a slaughterhouse
113 (1 h), where they remained in a lairage pen (2 h) with 20 pigs of the same treatment per pen,
114 until the time of slaughter. Slaughter was conducted in a commercial slaughterhouse under the
115 State Inspection Service (SIP) and according to humanitarian slaughter standards (Brazil,
116 2000). The testes and bulbourethral glands were collected from the slaughterhouse. For
117 testicular width, measured with a pachymeter, the testes were dissected out of the scrotal sac,
118 and the epididymis was removed. The testes, epididymis, and bulbourethral glands were
119 weighed.

120

121 *2.3. Stress indicators*

122

123 After unloading at the slaughterhouse, the pigs were housed according to their respective
124 treatments in two lairage pens (20 pigs of the same treatment per pen). Behavioral evaluation
125 consisted of direct observation of the animals for a 2 h period, and the sexual behaviors of

126 mounting and aggressive fights were quantified. The behavioral analysis was performed by
127 trained observers before the evaluation to standardize the behavioral observations. For
128 observation, the "sampling all occurrences of some behaviors" method was adopted, which
129 consisted of recording all occurrences of a behavioral class (mount and fight) for all members
130 of the group (Altmann, 1974). The behaviors evaluated were defined as fighting (two pigs or
131 more fighting, giving, or receiving blows to the body, head, or bites) and mounting (placing the
132 front legs of a pig on top of the back of another pig).

133 At the slaughter line, blood samples were collected from pigs, and the plasma was
134 removed after centrifugation (10 minutes at 1000 $\times g$) and stored at -18 °C until analysis.
135 Cortisol analysis was performed in a specialized commercial laboratory using the
136 chemiluminescence method. The severity of carcass lesions was assessed by the same evaluator,
137 following a subjective photographic scale developed by the Meat and Livestock Commission
138 (MLC) (1985), in which the lesions are classified into five categories: (1) no injury, (2) lightly
139 injured, (3) slightly injured, (4) moderately injured, and (5) severely injured.

140 To determine the extent of rigor mortis and ATP depletion, a meat sample (2 cm) of
141 *semitendinosus* muscle was collected, packed in aluminum paper, frozen in liquid nitrogen, and
142 stored at -80 °C until analysis. The R-value analysis was performed following the methodology
143 of Honikel and Fischer (1977). The 1 g meat samples were added to perchloric acid, blended
144 for 30 s in ultra-turrax (Marconi®), centrifuged for 5 min at 4 °C and 3000 $\times g$ (K3 series;
145 Centurion Scientific®), and added to a phosphate buffer. The absorbance readings were
146 measured in a quartz cuvette in a spectrophotometer (Evolution 60S; Thermo Scientific®,
147 USA) at 250 nm (IMP) and 260 nm (ATP). The value of R was calculated using IMP:ATP.

148

149 2.4. Boar taint compounds

150

151 Subcutaneous fat samples were taken from carcasses in the perianal region, vacuum-
152 packed, and stored at -18 °C until analysis. Skatole and indole concentrations in extracted fat
153 were determined using high performance liquid chromatography (HPLC) (LC-20A
154 Prominence; Shimadzu®) and a fluorescence detector according to the methodology of Oskam
155 et al. (2010). To perform the analysis, 1 g of each fat sample was melted in a microwave oven
156 (for 4 min at 350 W) and centrifuged for 15 s at 20 °C and 3000 ×g (K3 series; Centurion
157 Scientific®), and water was removed and discarded.

158 Subsequently, the samples were heated for 5 min at 55 °C in a water bath (MA 159;
159 Marconi®), and the internal standard 3-methylindole (98 % purity, Sigma Aldrich®) diluted in
160 methanol was added. The samples were heated again (for 5 min at 55 °C) in a water bath, shaken
161 in a vortex (Lab Dancer S25; IKA®), and centrifuged (for 30 s at 20 °C and 3000 ×g). The
162 supernatant was removed and stored in an amber HPLC vial. The extraction continued with the
163 addition of methanol, vortex agitation, centrifugation (for 30 s at 20 °C and 3000 g), and the
164 finally removed supernatant fluid was stored in an amber HPLC vial, producing 1 mL samples.
165 The chromatographic conditions consisted of a reverse-phase column C18 (Hypersil ODS, 150
166 mm × 4.6 mm, 5 µm, Thermo Scientific®) with isocratic elution of 0.02 mol L⁻¹ acetic acid
167 solution, acetonitrile, and 2-propanol in an isocratic proportion (60%:25%:15%), at a flow rate
168 of 1.00 mL min⁻¹ and column temperature of 40 °C. The injection volume was 10.0 µL, and the
169 run time was 20 min. The excitation and detection wavelengths were 270 and 350 nm,
170 respectively. The skatole and indole peaks differentiated according to retention time. The results
171 are expressed in µg of skatole and indole per g of fat. The cut-off level of skatole was >0.20
172 ug/g fat (Squires & Bonneau, 2014) and for indole was >0.10 ug/g fat (Aluwé et al., 2009).

173

174 *2.5. Chemical composition, fatty acid profile and lipid oxidation in longissimus thoracis et*
175 *lumborum*

176

177 Samples of *longissimus thoracis et lumborum* muscles were obtained from the left half
178 of the carcass, at the last rib in the caudal-cranial direction, to determine the chemical
179 composition, fatty acid profile, and lipid oxidation (Thiobarbituric acid reactive substances
180 [TBARS]). The meat samples were packed in plastic bags and frozen at -18 °C until analysis.
181 To perform the analyses, frozen meat samples were thawed at 4 °C for 24 h. Meat chemical
182 composition (moisture, protein, fat, and ash) was determined according to the methodology
183 proposed by the Association of Official Agricultural Chemists (AOAC, 2016).

184 To determine the profile of pork fatty acids, total lipids were extracted (Bligh and Dyer,
185 1959), and the transesterification process was performed according to the International
186 Organization for Standardization (1978). The meat samples (30 g) were homogenized in
187 chloroform and methanol, filtered, and decanted, and the solvents were evaporated in a water
188 bath rotary evaporator (Marconi®) at 33 °C. Fatty acid methyl esters were analyzed using a gas
189 chromatograph (GC-17A; Shimadzu®). The results were expressed as the percentage of fatty
190 acids identified relative to the total content. Based on the fatty acids found, the omega 6 and
191 omega 3 ratio (N6:N3) and polyunsaturated and saturated ratio (PUFA:SFA) (Ulbricht and
192 Southgate, 1991) were determined. Meat lipid oxidation was determined in 5 g meat samples
193 using substances reactive to the 2-thiobarbituric acid (TBARS) precipitation path, as described
194 by Mendes et al. (2009) and adapted by Mendonça (2016). The data are expressed in mg
195 malondialdehyde per kg meat.

196

197 2.6. Fat and meat sensory evaluation

198

199 Subcutaneous fat samples from the perianal region and meat samples of *longissimus*
200 *thoracis et lumborum* muscles were collected from carcasses for sensory evaluation. Fat and

201 meat samples were cut into cubes of approximately 2 cm², wrapped in aluminum paper, and
202 grilled for 3 min. Fat sensory evaluation was performed only by sensory panels, whereas meat
203 sensory evaluation was performed by sensory panels and pork consumers (untrained tasters).
204 Tasters received coffee powder, water, and unsalted biscuits to clean their sense of smell and
205 palate and avoid mixing odors and flavors between the samples evaluated.

206 Sensory evaluation by pork consumers and untrained tasters was performed by 80 tasters
207 in the sensory lab, using the paired test of preference, which consisted of offering two samples
208 of pork with one sample being from each treatment. Untrained tasters assigned a score for each
209 sample, using a structured scale with seven points for general odor and flavor of meat: (1)
210 extremely good, (2) very good, (3) good, (4) indifferent, (5) bad, (6) very bad, and (7) extremely
211 bad.

212 The sensory evaluation was performed by eight sensory panels, who analyzed fat and
213 meat odor parameters and meat flavor parameters (Associação Brasileira de Normas Técnicas
214 [ABNT], 1993). Selected sensory panels were trained over a period of 3 months (Dutcosky,
215 2013). Each panel received a sample (from each animal in each treatment) at a time and
216 quantified the odor and flavor of general, boar taint, skatole, and androstenone parameters. Two
217 structured intensity scales were used, with seven points, which for general odor and flavor were
218 as follows: (1) extremely good, (2) very good, (3) good, (4) indifferent, (5) bad, (6) very bad,
219 and (7) extremely bad. For odor and flavor of boar taint, skatole, and androstenone odor, they
220 were: (1) none; (2) extremely weak; (3) very weak; (4) weak; (5) strong; (6) very strong; and
221 (7) extremely strong.

222

223 *2.7. Statistical analysis*

224

225 The experimental design was a completely randomized block with two treatments and
226 20 replicates per treatment. The pigs were blocked according to their live weights at the
227 beginning of the experiment. All statistical procedures were conducted using R software (R
228 Core Team, 2020; version 4.0.0), assuming a probability level of 5% ($P \leq 0.05$) as the limit for
229 statistical significance.

230 The effects of treatments, boars and immunocastrated pigs, on the performance,
231 reproductive organs, stress indicators, boar taint compounds, meat chemical composition, fatty
232 acid profile, lipid oxidation, and fat and meat sensory evaluation were submitted to an analysis
233 of variance. Means were compared using the F test, and results are presented as the mean \pm SE.
234 Data for each carcass degree of lesion, skatole and indole cut-off levels, and percentage for each
235 general score of meat by untrained tasters were analyzed considering pigs as the experimental
236 unit using Fisher's exact test, with a total of 20 replicates per treatment, and the results are
237 presented as percentages.

238

239 **3. Results and Discussion**

240

241 *3.1. Gender effects of male pigs on reproductive organs*

242

243 In the weekly testicular assessment (Figure 1), boars presented higher testicular width
244 than immunocastrated pigs in the last 3 weeks before slaughter (+ 0.94 cm; + 1.95 cm; +2.33
245 cm, respectively; $P < 0.05$) and the week of slaughter (+ 2.46 cm; $P < 0.001$). From 9 to 4 weeks
246 before slaughter, there was no significant difference ($P > 0.05$). After slaughter, boars also had
247 higher testicular width ($P < 0.05$), weight ($P < 0.001$), and epididymis weight ($P < 0.001$) than
248 immunocastrated pigs (Table 2). There was no difference between animals in the two treatments
249 for bulbourethral gland weight ($P > 0.05$).

250 Immunocastration had a significant impact on testicular growth after the second dose of
251 the vaccine, which blocked the release of GnRH from the hypothalamus and the secretion of
252 luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone from the anterior pituitary gland,
253 consequently inhibiting the development of male reproductive organs (Fàbrega et al., 2010;
254 Lugar et al., 2016; Pauly et al., 2009; Zoels et al., 2020). In this study, immunocastration was
255 effective in reducing the size of reproductive organs. After the second dose of
256 immunocastration, steroid production was drastically reduced, and the testicles needed time to
257 reduce because they are made of solid tissue. As steroids are necessary for the normal function
258 of the accessory sexual glands, the production of seminal fluid in the seminal vesicles ceases
259 when the animal is immunized, and the low-viscosity seminal fluid is quickly reabsorbed
260 (Bonneau, 2010). However, the bulbourethral glands have thicker walls, more viscous content,
261 and a more elongated form than the seminal vesicles; thus, their reabsorption is slower.
262 Therefore, the weight and function of the bulbourethral glands decreased very slowly after the
263 second dose of vaccine (Bonneau, 2010). This may explain why there was no difference in the
264 bulbourethral glands between immunocastrated pigs and boars.

265

266 *3.2. Gender effects of male pigs on performance*

267

268 The daily feed intake (Table 3) of immunocastrated pigs was higher than that of boars
269 at finishing phase II ($P < 0.05$). For daily feed intake at finishing phase I and the total finishing
270 period, there was no difference between treatments ($P > 0.05$). Boars presented better feed
271 conversion at finishing phase II than immunocastrated pigs ($P < 0.05$). However, at finishing
272 phase I and the total finishing period, there was no difference between animals of the two
273 treatments ($P > 0.05$). There was no difference in weight and daily weight gain between boars
274 and immunocastrated pigs at all finishing periods.

275 With the effects on reproductive organs and feed intake, the results of this study may
276 confirm that immunocastrated males have reduced steroidogenic capacity after the second dose
277 (Dunshea et al., 2008). The effects on steroidogenic capacity persist at least 8 weeks after the
278 second dose, even though antibody titers decrease (Dunshea et al., 2008). In a meta-analysis of
279 19 studies, between the second immunization and slaughter, compared with boars, the
280 immunization against GnRF significantly increased feed consumption rate in immunocastrated
281 males. Small increases in feed conversion rate appeared to occur in smaller groups (4–8
282 pigs/pen), where negative activities, such as aggression and sexual activity, were not be as high
283 as in larger groups (Dunshea et al., 2013). This may explain the results of this study because all
284 male pigs were housed in pairs (two pigs per pen).

285

286 *3.3. Gender effects of male pigs on stress indicators*

287

288 In the evaluation of fighting and mounting behaviors in the lairage pens (data not
289 shown), there were 70 observations for boar mounting behavior and only three observations for
290 immunocastrated pigs during 2 h. Thus, the boars exhibited a 23.30 times higher incidence of
291 mounting behavior than the immunocastrated pigs (numerical difference). For fighting
292 behavior, there were 78 observations for boars and 21 for immunocastrated pigs during 2 h.
293 Therefore, the boars exhibited 3.70 times higher fighting behavior than the immunocastrated
294 pigs (numerical difference).Boars had a higher degree of lesions in the carcass than
295 immunocastrated pigs ($P < 0.05$; Table 4). On average, boar carcasses were classified as lightly
296 lesioned, and immunocastrated pig carcasses were classified as having no lesions. There was
297 no difference in the percentage of carcasses for each degree of lesion (data not shown). For
298 score 1 (no lesion), 35 % of boar carcasses and 60 % immunocastrated pig carcasses ($P = 0.205$)
299 displayed this value. For score 2 (lightly lesioned), 45 % boar carcasses and 40 %

300 immunocastrated pig carcasses displayed this score ($P = 1.000$). For score 3 (slightly lesioned),
301 20 % boar carcasses and 0 % immunocastrated pig carcasses were recorded ($P = 0.106$). No
302 animal presented carcasses that were (score 4) moderately lesioned or (score 5) severely
303 lesioned. There was no difference ($P > 0.05$) in cortisol levels and R-value (ATP depletion)
304 between boars and immunocastrated pigs (Table 4).

305 The higher fighting and mounting behavior observed in the lairage pen may explain the
306 higher degree of lesions in the boar carcasses. The fact that the pigs were housed in pairs on the
307 farm and then mixed in the transport and lairage pen (20 pigs of the same treatment in each pen)
308 may have contributed to these results. According to Staaveren et al. (2015), mixing boars from
309 other pens before transport to slaughterhouse stimulates mounting and fighting behavior,
310 resulting in an increased risk of skin lesions. The incidence of aggressive behaviors is associated
311 with increased cortisol levels in plasma (Fernandez et al., 1994a) and degree of skin lesions
312 (Teixeira and Boyle, 2014) and muscle glycogen depletion (Fernandez et al., 1994b). Generally,
313 boars showed higher aggressive behaviors and, consequently, higher levels of plasma cortisol
314 (Kress et al., 2020) and higher degree of skin lesions (Rydhmer et al., 2010) than
315 immunocastrated pigs.

316 However, in this study, there was a difference between the degree of lesions in the
317 carcasses, but no difference in stress indicators (cortisol and R value) of boars and
318 immunocastrated pigs. This may have occurred because transport and lairage conditions were
319 good and their durations allowed pigs to rest and establish their body reserves (Terlouw et al.,
320 2008). Strange pigs mixed in a new pen presented higher numbers of fights in the first 30 min
321 in the lairage pen. Regardless of whether the pigs were from individual or mixed producer lots,
322 the pigs settled down after 1 h in the lairage pen. Therefore, penning the pigs for 1 to 2 h before
323 slaughter is recommended as a sufficient time to allow the pigs to settle down (Moss, 1978).
324 Thus, the lack of difference between treatments for stress indicators could be attributed to the

325 time (2 h) in the lairage pen, which was sufficient for the animals to rest and recover their body
326 reserves before slaughter.

327

328 *3.4. Gender effects of male pigs on boar taint compounds*

329

330 Boars presented higher skatole levels ($P < 0.001$) than immunocastrated pigs (Table 4).
331 However, for indole levels, there was no difference between animals of the two treatments (P
332 > 0.05). Higher skatole concentrations in boars than in immunocastrated pigs have also been
333 reported in other studies (Han et al., 2019; Kress et al., 2020; Škrlep et al., 2012). This result
334 highlights that the immunocastration vaccine was effective in reducing the levels of
335 compounds, such as skatole, that cause boar taint (Gispert et al., 2010; Kress et al., 2020; Pauly
336 et al., 2009).

337 Skatole (3-methylindole) and androstenone (5α -androst-16-ene-3-one) are compounds
338 primarily responsible for boar taint. However, other chemicals that might also contribute to a
339 lesser degree to boar taint include androstenols, indole, and benzylideneacetone (4-phenyl-3-
340 buten-2-one) (Squires and Bonneau, 2014). The indole concentrations did not differ between
341 animals of the two treatments, as observed in the study conducted by Batorek et al. (2012).
342 However, indole may not have a direct effect on boar taint perception. In cases where skatole
343 concentrations are low, indole may compensate for the effects of skatole (Annor-Frempong et
344 al., 1997).

345 The skatole levels in the fat of boars usually vary from 0.00 to 0.8 ug/g; however, it can
346 reach up to 1.5 ug/g. Castrated male and female pigs usually exhibit skatole concentrations of
347 approximately 0.3 ug/g (Babol and Squires, 1995). The cut-off level that defines a limit between
348 untainted and tainted samples suggested for skatole is >0.20 ug/g (Squires and Bonneau, 2014)
349 and for indole is >0.10 ug/g in pig fat (Aluwé et al., 2009). In this study, the skatole cut-off

350 level was higher in boar carcasses than in immunocastrated male pigs ($P = 0.047$). Boars
351 presented levels above the cut-off in 25% of carcasses (5 out of 20 carcasses), whereas none of
352 the immunocastrated pig carcasses had levels of >0.20 ug/g (data not shown). For indole cut-
353 off levels (>0.10 ug/g), there was no difference between animals of the two treatments ($P =$
354 0.501). Boars presented levels above the cut-off in 40% of carcasses (8 out of 20 carcasses),
355 whereas only 25% of immunocastrated pig carcasses were above the cut-off (5 out of 20
356 carcasses) for indole levels. In this study, the mean skatole and indole concentrations found in
357 boars and immunocastrated pigs were below the cut-off levels. These results may be considered
358 positive because high percentages of skatole concentrations above the cut-off level are not very
359 promising to produce boars for markets where the boar taint is perceived as a problem (Walstra
360 et al., 1999).

361

362 *3.5. Gender effects of male pigs on meat chemical composition*

363

364 Boars presented higher levels of moisture ($P < 0.001$) and lower percentages of protein
365 and fat ($P < 0.05$) than immunocastrated pigs (Table 4). For ash and fat:protein ratio, there was
366 no difference between animals of the two treatments ($P > 0.05$). The highest meat moisture
367 percentage of boars was good in terms of meat quality. In addition to natural and thermal loss,
368 the free water content (moisture) is an important parameter for the processing of meat products
369 and for the organoleptic value of meat (Babol and Squires, 1995; Grela et al., 2020).

370 The same results were observed by Škrlep et al. (2020); the percentage of meat protein
371 followed that of meat fat, and as such, boars showed lower protein and fat contents than
372 immunocastrated pigs. Testicular steroid synthesis in boars includes that of androgens and
373 estrogen (Claus and Hoffmann, 1980), increasing anabolic potential and, consequently,
374 providing a high capacity for protein deposition (Claus et al., 1994) and lower intramuscular

375 lipid deposition (Martin et al., 1968). The high amount of protein in immunocastrated pigs could
376 be explained by the benefits derived from the effects of testicular steroids during the growth
377 and deposition time, which is the same time as that of boars (Dunshea et al., 2001). However,
378 because muscle is one of the last tissues where fat tends to deposit during growth (Óvilo et al.,
379 2000), the immunocastrated pigs had deposited more fat than boars. After the second dose of
380 the immunocastration vaccine, the pigs were effectively castrated and deprived of hormonal
381 action (Dunshea et al., 2001).

382

383 *3.6. Gender effects of male pigs on fatty acid profile and lipid oxidation*

384

385 The results for saturated fatty acids (SFA) indicated that boar meat presented lower
386 lauric and palmitic acid contents ($P < 0.05$) than immunocastrated pork (Table 5). For other
387 SFAs and monounsaturated acids (MUFAs), there was no difference between meats of the two
388 treatments ($P > 0.05$). Boar meat presented higher contents of dihomo- γ -linolenic and
389 arachidonic polyunsaturated acids (PUFAs; $P > 0.05$) than immunocastrated pork. For other
390 PUFAs, there was no difference between meats of the two treatments ($P > 0.05$). Regarding the
391 total fatty acid profile, boar meat had a lower percentage of SFA and higher contents of
392 unsaturated fatty acids (UFA), PUFA, and omega 6 (N6), and the PUFA:SFA ratio than
393 immunocastrated pigs ($P < 0.05$). Contents of MUFA and omega 3 (N3), the N6:N3 ratio, and
394 level of TBARS (lipid oxidation) were not significantly different between the two treatments
395 ($P > 0.05$). According to Wood et al. (2008), pigs have a much higher proportion of PUFA
396 (linoleic acid) in adipose tissue and muscle than do cattle or sheep. In addition to the species,
397 the reproductive status of pigs can also interfere with the proportion of fatty acids, as shown in
398 this study. Consistent with the results of Grela, Kowalczyk-Vasilev, and Klebaniuk (2013), who

399 showed lower SFA and higher PUFA contents in boar meat than in immunocastrated pork, there
400 was no difference in MUFA and the N6:N3 ratio in the meat of both treatments.

401 The higher percentage of SFA in immunocastrated pork is beneficial from a
402 technological viewpoint (Čandek-Potokar et al., 2017). A high PUFA:SFA ratio improves the
403 nutritional value of meat, although it may affect meat quality (Grela et al., 2013; Teye et al.,
404 2006). Because of the very different melting points, the variation in fatty acid composition has
405 an important effect on the firmness and color of meat fat (subcutaneous, intermuscular, and
406 intramuscular). Furthermore, the ability of UFAs, especially PUFAs, to oxidize quickly is
407 important for regulating the shelf life of meat (rancidity and color deterioration). However, the
408 propensity to oxidize is important for the development of taste during cooking (Wood et al.,
409 2003).

410 The fatty acid composition of muscle affects its oxidative stability during processing
411 and retail display, and PUFAs in phospholipids are susceptible to oxidative breakdown at this
412 stage (Wood et al., 2008). In this study, although there was a higher PUFA:SFA ratio in boar
413 meat than in immunocastrated pig meat, there was no reproductive status effect on oxidative
414 lipid stability (TBARS) of the meat; the same result was found by Grela et al. (2020). Another
415 important factor is the critical range of TBARS values (ranging from 0.5 to 1.0 mg MDA/kg),
416 because they indicate the levels of lipid oxidation products that produce a rancid odor and taste
417 that can be detected by consumers (Tarladgis et al., 1960; Wood et al., 2008). In this study,
418 meats in both treatments had TBARS values below the threshold range, which were positive
419 for pork quality.

420

421 *3.7. Gender effects of male pigs on sensory evaluation of fat and meat*

422

423 In the sensory evaluation performed by consumers, who were untrained tasters,
424 evaluation of the general characteristics (odor and taste), boar meat (3.39 ± 0.15) revealed a
425 higher average score in evaluations than immunocastrated pork (2.94 ± 0.15 ; $P = 0.032$);
426 however, the meat from both treatments was classified as (3) good. Regarding values for each
427 general meat score (Figure 2), a higher number of consumers evaluated immunocastrated pork
428 as extremely good (1) than that for boar meat ($P = 0.027$). There was no difference in the other
429 scores between the meat of both treatments (very good [2]: $P = 0.554$; good [3]: $P = 0.200$;
430 indifferent (4): $P = 1.000$; bad (5): $P = 0.831$; very bad (6): $P = 1.000$; and extremely bad (7): P
431 $= 0.497$).

432 Considering the general odor and flavor of fat and pork in the sensory evaluation
433 performed by sensory panels (Figure 3), on average, the tasters rated the general fat odor of
434 boars as (5) bad, whereas the fat odor of immunocastrated pigs ($P < 0.001$) was scored (4)
435 indifferent. For general pork odor, boar meat had a higher score than immunocastrated pork (P
436 $= 0.003$); however, meat of both treatments was classified as (4) indifferent. In the general pork
437 flavor of boars and immunocastrated pork, there was no difference ($P = 0.093$), and both were
438 classified as (4) indifferent.

439 Evaluation of the sensory characteristics of boar taint, skatole, and androstenone in fat,
440 and pork odor and flavor (Figure 4), boars had higher scores for boar taint sensory
441 characteristics in fat odor ($P = 0.003$), pork odor ($P < 0.001$), and flavor ($P = 0.024$) than
442 immunocastrated pigs; however, all these parameters were classified as (2) extremely weak in
443 both treatments. In fat odor of skatole, boar fat had a higher score than immunocastrated pig fat
444 ($P = 0.031$), both of which were classified as (1) none. For pork odor of skatole, boar meat had
445 a higher score than immunocastrated pig meat ($P = 0.045$), and boar meat was classified as (2)
446 extremely weak, whereas immunocastrated pig meat was classified as (1) none. For skatole

447 flavor in pork, there was no difference between meat of both treatments ($P = 0.575$); both were
448 classified as (1) none.

449 Boars showed higher scores for fat and pork odor of skatole than immunocastrated pigs,
450 and the scores were not classified as strong (5), very strong (6), or extremely strong (7) (Figure
451 4). This can be explained by skatole levels in boars that were below cut-off levels (>0.20 ug/g)
452 (Squires and Bonneau, 2014). Androstenone odor in the boar fat had a higher score ($P < 0.001$)
453 and were more often classified as (3) very weak than that of immunocastrated pig fat, which
454 was classified as (2) extremely weak (Figure 4). Androstenone odor in boar meat was higher
455 than that in immunocastrated pork ($P = 0.039$), but both were classified as (2) extremely weak.
456 For the meat flavor of androstenone, there was no difference ($P = 0.745$) between the two
457 treatments, and both were classified as (2) extremely weak.

458 The results of this study agree with the results of Font-i-Furnols et al. (2009) who found
459 higher scores from trained panelists for meat flavor and odor for androstenone and skatole in
460 boars than in immunocastrated pigs. According to Pauly et al. (2010), the taste and smell of
461 pork from boars are less acceptable than those of immunocastrated male pork. Although
462 differences were found in the pork boar taint flavor, there was no difference between both
463 treatments in general or skatole or androstenone pork flavors. This may have occurred because
464 the boar taint flavor can be related to the level of androstenone and skatole compounds relative
465 to that of other compounds, including androstenols, indole, and 4-phenyl-3-buten-2-one
466 (Squires and Bonneau, 2014).

467 Jeong et al. (2011) conducted sensory analysis with trained panelists and found no
468 differences in the flavor or odor of meat from boars and immunocastrated males. Studies
469 conducted with pork consumers (untrained tasters) also found no differences in odor or flavor
470 between treatments (Channon et al., 2018; Moore et al., 2017). In this study, the consumers
471 (untrained tasters) in the meat general evaluation (odor and flavor) classified the meat of boars

472 and immunocastrated pigs as (3) good. Precisely, they showed no rejection of odor or flavor
473 because of the presence of boar taint. This result shows that Brazilian consumers may accept
474 boar meat. However, the sensory panels in the evaluation of meat general odor and flavor of
475 boars classified the meat of boars and immunocastrated pigs as (4) indifferent.

476 The differences between studies may be attributed to the composition of the panelists
477 (tasters) (Moore et al., 2017). This divergence can be explained because trained panelists have
478 enhanced perception skills, as they are well prepared and tend to be extremely accurate in the
479 perception of odor and flavor. According to Aluwé et al. (2012), informing tasters about the
480 possible presence of boar taint can improve their sensory perception. Additionally, the
481 acceptability of pork also depends on factors such as gender, age, and consumer culture in
482 different countries (Yamsakul et al., 2017).

483

484 **4. Conclusion**

485

486 Immunocastration has been confirmed to be effective and to decrease the size of
487 reproductive organs. Boars showed better performance characteristics than immunocastrated
488 pigs. There were no reproductive status effects on stress indicators or lipid oxidation. Boars
489 showed the highest meat moisture content, which may positively affect meat quality. The fatty
490 acid profile of boars showed positive results from a nutritional point of view. The highest levels
491 of skatole, as well as the highest scores in sensory evaluation occurred for boar meat samples;
492 however, there were no classifications reflecting meat rejection. Therefore, this study provides
493 evidence that there are established differences between the reproductive status of male pigs, but
494 these differences do not compromise the quality and acceptability of boar meat. However, to
495 enable the production and consumption of boar meat in Brazil, these results need to be further
496 explored.

497

498 **Acknowledgments**

499 To the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES),
500 Brazilian Federal Agency, for granting the scholarship.

501

502 **References**

503 Altmann, J., 1974. Observational Study of Behavior: Sampling Methods. *Behaviour*, 49, 227-
504 267. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/4533591> (Accessed 10 December 2020).

505 Aluwé, M., Tuyttens, F.A.M., Bekaert, K.M., De Smet, S., De Brabander, D.L., Millet, S.,
506 2012. Evaluation of various boar taint detection methods. *Anim.* 6, 1868-1877.
507 <https://doi.org/10.1017/S1751731112000821>.

508 Aluwé, M., Millet, S., Nijs, G., Tuyttens F. A. M., Verheyden, K., De Brabander, H. F., De
509 Brabander, D. L., & Van Oeckel, M. J. (2009). Absence of an effect of dietary fibre or
510 clinoptilolite on boar taint in entire male pigs fed practical diets. *Meat Sci.* 82, 346–352.
511 <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.02.001>.

512 Annor-Frempong, I.E., Nute, G.R., Whittington, F.W., Wood, J.D., 1997. The Problem of
513 Taint in Pork-II. The Influence of Skatole, Androstenone and Indole, Presented
514 Individually and in Combination in a Model Lipid Base, on Odour Perception. *Meat Sci.*
515 41(1/2), 49-61. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(97\)00039-9](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(97)00039-9).

516 Associação brasileira de normas técnicas (ABNT), 1993. Análise sensorial de alimentos e
517 bebidas – NBR 12806 (8 p.). Rio de Janeiro: ABNT.

518 Association of Official Agricultural Chemists (AOAC), 2016. Official Methods of Analysis of

- 519 AOAC Internacional, twenty ed.
- 520 Babol, J., Squires, E.J., 1995. Quality of meat from entire male pigs. *Food Res. Int.* 28(3),
521 201-212. [https://doi.org/10.1016/0963-9969\(95\)93528-3](https://doi.org/10.1016/0963-9969(95)93528-3).
- 522 Batorek, N., Škrlep, M., Prunier, A., Louveau, I., Noblet, J., Bonneau, M., Čandek-Potokar,
523 M., 2012. Effect of feed restriction on hormones, performance, carcass traits, and meat
524 quality in immunocastrated pigs. *J. Anim. Sci.* 90, 4593–4603.
525 <https://doi.org/10.2527/jas2012-5330>.
- 526 Bernau, M., Schwanitz, S., Kremer-Rücker, P.V., Kreuzer, L.S., Scholz, A.M., 2018. Size
527 matters: Boar taint in relationship with body composition and testis volume measured by
528 magnetic resonance imaging. *Livest. Sci.* 213, 7-13.
529 <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.04.008>.
- 530 Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can.*
531 *J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>.
- 532 Bonneau, M., 2010. Accessory sex glands as a tool to measure the efficacy of
533 immunocastration in male pigs. *Anim.* 4, 930–932.
534 <https://doi.org/10.1017/S1751731110000091>.
- 535 Brazil. Decreto, nº 10.468, de 18 de agosto de 2020. Altera o Decreto nº 9.013, de 29 de
536 março de 2017, que regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº
537 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre o regulamento da inspeção
538 industrial e sanitária de produtos de origem animal. Ministério da Agricultura, Pecuária e
539 Abastecimento, Brasília, D.F., 18 August 2020.

- 540 Brazil. Instrução Normativa nº 3, de 17 de janeiro de 2000. Regulamento técnico de métodos
541 de insensibilização para o abate humanitário de animais de açougue. Ministério da
542 Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, D.F., 17 January 2000.
- 543 Čandek-Potokar, M., Škrlep, M., Zamaratskaia, G., 2017. Immunocastration as Alternative to
544 Surgical Castration in Pigs. In: Theriogenology. Intech, pp. 109-126.
545 <https://doi.org/10.5772/intechopen.68650>.
- 546 Channon, H.A., D'Souzac, D.N., Dunshea, F.R., 2018. Eating quality traits of shoulder roast
547 and stir fry cuts outperformed loin and silverside cuts sourced from entire and
548 immunocastrated male pigs. *Meat Sci.* 136, 104–115.
549 <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.10.019>.
- 550 Claus, R., Weiler, U., Herzog, A., 1994. Physiological aspects of androstenone and skatole
551 formation in the boar: A review with experimental data. *Meat Sci.* 38, 289–305.
552 [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(94\)90118-X](https://doi.org/10.1016/0309-1740(94)90118-X).
- 553 Claus, R., Hoffmann, B., 1980. Oestrogens, compared to other steroids of testicular origin, in
554 bloodplasma of boars. *Acta Endocrinol.* 94, 404–411.
555 <https://doi.org/10.1530/acta.0.0940404>.
- 556 Dunshea, F.R., Allison, J.R.D., Bertram, M., Boler, D.D., Brossard, L., Campbell, R., Crane,
557 J.P., Hennessy, D.P., Huber, L., De Lange, C., Ferguson, N., Matzat, P., McKeith, F.,
558 Moraes, P.J.U., Mullan, B.P., Noblet, J., Quiniou, N., Tokach, M., 2013. The effect of
559 immunization against GnRF on nutrient requirements of male pigs: a review. *Anim.*
560 7(11), 1769–1778. <https://doi.org/10.1017/S1751731113001407>.

- 561 Dunshea, F.R., McCauley, I., Jackson, P., Long, K.A., Nugent, E.A., Simons, J.A., Walker, J.,
562 Hennessy, D.P., 2008. An immunocastration vaccine decreases boar taint compounds for
563 at least 8 weeks after the second vaccination. Proceedings of the 59th Annual Meeting of
564 the European Association for Animal Production, 103.
- 565 Dunshea, F.R., Calantoni, C., Howard, K., McCauley, I., Jackson, P., Long, K.A., Lopaticki,
566 S., Nugent, E.A., Simons, J.A., Walker, J., Hennessy, D.P., 2001. Vaccination of boars
567 with a GnRF vaccine (Improvac) eliminates boar taint and increases growth
568 performance. *J. Anim. Sci.* 79, 2524–2535. <https://doi.org/10.2527/2001.79102524x>.
- 569 Dutcosky, S.D., 2013. *Análise sensorial de alimentos*. Champagnat: Pucpress, Curitiba.
- 570 Fàbrega, E., Velarde, A., Cros, J., Gispert, M., Suarez, P., Tibau, J., Soler, J., 2010. Effect of
571 vaccination against gonadotropin-releasing hormone, using Improvac, on growth
572 performance, body composition, behaviour, and acute phase proteins. *Livest. Sci.* 132,
573 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.04.021>.
- 574 Fernandez, X., Meunier-Salaün, M.C., Mormede, P., 1994a. Agonistic behavior, plasma stress
575 hormones, and metabolites in response to dyadic encounters in domestic pigs:
576 Interrelationships and effect of dominance status. *Physiol. Behav.* 56(5), 841–847.
577 [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)90313-1](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)90313-1).
- 578 Fernandez, X., Meunier-Salaün, M.C., Ecolan, P., 1994b. Glycogen depletion according to
579 muscle and fibre types in response to dyadic encounters in pigs (*Sus scrofa domesticus*)-
580 relationships with plasma epinephrine and aggressive behaviour. *Comp. Biochem.*
581 *Physiol.* 109A(4), 869-879. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(94\)90234-8](https://doi.org/10.1016/0300-9629(94)90234-8).

- 582 Font-i-Furnols, M., 2012. Consumer studies on sensory acceptability of boar taint: A review.
583 Meat Sci. 92, 319–329. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.05.009>.
- 584 Font-i-Furnols, M., González, J., Gispert, M., Oliver, M.A., Hortós, M., Pérez, J., Suárez, P.,
585 Guerrero, L., 2009. Sensory characterization of meat from pigs vaccinated against
586 gonadotropin releasing factor compared to meat from surgically castrated, entire male
587 and female pigs. Meat Sci. 83, 438–442. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.06.020>.
- 588 Gispert, M., Oliver, M.À., Velarde, A., Suarez, P., Pérez, J., Font-i-Furnols, M., 2010.
589 Carcass and meat quality characteristics of immunocastrated male, surgically castrated
590 male, entire male and female pigs. Meat Sci. 85, 664–670.
591 <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.03.021>.
- 592 Grela, E.R., Świątkiewicz, M., Kowalczyk-Vasilev, E., Florek, M., Kosior-Korzecka, U.,
593 Skalecki, P., 2020. An attempt of implementation of immunocastration in swine
594 production – impact on meat physicochemical quality and boar taint compound
595 concentration in the meat of two native pig breeds. Livest. Sci. 232, 103905.
596 <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.103905>.
- 597 Grela, E.R., Kowalczyk-Vasilev, E., Klebaniuk, R., 2013. Performance, pork quality and fatty
598 acid composition of entire males, surgically castrated or immunocastrated males, and
599 female pigs reared under organic system. Pol. J. Vet. Sci. 16(1), 107–114.
600 <https://doi.org/10.2478/pjvs-2013-0015>.
- 601 Han, X., Zhou, M., Cao, X., Du, X., Meng, F., Bu, G., Kong, F., Huang, A., Zeng, X., 2019.
602 Mechanistic insight into the role of immunocastration on eliminating skatole in boars.
603 Theriogenology 131, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.03.017>.

- 604 Honikel, K. O., Fischer, C., 1977. A rapid method for the detection of PSE and DFD porcine
605 muscle. *J. Food Sci.* 42(6), 1633-1636. [https://doi.org/10.1111/j.1365-](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1977.tb08444.x)
606 [2621.1977.tb08444.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1977.tb08444.x).
- 607 International Organization for Standardization (ISO), 1978. *Animal and vegetable fats and*
608 *oils. Preparation of methyl esters of fatty acids.* Geneve, Method ISO 5509, pp.1-6.
- 609 Jeong, J-Y., Choi, J-H., Choi, Y-S., Han, D-J., Kim, H-Y., Lee, M-A., Lee, D-H., Kim, C-J.,
610 2011. The Effects of Immunocastration on Meat Quality and Sensory Properties of Pork
611 Bellies. *Korean Journal Food Science Anim. Resour.* 31(3), 372-380.
612 <https://doi.org/10.5851/kosfa.2011.31.3.372>.
- 613 Kress, K., Weiler, U., Schmucker, S., Čandek-Potokar, M., Vrecl, M., Fazarinc, G., Škrlep,
614 M., Batorek-Lukač, N., Stefanski, V., 2020. Influence of Housing Conditions on
615 Reliability of Immunocastration and Consequences for Growth Performance of Male
616 Pigs. *Animals* 10, 27. <https://doi.org/10.3390/ani10010027>.
- 617 Lugar, D.W., Rhoads, M.L., Clark-Deener, S.G., Callahan, S.R., Revercom, A.K., Prusa, K.J.,
618 Estienne, M.J., 2016. Immunological castration temporarily reduces testis size and
619 function without long-term effects on libido and sperm quality in boars. *Anim.* 11(4),
620 643-649. <https://doi.org/10.1017/S1751731116002081>.
- 621 Martin, A.H., Fredeen, H.T., Stohart, J.G., 1968. Taste panel evaluation of sex effects on the
622 quality of cooked pork. *Can. J. Anim. Sci.* 48,171–179. [https://doi.org/10.4141/cjas68-](https://doi.org/10.4141/cjas68-023)
623 [023](https://doi.org/10.4141/cjas68-023).
- 624 Meat and Livestock Commission (MLC), 1985. Concern at ringside damage in pigs. *Meat and*

- 625 marketing Technical Notes. Milton Keynes, UK: Bletchley, pp. 14–16.
- 626 Mendes, R., Cardoso, C., Pestana, C., 2009. Measurement of malondialdehyde in fish: a
627 comparison study between HPLC methods and the traditional spectrophotometric test.
628 Food Chem. 112(4), 1038-1045. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.052>.
- 629 Mendonça, F.J., 2016. Avaliação de oxidação lipídica por malonaldeído usando
630 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em carne de frango e suína. MSc Thesis,
631 Universidade Estadual de Londrina, Brasil.
- 632 Moore, K.L., Mullan, B.P., Dunshea, F.R., 2017. Boar taint, meat quality and fail rate in
633 entire male pigs and male pigs immunized against gonadotrophin releasing factor as
634 related to body weight and feeding regime. Meat Sci. 125, 95–101.
635 <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.11.023>.
- 636 Moss, B.W., 1978. Some observations on the activity and aggressive behaviour of pigs when
637 penned prior to slaughter. Appl. Anim. Ethol. 4, 323–339. [https://doi.org/10.1016/0304-](https://doi.org/10.1016/0304-3762(78)90004-4)
638 [3762\(78\)90004-4](https://doi.org/10.1016/0304-3762(78)90004-4).
- 639 Oskam, I.C., Lervik, S., Tajet, H., Dahl, E., Ropstad, E., Andresen, Ø., 2010. Differences in
640 testosterone, androstenone, and skatole levels in plasma and fat between pubertal
641 purebred Duroc and Landrace boars in response to human chorionic gonadotrophin
642 stimulation. Theriogenology, 74, 1088–1098.
643 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.05.006>.
- 644 Óvilo, C., Pérez-Enciso, M., Barragán, C., Clop, A., Rodríguez, C., Oliver, M.A., Toro, M.A.,
645 Noguera, J.L., 2000. A QTL for intramuscular fat and backfat thickness is located on

- 646 porcine Chromosome 6. *Mamm. Genome* 11, 344–346.
647 <https://doi.org/10.1007/s003350010065>.
- 648 Pauly, C., Spring-Staehli, P., O'Doherty, J.V., Kragten, S.A., Dubois, S., Messadène, J., Bee,
649 G., 2010. The effects of method of castration, rearing condition and diet on sensory
650 quality of pork assessed by a trained panel. *Meat Sci.* 86, 498–504.
651 <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.05.042>.
- 652 Pauly, C., Spring, P., Doherty, J.V.O., Kragten, S.A., Bee, G., 2009. Growth performance,
653 carcass characteristics and meat quality of group-penned surgically castrated,
654 immunocastrated entire male pigs. *Anim.* 3, 1057–1066.
655 <https://doi.org/10.1017/S1751731109004418>.
- 656 R Core Team, 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation
657 for Statistical Computing. Vienna, Austria. Retrieved from <http://www.R-project.org/>
658 (Accessed 4 October 2020).
- 659 Rostagno, H.S., Albino, L.F.T., Donzele, J.L., Gomes, P.C., Oliveira, R.F., Lopes, D.C.,
660 Ferreira, A. S., Barreto, S.L.T., Euclides, R.F., 2011. Tabelas brasileiras para aves e
661 suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais, third ed. Minas Gerais,
662 Viçosa: Universidade Federal de Viçosa.
- 663 Rydhmer, L., Lundström, K., Andersson, K., 2010. Immunocastration reduces aggressive and
664 sexual behaviour. *Anim.* 4, 965–972. <https://doi.org/10.1017/S175173111000011X>.
- 665 Škrlep, M., Poklucar, K., Kress, K., Vrecl, M., Fazarinc, G., Lukač, N.B., Weiler, U.,
666 Stefanski, V., Čandek-Potokar, M., 2020. Effect of immunocastration and housing

- 667 conditions on pig carcass and meat quality traits. *Transl. Anim. Sci.* 4, 1224–1237.
668 <https://doi.org/10.1093/tas/txaa055>.
- 669 Škrlep, M., Batorek, N., Bonneau, M., Prevolnik, M., Kubale, V., Čandek-Potokar, M., 2012.
670 Effect of immunocastration in group-housed commercial fattening pigs on reproductive
671 organs, malodorous compounds, carcass and meat quality. *Czech J. Anim. Sci.* 57(6),
672 290–299. <https://doi.org/10.17221/5964-CJAS>.
- 673 Squires, E.J., Bone, C., Cameron, J., 2020. Pork Production with Entire Males: Directions for
674 Control of Boar Taint. *Animals*, 10, 1665. <https://doi.org/10.3390/ani10091665>.
- 675 Squires E.J., Bonneau M., 2014. Boar taint: Biological causes and practical means to alleviate
676 it. In: *Encyclopedia of meat sciences*, Elsevier, pp. 97-103.
- 677 Staaveren, N., Teixeira, D.L., Hanlon, A., Boyle, L.A., 2015. The effect of mixing entire male
678 pigs prior to transport to slaughter on behaviour, welfare and carcass lesions. *Plos One*
679 10(4), e0122841. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122841>.
- 680 Tarladgis, B.G., Watts, B.M., Younathan, M.T., Dugan Jr., L., 1960. A distillation method for
681 malonaldehyde in rancid the quantitative foods. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 37, 44–48.
682 <https://doi.org/10.1007/BF02630824>.
- 683 Teixeira, D.L., Boyle, L.A., 2014. A comparison of the impact of behaviours performed by
684 entire male and female pigs prior to slaughter on skin lesionscores of the carcass. *Livest.*
685 *Sci.* 170, 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.09.026>.
- 686 Terlouw, E.M.C., Arnould, C., Auperin, B., Berri, C., Le Bihan-Duval, E., Deiss, V., Lefèvre,
687 F., Lensink, B.J., Mounier, L., 2008. Pre-slaughter conditions, animal stress and welfare:

- 688 Current status and possible future research. *Anim.* 2(10), 1501–1517.
689 <https://doi.org/10.1017/S1751731108002723>.
- 690 Teye, G. A., Sheard, P.R., Whittington, F.M., Nute, G.R., Stewart, A., Wood, J.D., 2006.
691 Influence of dietary oils and protein level on pork quality. 1. Effects on muscle fatty acid
692 composition, carcass, meat and eating quality. *Meat Sci.* 73, 157–165.
693 <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.11.010>.
- 694 Tomasevic, I., Bahelka, I., Čandek-Potokar, M., Čitek, J., Djekić, I., Kušec, I.D., Getya, A.,
695 Guerrero, L., Iordăchescu, G., Ivanova, S., Nakov, D., Sołowiej, B.G., Szabo, C.,
696 Tudoreanu, L., Weiler, U., Font-i-Furnols, M., 2019. Attitudes and beliefs of Eastern
697 European consumers towards piglet castration and meat from castrated pigs. *Meat Sci.*
698 160, 107965. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.107965>.
- 699 Ulbricht, T.L.V., Southgate, D.A.T., 1991. Coronary heart disease: Seven dietary factors. *The*
700 *Lancet*, 338, 985-103. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)91846-M](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)91846-M).
- 701 Walstra, P., Claudi-Magnussen, C., Chevillon, P., Von Seth, G., Diestre, A., Matthews, K.R.,
702 Homer, D. B., Bonneau, M., 1999. An international study on the importance of
703 androstenone and skatole for boar taint: levels of androstenone and skatole by country
704 and season. *Livest. Prod. Sci.* 62, 15-28. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(99\)00054-](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(99)00054-8)
705 8.
- 706 Wood, J.D., Enser, M., Fisher, A.V., Nute, G.R., Sheard, P.R., Richardson, R.I., Hughes, S.I.,
707 Whittington, F.M., 2008. Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A
708 review. *Meat Sci.* 78, 343–358. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.07.019>.

- 709 Wood, J.D., Richardson, R.I., Nute, G.R., Fisher, A.V., Campo, M.M., Kasapidou, E., Sheard,
710 P.R., Enser, M., 2003. Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Sci.* 66, 21–
711 32. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(03\)00022-6](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(03)00022-6).
- 712 Yamsakul, P., Patchanee, P., Yano, T., Boonma, T., Somkert, C., Sathanawongs, A., 2017.
713 Gonadotropin-releasing hormone immunization and castration in male pigs: effects on
714 growth, hormonal levels, antibody titer response, testicular function, back fat, and
715 consumers' sensory perceptions. *Korean J. Vet. Res.* 57(1), 23-29.
716 <https://doi.org/10.14405/kjvr.2017.57.1.23>.
- 717 Zoels, S., Reiter, S., Ritzmann, M., Weiß, C., Numberger, J., Schütz, A., Lindner, P.,
718 Stefanski, V., Weiler, U., 2020. Influences of immunocastration on endocrine
719 parameters, growth performance and carcass quality, as well as on boar taint and penile
720 injuries. *Animals*, 10, 346. <https://doi.org/10.3390/ani10020346>.

Tables

Table 1. Nutritional composition and energy percentage of rations provided to boars and immunocastrated male pigs in the finishing period.

Composition (%)	Finishing phase I	Finishing phase II
Grain corn	70.43	74.32
Soybean meal	22.30	18.12
Vitamin mineral core	3.00	3.00
Dicalcium phosphate	1.17	0.93
Salt	0.36	0.30
Soy oil	1.81	0.67
L-Lysine HCL	0.38	0.89
DL-Methionine	0.15	0.29
L-Threonine	0.14	0.39
L-Tryptophan	0.02	0.12
Adsorbent	0.25	-
Total (%)	100	100
Calculated values		
Metabolizable energy (Kcal/kg)	3.23	3.23
Crude protein (%)	16.20	15.53
Calcium (%)	1.10	1.05
Available phosphor (%)	0.31	0.25
Digestive lysine (%)	1.00	0.83
Digestive methionine (%)	0.37	0.40
Methionine + total cystine (%)	0.37	0.50
Digestive threonine (%)	0.67	0.55
Digestive tryptophan (%)	0.18	0.15
Potassium	0.61	0.41
Sodium (%)	0.23	0.15

Minimum guaranteed levels per kg of ration, including 30 kg/ton of Nucleus for pigs Advanced Sui 2018 Finishing period: maximum of

calcium 270 g/kg, and fluorine 2,000 mg/kg, and minimum of folic acid 10 mg/kg; pantothenic acid 208.90 mg/kg; biotin 0.47mg/kg; calcium

230 g/kg; cobalt 5.25 mg/kg; copper 450 mg/kg; iron 1.345 mg/kg; phytase 16,670 ftu/kg; phosphorus 18 g/kg; iodine 42 mg/kg; manganese

1.200 mg/kg; niacin 501.33 mg/kg; selenium 9.30 mg/kg; sodium 72 g/kg; vitamin A 109,670 IU/kg; vitamin B1 15.5 mg/kg; vitamin B12

611 mcg/kg; vitamin B2 62.04 mg/kg; vitamin B6 15.67 mg/kg; vitamin D3 28.000 IU/kg; vitamin E 125 IU/kg; vitamin K 62.67 mg/kg; zinc

2,250 mg/kg; zinc bacitracin 1,833.33 mg/kg.

Table 2. Reproductive organs of boars and immunocastrated male pigs after slaughter.

Variable	Boars		Immunocastrated		P value ^a
	Mean	SE	Mean	SE	
Testicular width (cm)	7.30	0.12	6.01	0.40	0.004
Testicular weight (g)	0.65	0.02	0.28	0.01	<0.001
Epididymis weight (g)	0.12	0.00	0.07	0.01	<0.001
Bulbourethral gland weight (g)	0.03	0.00	0.03	0.00	0.717

^a Significance at 5% probability ($P \leq 0.05$).

Table 3. Performance of boars and immunocastrated male pigs in finishing period.

Variable	Boars		Immunocastrated		P value ^a
	Mean	SE	Mean	SE	
Weight (kg)					
Finishing phase I	73.07	1.31	73.20	1.07	0.937
Finishing phase II	102.55	1.59	103.85	1.46	0.550
Total finishing period	124.90	2.06	128.34	1.66	0.201
Daily weight gain (kg)					
Finishing phase I	1.05	0.04	1.09	0.03	0.378
Finishing phase II	1.12	0.05	1.22	0.04	0.102
Total finishing period	1.08	0.04	1.15	0.03	0.130
Daily feed intake (kg)					
Finishing phase I	2.41	0.09	2.63	0.06	0.063
Finishing phase II	3.47	0.15	4.52	0.08	<0.001
Total finishing period	2.77	0.17	3.13	0.15	0.126
Feed conversion					
Finishing phase I	2.31	0.07	2.39	0.05	0.363
Finishing phase II	3.15	0.06	3.70	0.11	<0.001
Total finishing period	2.69	0.06	2.82	0.07	0.173

^a Significance at 5% probability ($P \leq 0.05$).

Table 4. Stress indicators, boar taint compounds, meat chemical composition of boars and immunocastrated male pigs.

Variable	Boars		Immunocastrated		P value ^a
	Mean	SE	Mean	SE	
Stress indicators					
Carcass lesions	1.85	0.17	1.40	0.11	0.031
Cortisol (µg/dL)	7.28	0.70	6.67	0.63	0.530
R-value	1.09	0.04	1.11	0.03	0.670
Boar taint compounds					
Skatole (ug/g)	0.13	0.02	0.04	0.00	<0.001
Indole (ug/g)	0.09	0.01	0.09	0.01	0.917
Meat chemical composition					
Moisture (%)	74.53	0.18	73.16	0.34	<0.001
Protein (%)	22.80	0.21	23.88	0.46	0.038
Fat (%)	1.14	0.15	1.59	0.14	0.039
Ash (%)	1.06	0.01	1.01	0.03	0.110
Fat:protein ratio	0.05	0.01	0.07	0.01	0.068

^a Significance at 5% probability ($P \leq 0.05$).

Table 5. Fatty acids profile and lipid oxidation in *longissimus thoracis et lumborum* of boars and immunocastrated male pigs.

Variable	Boars		Immunocastrated		P value ^a
	Mean	SE	Mean	SE	
Saturated fatty acids (%)					
C10:0, capric acid	0.03	0.01	0.04	0.01	0.388
C12:0, lauric acid	0.00	0.00	0.03	0.01	0.003
C14:0, myristic acid	1.69	0.78	1.09	0.09	0.471
C16:0, palmitic acid	19.83	1.18	23.45	0.85	0.019
C17:0, agaric acid	0.39	0.04	0.37	0.03	0.778
C18:0, stearic acid	11.85	0.54	12.71	0.67	0.320
C20:0, arachidic acid	0.07	0.02	0.11	0.03	0.231
Monounsaturated fatty acids (%)					
C16:1 n-7, palmitolenic acid	0.26	0.16	0.31	0.17	0.843
C16:1 n-9, 7-hexadecenoic acid	1.60	0.24	1.96	0.27	0.321
C17:1 n-9, 8-hexadecenoic acid	0.20	0.04	0.19	0.03	0.868
C18:1 n-9, oleic acid	36.10	1.46	38.22	1.98	0.392
C20:1 n-9, gondoic acid	0.42	0.09	0.60	0.11	0.211
Polyunsaturated fatty acids (%)					
C18:2 n-6, linoleic acid	16.43	0.74	14.26	0.82	0.057
C18:3 n-3, α -linolenic acid	0.57	0.07	0.80	0.17	0.220
C20:2 n-6, 11,14-eicosadienic acid	0.57	0.07	0.83	0.24	0.287
C20:3 n-6, dihomo- γ -linolenic acid	0.59	0.12	0.22	0.03	0.006
C20:4 n-6, arachidonic acid	3.70	0.55	2.39	0.27	0.043
C20:3 n-3, 11,14,17-eicosatrienoic acid	0.32	0.10	0.22	0.13	0.555
C20:5 n-3, timnodonic acid	1.43	1.21	0.01	0.01	0.263
C22:4 n-6, adrenic acid	1.96	0.67	0.95	0.14	0.155
C22:5 n-3, clupanodonic acid	0.52	0.21	0.27	0.12	0.335
C22:6 n-3, cervonic acid	1.47	0.36	0.94	0.16	0.193
Total fatty acids					
Saturated - SFA (%)	33.85	0.91	37.82	1.46	0.025
Unsaturated - UFA (%)	66.15	0.91	62.18	1.46	0.025
Monounsaturated - MUFA (%)	38.59	1.64	41.28	1.88	0.287
Polyunsaturated - PUFA (%)	27.56	2.32	20.90	1.40	0.021
Omega 3 – N3 (%)	4.31	1.32	2.24	0.30	0.145
Omega 6 – N6 (%)	23.25	1.77	18.66	1.18	0.040
N6:N3 ratio	11.70	3.16	9.54	0.67	0.518
PUFA:SFA ratio	0.86	0.10	0.57	0.05	0.018
Lipid oxidation					
TBARS (mg MDA/kg)	0.44	0.03	0.40	0.03	0.489

^a Significance at 5% probability ($P \leq 0.05$).

Figures

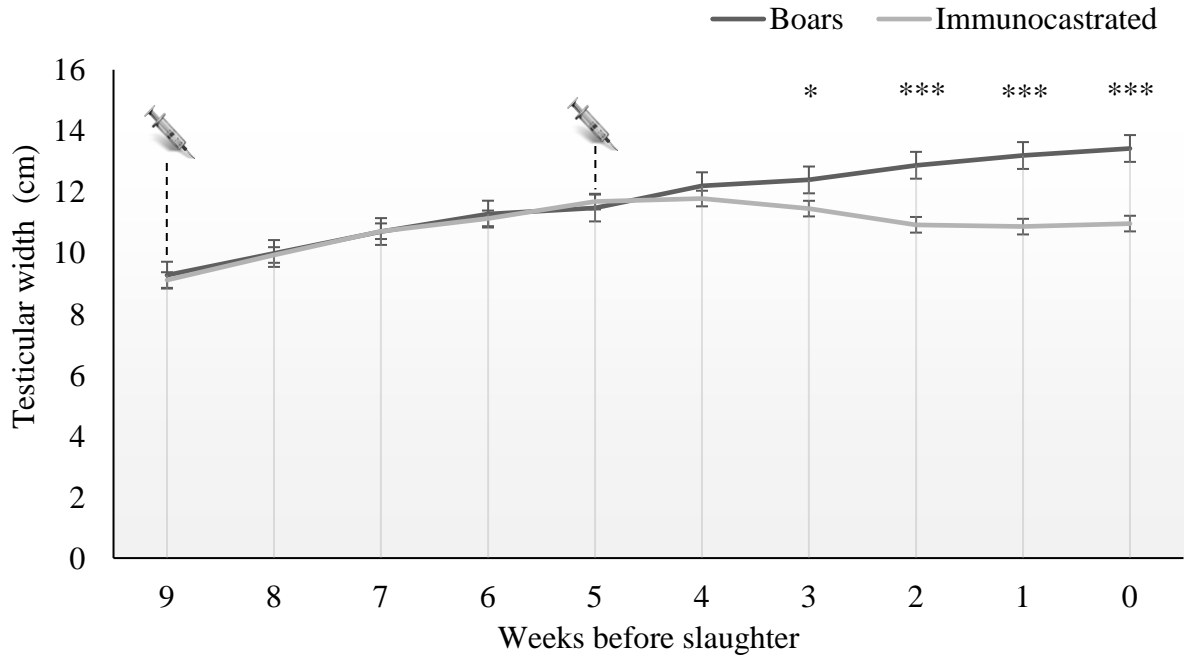


Figure 1. Weekly assessment of testicular width in boars and immunocastrated male pigs on farm. Average differences in each week are indicated by * and *** for $P < 0.05$ and $P < 0.001$, respectively.

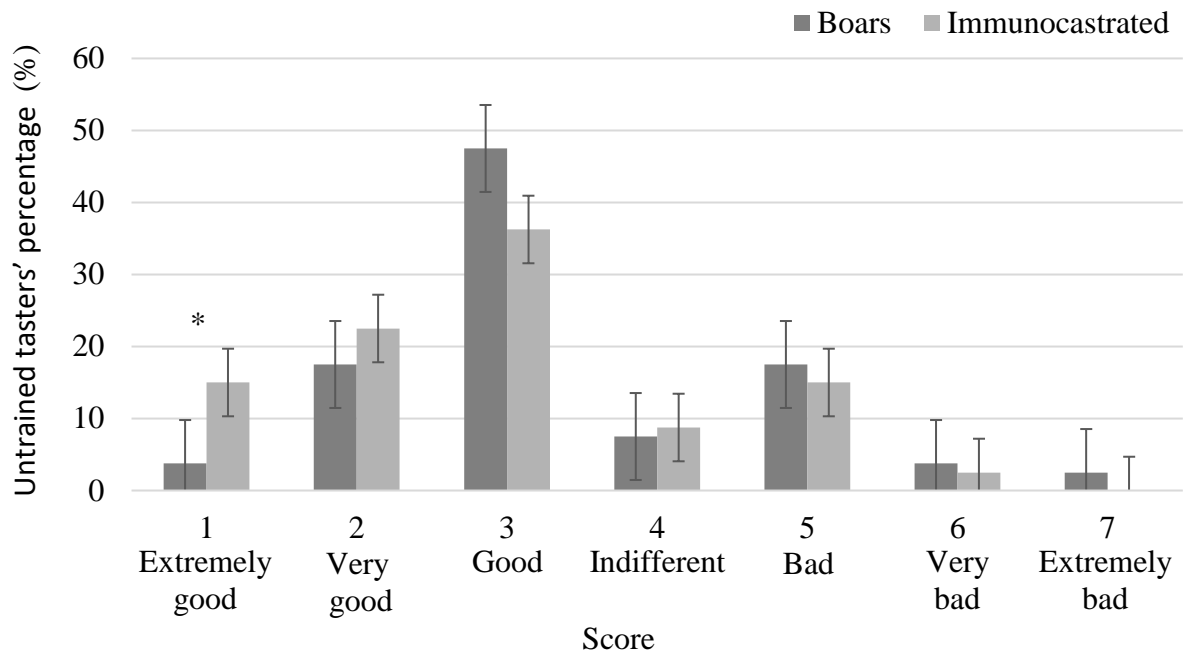


Figure 2. Untrained tasters' percentage in each general score, odor and taste, in the meat sensory evaluation of boars and immunocastrated male pigs. Average differences in each score are indicated by * for $P < 0.05$.

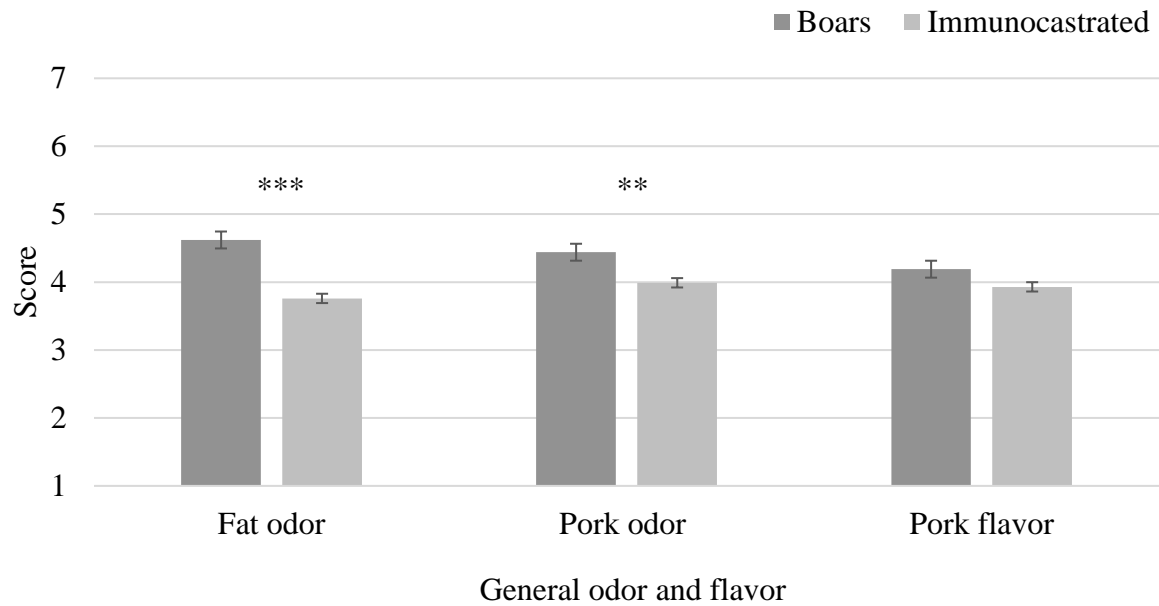


Figure 3. General fat and pork odor and pork flavor in sensory evaluation of sensory panels. Average differences in each sensory parameter are indicated by ** and *** for $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively. Score: (1) extremely good, (2) very good, (3) good (4) indifferent, (5) bad, (6) very bad, and (7) extremely bad.

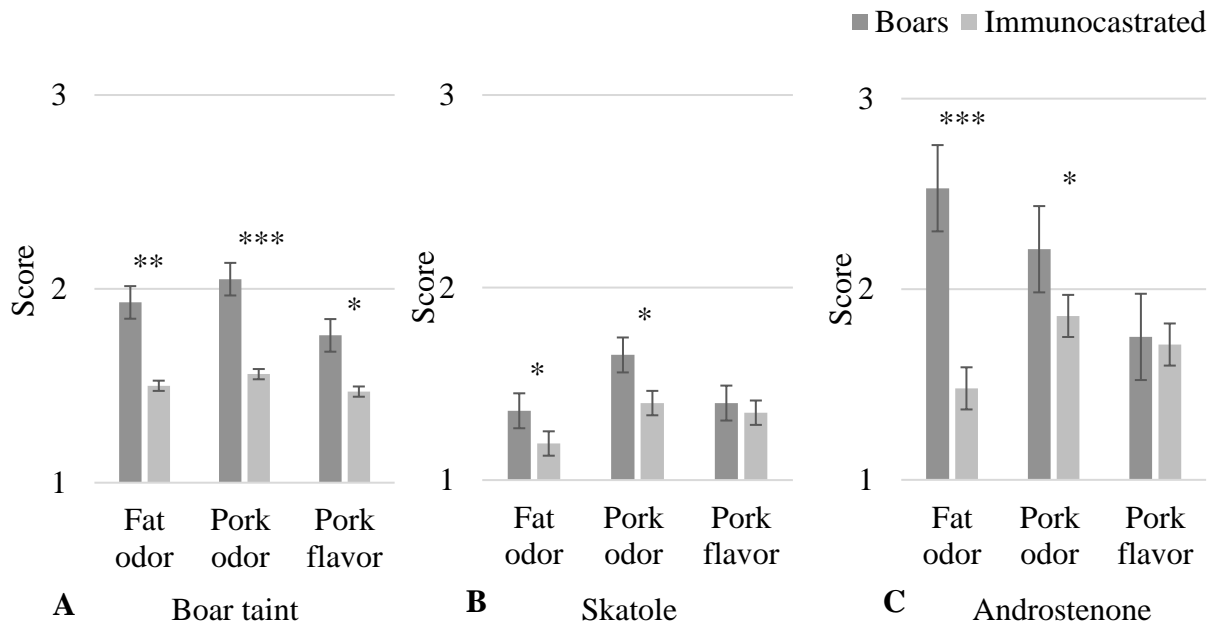


Figure 4. Boar taint (A), skatole (B) and androstenone (C) fat and pork odor and pork flavor in sensory evaluation of sensory panels. Average differences in each sensory parameter are indicated by *, ** and *** for $P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively. Score: (1) none, (2) extremely weak, (3) very weak, (4) weak, (5) strong, (6) very strong, and (7) extremely strong.

1 **7 ARTIGO B - Gender effects on pork quality and calpain-1 and calpastatin gene**
2 **expression in male pig muscle**

3

4 Artigo publicado na revista Meat Science (doi: 10.1016/j.meatsci.2020.108366)

5

6 **Abstract**

7 Studies that investigate the expression of genes related to the tenderness of meat from entire
8 and immunocastrated male pigs have not yet been performed. The objective of this study was
9 to investigate the association between gender (entire male and immunocastrated) and the meat
10 quality of pigs, as well as to quantify the expression of calpain-1 and the calpastatin gene.
11 Regarding carcass measurements and meat quality, boars presented lower values of muscle
12 depth ($P = 0.028$), subcutaneous fat thickness ($P = 0.046$), L* value ($P = 0.004$) and cook loss
13 ($P = 0.008$) than the immunocastrated pigs. The boars presented greater calpain-1 gene
14 expression ($P = 0.006$) and lower calpastatin gene expression ($P = 0.003$) than immunocastrated
15 pigs. This study shows that combined with other factors the gene expression can contribute to
16 a tender meat from boars due to their higher calpain-1 expression and lower calpastatin
17 expression than those of immunocastrated male pigs.

18

19 *Keywords:* boars, immunocastrated, meat quality, proteolysis, shear force, tenderness

20

21 **1. Introduction**

22 Surgical castration of male piglets without any pain relief is still common practice in
23 most countries of the world. However, due to concerns for animal welfare, it is increasingly
24 facing strong condemnation because of the pain during the surgical process and the following

25 days (Weiler & Bonneau, 2019). When invasive procedures are avoided, production and
26 welfare measures improve significantly (Morgan et al., 2019).

27 Although the meat of boars presents a sexual odor, the use of these animals provides
28 several advantages, such as better performance characteristics (lower feed consumption and
29 better feed conversion), lower slaughter age for the same weight as castrated pigs and higher
30 deposition of muscle tissue (Roest, Montanari, Fowler, & Baltussen, 2009). Other benefits are
31 lower production costs, reduced excretion of pollutants in manure and reduced animal suffering
32 (Bonneau & Squires, 2000).

33 Tenderness is one of the main factors that influences meat quality (Maltin, Balcerzak,
34 Tilley & Delday, 2003). The main mechanism related to proteolysis that leads to meat softening
35 is the enzymatic system of calpains (Boleman et al., 1997). This system in skeletal muscle is
36 formed by two calpains, calpain-1 and calpain-2, which are activated by free calcium and
37 inhibited by protein called calpastatin, thus a higher calpastatin activity leads to a higher shear
38 force measured in the meat and less tenderness (Koochmaraie, 1992). Meat quality may be
39 affected by many factors, including the gender of the animal, which is an important determinant
40 of muscle growth (Lawrie, 2005). Studies that investigate the expression of genes related to the
41 tenderness of meat from boars and immunocastrated male pigs have not yet been performed.

42 On that basis, the hypothesis of this study is that boars express less calpain-1 and have
43 a higher expression of calpastatin, resulting in a decrease in proteolysis and consequently less
44 meat tenderness than in immunocastrated male pigs. Therefore, this study was conducted to
45 investigate the association between gender and the meat quality of male pigs, aiming to identify
46 the expression of the calpain-1 and calpastatin genes.

47

48 **2. Material and methods**

49 *2.1 Animals*

50 The present study was submitted and approved by the Ethics Committee on the Use of
51 Animals of the State University of Londrina, under process n° 16367.2016.53.

52 A total of 40 male pigs from Agroceres PIC™ x DB-DanBred™ genetics were randomly
53 assigned to two treatment groups of 20 animals each as follows: entire male pigs (boars) and
54 immunocastrated male pigs. The pigs were housed in 20 pens (two pigs of the same treatment
55 per pen). Each brickwork pen had a 1.5 m width x 1.5 m height, totaling 2.25 m² of area per
56 pen (1.13 m²/pig), concrete and compact floors, one nipple-type drinker and one trough for feed
57 (semiautomatic feeder of one mouth, model CAP 1BT™, 250 mm deep x 360 mm width x 200
58 mm height, capacity 30 kg, Industrial Agricultural Suin, Joinville - Santa Catarina, Brazil,
59 2010).

60 The immunocastration of each animal was carried out using a commercial vaccine
61 (Vivax™), in two doses of 2 mL, administered subcutaneously in the neck region, near the base
62 of the ear, as recommended by the manufacturer. They received the first and second doses at
63 eight and four weeks prior to slaughter, i.e., at 104 days of age (59.10 ± 4.35 kg of live weight
64 (mean \pm SD)) and 132 days of age (88.2 ± 5.71 kg of live weight), respectively. The boars did
65 not undergo any type of intervention. Immunocastration was confirmed by weekly monitoring
66 of testicular regression, using a pachymeter in the mean portion of testes, until the slaughter
67 day when the immunocastrated pigs had a 10.96 ± 1.30 of testicular width and boars had a 13.42
68 ± 0.84 of testicular width.

69 The experiment was done during the growing II and finishing I and II phases. The pigs
70 began growing II at 96 days of age and 52.29 ± 3.80 kg of live weight, finishing I at 119 days
71 of age and 73.28 ± 5.27 kg of live weight and finishing II at 146 days of age and 103.33 ± 6.83
72 kg on average. The animals were slaughtered at the end of finishing II, with an average weight
73 of 126.62 ± 8.44 kg at 160 days of age.

74 The animals of the two experimental groups received isonutrient and isoenergetic
75 rations based on grain corn, soybean meal and soy oil, with calculated values of metabolizable
76 energy (3.23 kcal/kg) and crude protein (18% in growing II phase, 16.2% finishing I phase and
77 15.53% in finishing II phase), formulated to meet the minimum requirements recommended by
78 Rostagno et al. (2011), *ad libitum* with two daily replacements, at 08:00 and 17:00.

79 Preslaughter management consisted of a water diet until slaughter and 15 hours of total
80 solid fasting. The animals were shipped 12 hours after the feed withdrawal and transported to
81 the slaughterhouse (one hour) where they remained in the lairage pens (two hours) until the
82 time of slaughter. The slaughter was carried out in a commercial slaughterhouse under the State
83 Inspection Service (SIP) and according to Humanitarian Abate standards (Brazil, 2000).

84

85 2.2 Carcass

86 In the slaughterhouse, carcasses were split down the midline and were placed in a cooler
87 at 4°C for 24 hours. The hot carcass weight (HCW) and the chilled carcass weight (CCW) were
88 measured 45 minutes and 24 hours after the beginning of the slaughter, respectively. The
89 dressing percent (DP) was calculated from the live weight of the animal and the hot carcass
90 weight. The pH of the *Longissimus thoracis et lumborum* muscle was measured in the left
91 carcass between the penultimate and last rib, 45 minutes (initial pH) and 24 hours (ultimate pH)
92 after slaughter, using a digital potentiometer (Testo 205™, Testo AG, Lenzkirch, Germany)
93 with a temperature compensation sensor and a proper glass electrode. The digital potentiometer
94 was calibrated with pH 4.0 and 7.0 buffers at ambient temperature, and the electrode was rinsed
95 with distilled water between each measurement.

96 The left halves of the carcasses were sectioned between the penultimate and last rib,
97 where we evaluated the depth of the *Longissimus thoracis et lumborum* muscle (DM); the
98 subcutaneous fat thickness (SFT), measured at 6 cm from the midline of the cut with a digital

99 caliper (Western™) (Bridi & Silva, 2009); and the loin eye area (LEA), estimated by drawing
100 it on greaseproof paper, after which the obtained image was used to estimate the area in square
101 centimeters, using a standard point counting method (American Meat Science Association,
102 2001). The percentage of fat-free lean (FFL) was calculated from the pounds of muscle
103 containing five percent fat as follows: Pounds of muscle (PM) = $7.231 + (0.437 \times \text{HCW, lb}) +$
104 $(3.877 \times \text{LEA, in}^2) - (18.746 \times \text{SFT, in})$; FFL = $(\text{PM} / \text{HCW}) \times 100$ (South Dakota State
105 University, 2020).

106

107 2.3 Meat quality

108 An 10 cm sample of the *Longissimus thoracis et lumborum* muscle was taken from the
109 left half of the carcass beginning at the penultimate and last rib in the caudal-cranial direction
110 to analyze color, marbling, water retention capacity, thawing loss, cooking loss, shear force,
111 myofibrillar fragmentation index, and collagen. The color, marbling and water retention
112 capacity were performed 24 hours after slaughter in fresh meat and for shear force (3 cm thick
113 chop), myofibrillar fragmentation index (2 cm thick chop), and collagen (2 cm thick chop) the
114 samples were immediately packed in plastic bag and frozen at -18 °C until analysis. The shear
115 force sample was also used to perform the analysis of thawing loss and cooking loss.

116 The color was measured on the freshly cut surface after blooming in air for 20 min at
117 ambient temperature, using a portable colorimeter (Minolta CR-10™, Konica Minolta, INC.,
118 Osaka, Japan) with illuminant D65, 10° standard observer, and aperture size of 8.0 mm, by the
119 CIE L* (luminosity), a* (red-green component), b* (yellow-blue component) system (Minolta,
120 1998). Determination of color was carried out in triplicate and from the values a* and b*, the
121 chroma (c*) and the hue (h°) of the meat were calculated. Marbling was evaluated using
122 photographic patterns (American Meat Science Association, 2001), where scores of 1 (traces

123 of marbling) to 5 (abundant marbling) were assigned. Water retention capacity was determined
124 by the pressure water loss methodology (Hamm, 1960; Wilhelm, 2010).

125 Thawing loss was determined by a percentage weight difference between a frozen
126 sample weight and a thawed sample weight, frozen samples were thawed at 4 °C for 24 hours
127 before cooking. For cooking loss determination, each sample was weighed and cooked to an
128 internal temperature of 71 °C in a 180 °C electric oven (American Meat Science Association,
129 2015). Internal temperature was monitored during cooking with a hand-held temperature probe.
130 Cooked samples were cooled at 4 °C for 24 hours and weighed. The difference between before
131 cooking and after cooking weights was used to calculate the percentage loss during cooking.
132 From each sample, a cylindrical core borer was used to cut six replicate samples (1.27 cm
133 diameter x 3 cm length) parallel to the orientation of muscle fibers and the meat tenderness was
134 evaluated by shear force measurements according to Whipple et al. (1990), using a Warner-
135 Bratzler shear blade adapted to the Brookfield CT3™ Texture Analyzer.

136 The myofibrillar fragmentation index (MFI) was obtained according to the methodology
137 described by Culler, Parrish Jr, Smith and Cross (1978) and consisted of the homogenization
138 and centrifugation of the thawed (at 4 °C for 24 hours) minced meat sample with a buffered
139 solution, extraction process for the suspension of myofibrils, the protein test and finally the
140 determination of MFI. The protein concentration of final suspension was adjusted to 0.5 mg/mL
141 using the biuret method. The absorbance of the suspension was measured at 540 nm with a UV-
142 visible spectrophotometer (Evolution 60S™, Thermo Scientific, Massachusetts, USA). For
143 each sample, the mean value of duplicate absorbance readings was multiplied by 200 to give
144 the MFI value.

145 The determination of total collagen (Woessner, 1961) and soluble collagen (Oliveira,
146 Soares, & Antunes, 1998) was based on the determination of hydroxyproline, which consists of
147 hydrolyzing the thawed (at 4 °C for 24 hours) sample and oxidizing hydroxyproline with

148 chloramine T, and the excess is destroyed by adding perchloric acid. The formed complex reacts
149 with para-dimethylaminobenzaldehyde, and the intensity of the color formed is measured in a
150 UV-visible spectrophotometer (Evolution 60S™, Thermo Scientific, Massachusetts, USA) at
151 557 nm. The collagen concentration was calculated by multiplying the hydroxyproline
152 concentration by 8.0 according to the Kolar (1990) method. The solubility of collagen was
153 calculated as the ratio of soluble collagen to total collagen (Škrlep, Tomažin, Lukač, Poklukar,
154 & Čandek-Potokar, 2019a).

155

156 *2.4 Calpain-1 and calpastatin gene expression in the Longissimus thoracis et lumborum muscle*

157 Samples of the *Longissimus thoracis et lumborum* muscle were collected 15 min after
158 slaughter from the left half of the carcass from the height of the penultimate and last rib and
159 stored in RNAlater™ RNA Stabilization Solution (Invitrogen™) at -80° C, according to the
160 manufacturer, until RNA extraction was performed. Gene expression was performed by
161 quantitative real-time PCR in an Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System
162 (Thermo Fisher Scientific™) following the methodology described by Tang et al. (2010).

163 The total RNA of the muscle samples was extracted using a PureLink™ RNA extraction
164 kit (AMBION™), and the RNA extracted was submitted to an RT-PCR assay using Superscript
165 III™ qRT-PCR One-Step (Invitrogen™) with the primers and probes previously described
166 (Tang et al., 2010). A set of skeletal muscle DNA plasmids from boars and immunocastrated
167 pigs was used to create a standard curve for copy quantification, and the internal control gene
168 was β -actin (Tang et al., 2010).

169

170 *2.5 Statistical analysis*

171 The experimental design was a completely randomized block with two treatments and
172 20 replications per treatment. The animals were blocked according to their live weight at the
173 beginning of the experiment, and each animal was considered an experimental unit.

174 All statistical procedures were carried out using R software (R Core Team, 2015; version
175 3.1.3). The data were tested for normality, Shapiro-Wilk test, and showed a normal distribution.
176 The effect of treatments (boars and immunocastrated male pigs) on carcass traits, pork quality,
177 and calpain-1 and calpastatin gene expression were submitted to analysis of variance, and
178 differences between the means were assessed with an Independent Samples t-Test. All the
179 results are presented as means \pm SE, assuming a probability level of 5% ($P \leq 0.05$) as the limit
180 for statistical significance.

181

182 **3. Results**

183 *3.1 Carcass traits*

184 Boars presented lower values ($P \leq 0.05$) of muscle depth and subcutaneous fat thickness than
185 the immunocastrated pigs (Table 1). However, there was no difference ($P > 0.05$) in the live
186 weight, hot carcass weight, chilled carcass weight, dressing percent, loin eye area, or fat-free
187 lean between treatments.

188

189 *3.2 Meat quality*

190 The meat quality of boars and immunocastrated pigs is presented in Table 2. Boars
191 exhibited lower L* value and cook loss ($P < 0.01$) than immunocastrated pigs. The pH 45
192 minutes, pH 24 hours, a*, b*, chroma, hue, marbling, shear force, myofibrillar fragmentation
193 index, pressure water loss, thawing loss, collagen, and collagen solubility were not different (P
194 > 0.05).

195

196 3.3 *The mRNA levels of calpain-1 and calpastatin gene expression in the Longissimus thoracis*
197 *et lumborum muscle*

198 Boars presented greater calpain-1 gene expression ($P < 0.01$) and lower calpastatin gene
199 expression ($P < 0.01$) than the immunocastrated pigs (Table 3).

200

201 **4. Discussion**

202 Boars deposit less fat on carcasses than immunocastrated pigs due the anabolic effects
203 of androgenic steroids such as testosterone (Dubois, Laurent, Boonen, Vanderschueren, &
204 Claessens, 2012). This result is supported by the meta-analysis conducted by Pauly, Luginbühl,
205 Ampuero and Bee (2012), which reported gender effects on pork quality. Boars presented lower
206 muscle depth than immunocastrated pigs in this study, as evidenced by Gispert et al. (2010),
207 but this result was not mirrored in the loin eye area neither in the fat-free lean, which showed
208 no difference between treatments.

209 The collagen and collagen solubility measures were similar between boars and
210 immunocastrated pigs. However, there was a tendency ($P = 0.066$) for a greater collagen
211 solubility in boars, that is, collagen with less cross-linking, and this may be due to the direct
212 correlation between growth rate and muscle protein breakdown rate, which generates the high
213 protein turnover recorded in young boars (Claus, Weiler, & Herzog, 1994).

214 The immunocastrated pigs presented lighter meats than boars and the same result was
215 found by Gispert et al. (2010). However, in studies conducted by Stupka et al. (2017) and
216 Moore, Mullan and Dunshea (2017), the meat values of L^* , a^* and b^* from immunocastrated
217 and boars were similar. According to Edwards et al. (2010), the lighter meat color from
218 immunocastrated pigs could be attributed to the lower pH 24 hours than boars. However,
219 although there was a tendency ($P = 0.052$), in this study there was no difference in the pH 24
220 hours between treatments. In addition, assessing the lightness and pH, the meat from boars and

221 immunocastrated pigs was considered to be normal, with no evidence of PSE (pale, soft, and
222 exudative) or DFD (dark, firm, and dry) (Warner, Kauffman, & Russel, 1993; O'Neill, Lynch,
223 Troy, Buckley, & Kerry, 2003).

224 No difference was observed in thawing loss or shear force between boars and
225 immunocastrated pigs, corroborating the results found by Aluwé et al (2013), Moore, Mullan
226 and Dunshea (2017), Grela et al. (2019) and Škrlep, Poklucar, Lukac, Kress, and Candek-
227 Potokar (2019b). However, according to Moore, Dunshea, Mullan, Hennessy and D'Souza
228 (2009) boars presented a lower shear force than immunocastrated pigs. Additionally, in this
229 study boars showed a tendency ($P = 0.076$) to present a lower shear force than immunocastrated
230 pigs. This can be explained by the fact that protein synthesis ends after slaughter, but some
231 protein degradation processes continue. High preslaughter proteolytic activity will affect the
232 postmortem tenderness rate, so calpain-1 and calpastatin activities at slaughter are linked to the
233 tenderness process, which can be measured by the shear force of pork (Kristensen et al., 2002;
234 Zhang, Pan, & Wu, 2018).

235 Gender interfered with the expression of calpain-1 and calpastatin: boars presented
236 higher calpain-1 expression and lower calpastatin expression than immunocastrated pigs. Our
237 results corroborate with Coria, Carranza, and Palma (2018), who showed that the expression
238 and activities of calpain and calpastatin may be influenced by gender, age, feeding strategy,
239 muscle type and fiber type. This result can be explained by the anabolic effect of testosterone
240 (Snochowski, Lundstrom, Dahlberg, Petersson, & Edqvist, 1981; Sharpe, Buttery, & Haynes,
241 1986). Thus, meat from boars may potentially tenderize faster than from castrated males
242 because protein synthesis and protein degradation are faster in fast-growing animals that have
243 compensatory growth, so the proteolytic enzyme system present for tenderizing meat during
244 aging is more active (Aaslyng, Jensen, & Karlsson, 2018). Although immunocastrated pigs have

245 the benefits of testicular steroid effects on animal growth, from the application of the second
246 dose of the immunocastration vaccine, these effects are suppressed (Dunshea et al., 2001).

247 Steroid hormones regulate gene expression by means of a general mechanism in which
248 the hormones are transported to the target tissue by serum-containing proteins, diffuse through
249 the plasma membrane and bind to specific protein receptors in the nucleus (Nelson & Cox,
250 2014). However, the interactions of steroid hormone receptors with other cellular proteins may
251 act to regulate gene expression positively or negatively. Many physiological systems use
252 negative regulatory pathways that repress expression, establishing a close regulatory loop and
253 returning the systems to their starting points. This feedback mechanism is also exhibited by
254 steroid hormones (Cato, Ponta, & Herrlich, 1992). Nevertheless, the results obtained in this
255 study may suggest that steroid hormones have promote the gene expression of calpain-1.

256 Calpain is inhibited by calpastatin, preventing calpain proteolytic activation, membrane
257 binding and catalytic activity (Lonergan, Zhang, & Lonergan, 2010). This may be confirmed
258 from the predominant isoform of calpastatin, which contains four inhibitory domains, each of
259 which may inhibit calpain activity, with one molecule of calpastatin able to inhibit four calpain
260 molecules (Emori, Kawasaki, Imajoh, Minami, & Suzuki, 1988). Therefore, calpastatin
261 expression values may be reflected in the calpain expression values.

262 In muscle, the activity of the calpain system is dependent not only on inhibition by
263 calpastatin and the level of calcium ions but also on other factors, such as pH and temperature
264 (Biswas, Tandon, & Mandal, 2020). Meat quality is affected by postmortem tenderness, a
265 complex structural and functional process that depends on the species, genetics, the metabolic
266 state of the animal antemortem, its complement of muscle proteins and environmental factors.
267 The postmortem proteolysis rate of important structural muscle proteins is considered a
268 determining factor in meat tenderness (Taylor, Geesink, Thompson, Koohmaraie, & Goll,
269 1995). The use of boars or immunocastrated pigs as an alternative to surgical castration has

270 positive and negative points, and there is no best solution at the worldwide level. Depending on
271 the limitations and opportunities presented by the social context, the production process and the
272 target market, pig supply chains may choose different alternatives to best suit their systems
273 (Bonneau & Weiler, 2019).

274

275 **5. Conclusion**

276 The present study produced evidence that the gender of male pigs (boars vs.
277 immunocastrated pigs) affects the expression of the calpain-1 and calpastatin genes. Many
278 factors are related to the meat tenderness, thus combined with other factors such as the calpain-
279 1 activity and calpastatin level, the gene expression can contribute to a tender meat from boars
280 due to their higher calpain-1 expression and lower calpastatin expression than those of
281 immunocastrated male pigs.

282

283 **Acknowledgment**

284 To the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES),
285 Brazilian Federal Agency, for granting the scholarship, and to Fundação Araucária (BR) for
286 funding this research.

287

288 **References**

289 Aaslyng, M. D., Jensen, H., & Karlsson, A. H. (2018). The gender background of texture
290 attributes of pork loin. *Meat Science*, 136, 79–84.

291 Aluwé, M., Langendries, K. C. M., Bekaert, K. M., Tuyttens, F. A. M., De Brabander, D. L.,
292 De Smet, S., & Millet, S. Effect of surgical castration, immunocastration and chicory-
293 diet on the meat quality and palatability of boars. *Meat Science*, 94, 402-407.

- 294 American Meat Science Association. (2001). Handbook Meat Evaluation. (pp. 161).
- 295 American Meat Science Association. (2015). Research guidelines for cookery, sensory
296 evaluation, and instrumental tenderness measurements of meat. (2nd ed.). Champaign:
297 AMSA.
- 298 Biswas, A. K., Tandon, S. & Mandal, P. K. (2020). Meat Quality Analysis: Advanced
299 Evaluation Methods, Techniques, and Technologies. In Biswas, A. K., & Mandal, P. K.
300 (Eds.), *Calpain-assisted postmortem aging of meat and its detection methods* (pp. 101–
301 114). Chennai: MPS limited, (Chapter 7).
- 302 Boleman, S. J., Boleman, S. L., Miller, R. K., Taylor, J. F., Cross, H. R., Wheeler, T. L.,
303 Koohmaraie, M., Shackelford, S. D., Miller, M. F., West, R. L., Johnson, D. D., &
304 Savell, J. W. (1997). Consumer evaluation of beef of known categories of tenderness.
305 *Journal of Animal Science*, 75, 1521–1524.
- 306 Bonneau, M., Squires, E. (2000). Uso de machos inteiros na produção de suínos. *Proceeding*
307 *of the 1^a Conferência Virtual Internacional sobre Qualidade de Carne Suína* (pp. 173–
308 198). Concórdia, Brazil.
- 309 Bonneau, M., & Weiler, U. (2019). pros and cons of alternatives to piglet castration: welfare,
310 boar taint, and other meat quality traits. *Animals*, 9, 884.
- 311 Brazil. Instrução Normativa nº 3, de 17 de janeiro de 2000. Regulamento técnico de métodos
312 de insensibilização para o abate humanitário de animais de açougue. Ministério da
313 Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília.
- 314 Bridi, A. M., Silva, C. A. (2009). Avaliação da carcaça e da carne suína (pp. 120). Londrina:

- 315 Midiograf.
- 316 Cato, A. C. B., Ponta, H., & Herrlich, P. (1992). Progress in Nucleic Acid Research and
317 Molecular Biology. *Regulation of gene expression by steroid hormones* (pp. 3–31).
- 318 Claus, R., Weiler, U., & Herzog, A. (1994). Physiological aspects of androstenone and skatole
319 formation in the boar a review with experimental data. *Meat Science*, 38, 289–305.
- 320 Coria, M. S., Carranza, P. G., & Palma, G. A. (2018). Calpain System in meat tenderization:
321 A molecular approach. *Revista MVZ Córdoba*, 23, 6523–6536.
- 322 Culler, R.D., Parrish Jr, F. C., Smith, G. C., & Cross, H. R. (1978). Relationship of myofibril
323 fragmentation index to certain chemical, physical and sensory characteristics of bovine
324 longissimus muscle. *Journal of Food Science*, 43, 1177–1180.
- 325 Dubois, V., Laurent, M., Boonen, S., Vanderschueren, D., & Claessens, F. (2012). Androgens
326 and skeletal muscle: Cellular and molecular action mechanisms underlying the anabolic
327 actions. *Cellular and Molecular Life Science*, 69, 1651–1667.
- 328 Dunshea F. R., Colantoni, C., Howard, K., McCauley, I., Jackson, P., Long, K. A., Lopaticki,
329 S., Nugent, E. A., Simons, J. A., Walker, J., & Hennessy, D., P. (2001). Vaccination of
330 boars with a GnRH vaccine (Improvac) eliminates boar taint and increases growth
331 performance. *Journal of Animal Science*, 79, 2524–2535.
- 332 Edwards, L. N., Engle, T. E., Correa, J. A., Paradis, M. A., Grandin, T., & Anderson, D. B.
333 (2010). The relationship between exsanguination blood lactate concentration and carcass
334 quality in slaughter pigs. *Meat Science*, 85, 435-440.

- 335 Emori, Y., Kawasaki, H., Imajoh, S., Minami, Y., & Suzuki, K. (1988). All four repeating
336 domains of the endogenous inhibitor for calcium dependent protease independently
337 retain inhibitory activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 263, 2364–2370.
- 338 Gispert, M., Oliver, M. À., Velarde, A., Suarez, P., Pérez, J., & Font i Furnols, M. (2010).
339 Carcass and meat quality characteristics of immunocastrated male, surgically castrated
340 male, entire male and female pigs. *Meat Science*, 85, 664–670.
- 341 Grela, E. R., Świątkiewicz, M., Kowalczyk-Vasileva, E., Florek, M., Kosior-Korzecka,
342 U., & Skąlecki, P. (2020). An attempt of implementation of immunocastration in swine
343 production – impact on meat physicochemical quality and boar taint compound
344 concentration in the meat of two native pig breeds. *Livestock Science*, 232, 103905.
- 345 Hamm, I. R. (1960). Biochemistry of meat hydration. *Advances in food research*, 10, 355–
346 463.
- 347 Kolar, K. (1990). Colorimetric determination of hydroxyproline as measure of collagen content
348 in meat and meat products: NMK collaborative study. *Journal of the Association of*
349 *Official Analytical Chemists*, 73, 54–57.
- 350 Koohmaraie, M. (1992). Role of the neutral proteinases in postmortem muscle protein
351 degradation and meat tenderness. *Proceeding of the 45th Reciprocal Meat Conference*
352 (pp. 63–71), Knoxville.
- 353 Kristensen, L., Therkildsen, M., Riis, B., Sørensen, M. T., Oksbjerg, N., Purslow, P. P., &
354 Ertbjerg, P. (2002). Dietary-induced changes of muscle growth rate in pigs: Effects on in
355 vivo and postmortem muscle proteolysis and meat quality. *American Society of Animal*

- 356 *Science*, 80, 2862–2871.
- 357 Lawrie, R. A. (2005). *Ciência da Carne*. (6th ed.). (pp. 386). Porto Alegre: Artmed.
- 358 Maltin, C., Balcerzak, D., Tilley, R., & Delday, M. (2003). Determinants of meat quality:
359 tenderness. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62, 337-347.
- 360 Minolta. (1998) *Precise color communication - color control from perception to*
361 *instrumentation*. (pp. 59). Japan: Minolta Co.
- 362 Moore, K. L., Dunshea, F. R., Mullan, B. P., Hennessy, D. P., & D'Souza, D. N. (2009).
363 Ractopamine supplementation increases lean deposition in entire and immunocastrated
364 male pigs. *Animal Production Science*, 49, 1113-1119.
- 365 Moore, K. L., Mullan, B. P., & Dunshea, F. R. (2017). Boar taint, meat quality and fail rate in
366 entire male pigs and male pigs immunized against gonadotrophin releasing factor as
367 related to body weight and feeding regime. *Meat Science*, 125, 95–101.
- 368 Morgan, L., Itin-Shwartz, B., Koren, L., Meyer, J. S., Matas, D., Younis, A., Novak, S.,
369 Weizmann, N., Rapaic, O., Ahmad, W. A., Klement, E., & Raz, T. (2019). Physiological
370 and economic benefits of abandoning invasive surgical procedures and enhancing animal
371 welfare in swine production. *Scientific Reports*, 9, 16093.
- 372 Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2014). *Princípios de bioquímica de Lehninger*. (6th ed.). Porto
373 Alegre: Artmed.
- 374 Oliveira, L. B., Soares, G. J. D., & Antunes, P. L. (1998). Influência da maturação de carne
375 bovina na solubilidade do colágeno e perdas de peso por cozimento. *Revista Brasileira*

- 376 *de Agrociência*, 4, 166–171.
- 377 O'Neill, D. J., Lynch, P. B., Troy, D. J., Buckley, D. J., & Kerry, J. P. (2003). Influence of the
378 time of year on the incidence of PSE and DFD in Irish pigmeat. *Meat Science*, 64, 105-
379 111.
- 380 Pauly, C., Luginbühl, W., Ampuero, S., & Bee, G. (2012). Expected effects on carcass and
381 pork quality when surgical castration is omitted – results of a metaanalysis study. *Meat*
382 *Science*, 92, 858–862.
- 383 R Core Team. (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation
384 for Statistical Computing. Vienna, Austria. Available in <http://www.R-project.org/>
- 385 Roest K, Montanari, C., Fowler, T., & Baltussen, W. (2009). Resource efficiency and
386 economic implications of alternatives to surgical castration without anesthesia. *Animal*,
387 3, 1522–1531.
- 388 Rostagno, H. S., Albino, L. F. T., Donzele, J. L., Gomes, P. C., Oliveira, R. F., Lopes, D. C.,
389 Ferreira, A. S., Barreto, S. L. T., & Euclides, R. F. (2011). Tabelas brasileiras para aves e
390 suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. (3rd ed.). Viçosa:
391 Universidade Federal de Viçosa.
- 392 South Dakota State University. Swine grading. (2020). [https://www.sdstate.edu/agriculture-](https://www.sdstate.edu/agriculture-food-environmental-sciences/animal-science/swine-grading)
393 [food-environmental-sciences/animal-science/swine-grading](https://www.sdstate.edu/agriculture-food-environmental-sciences/animal-science/swine-grading) Accessed 25 September
394 2020.
- 395 Taylor, R. G., Geesink, G. H., Thompson, V. F., M. Koohmaraie, & Goll, D. E. (1995). Is Z-
396 disk degradation responsible for postmortem tenderization?. *Journal of Animal Science*,

397 73, 1351–1367.

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

400 Sharpe, P. M., Buttery, P. J., & Haynes, N. B. (1986). The effect of manipulating growth in
401 sheep by diet or anabolic agents on plasma cortisol and muscle glucocorticoid receptors.
402 *British Journal of Nutrition*, 56, 289–304.

403 Škrlep, M., Tomažin, U., Lukač, N. B., Poklucar, K., Candek-Potokar, M. (2019a)
404 Proteomic profiles of longissimus muscles of entire male and castrated pigs as related to
405 meat quality. *Animals*, 9, 74.

406 Škrlep, M., Poklucar, K., Lukac, N. B., Kress, K., & Candek-Potokar, M. (2019b).
407 Myofibrillar fragmentation in entire male, immunocastrated or surgically castrated pigs.
408 *Proceeding of the 60th International Meat Industry Conference MEATCON2019*, IOP
409 Conf. Series: Earth and Environmental Science.

410 Snochowski, M., Lundstrom, K., Dahlberg, E., Petersson, H., & Edqvist, L. (1981). Androgen
411 and glucocorticoid receptors in porcine skeletal muscle. *Journal of Animal Science*, 53.

412 Stupka, R., Čítek, J., Vehovský, K., Zadinová, K., Okrouhlá, M., Urbanová, D., & Stádník, L.
413 (2017). Effects of immunocastration on growth performance, body composition, meat
414 quality, and boar taint. *Czech Journal of Animal Science*, 62, 249–258.

415 Tang, R., Yu, B., Zhang, K., Guo, X., Tian, G., Huang, Z., Chen, X., & Che, D. (2010).
416 Effects of nutritional level on pork quality and gene expression of μ -calpain and
417 calpastatin in muscle of finishing pigs. *Meat Science*, 85, 768–771.

- 418 Warner, R. D., Kauffman, R. G., & Russel, R. L. (1993). Quality attributes of major porcine
419 muscles: A comparison with the Longissimus Lumborum. *Meat Science*, 33, 359–372.
- 420 Weiler, U.; Bonneau, M. (2019). Why it is so difficult to end surgical castration of boars in
421 Europe: Pros and cons of alternatives to piglet castration. Proceeding of the IOP
422 Conference Series: Earth and Environmental Science.
- 423 Whipple, G., Koohmaraie, M., Dike ma, M. E., Crouse, J. D., Hunt, M. C., & Klemm, R. D.
424 (1990). Evaluation of attributes that affect longissimus muscle tenderness in *Bos taurus*
425 and *Bos indicus* cattle. *Journal of Animal Science*, 68, 2716–2728.
- 426 Wilhelm, A. E., Maganhini, M. B., Hernández-Blazquez, F. J., Ida, E. I., & Shimokomaki, M.
427 (2010). Protease activity and the ultrastructure of broiler chicken PSE (pale, soft,
428 exudative) meat. *Food Chemistry*, 119, 1201–1204.
- 429 Woessner Jr., J. F. (1961). The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples
430 containing small proportions of this amino acid. *Archives of Biochemistry and*
431 *Biophysics*, 93, 440–447.
- 432 Zhang, H., Pan, J., & Wu. Z. (2018). Investigation of the effects of high pressure processing
433 on the process of rigor in pork. *Meat Science*, 145, 455–460.

Tables**Table 1.** Gender effects (boars vs. immunocastrated male pigs) on carcass traits.

Variable	Boars		Immunocastrated		<i>P</i> value ^a
	Mean	SE	Mean	SE	
Live weight (kg)	124.90	2.06	128.34	1.66	0.201
Hot carcass weight (kg)	91.43	1.53	94.88	1.30	0.094
Chilled carcass weight (kg)	89.54	1.51	92.80	1.26	0.105
Dressing percent (%)	73.20	0.23	73.93	0.45	0.153
Muscle depth (mm)	68.00	1.38	72.57	1.46	0.028
Subcutaneous fat thickness (mm)	10.37	0.86	12.53	0.59	0.046
Loin eye area (cm ²)	51.50	1.38	52.20	1.47	0.730
Fat-free lean (%)	58.31	0.59	57.12	0.51	0.137

^a Significance at 5% probability ($P \leq 0.05$).

Table 2. Gender effects (boars vs. immunocastrated male pigs) on pork quality.

Variable	Boars		Immunocastrated		<i>P</i> value ^a
	Mean	SE	Mean	SE	
pH 45 min	6.59	0.07	6.60	0.08	0.925
pH 24 h	5.60	0.04	5.50	0.19	0.052
L*	49.20	0.60	51.52	0.48	0.004
a*	3.09	0.25	3.29	0.37	0.670
b*	10.97	0.28	11.45	0.28	0.230
c*	11.43	0.32	11.99	0.34	0.238
h°	74.54	0.97	74.54	1.50	0.998
Marbling	1.55	0.15	1.65	0.15	0.643
Shear force (N)	48.99	3.24	57.06	3.01	0.076
Myofibrillar fragmentation index	77.13	1.81	79.28	1.91	0.420
Pressure water loss (%)	30.40	0.59	30.50	0.67	0.908
Thawing loss (%)	5.57	0.69	5.68	0.55	0.906
Cook loss (%)	23.73	1.33	28.25	0.93	0.008
Collagen (mg/g)	5.60	0.20	5.98	0.14	0.125
Collagen solubility (%)	20.21	1.28	17.31	0.85	0.066

^a Significance at 5% probability ($P \leq 0.05$).

Table 3. Gender effects (boars vs. immunocastrated male pigs) on calpain-1 and calpastatin gene expression in the *Longissimus thoracis et lumborum* muscle.

Variable	Boars		Immunocastrated		<i>P</i> value ^a
	Mean	SE	Mean	SE	
Calpain-1 ^b	13.48	0.13	12.92	0.15	0.006
Calpastatin ^b	3.15	0.10	3.64	0.12	0.003

^a Significance at 5% probability ($P \leq 0.05$).

^b Gene expression quantity = [(copies of target gene (calpain-1 or calpastatin)) / (copies of internal standard (β -actin))] x 10,000.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo promove evidências de que existem diferenças estabelecidas e diferenças a serem exploradas entre os gêneros de suínos machos. O uso de suínos não castrados mostrou efeitos positivos no desempenho, boas características de qualidade de carne e uma possível aceitação da carne pelos consumidores brasileiros. Entretanto, os níveis de compostos que causam o odor sexual podem prejudicar a aceitabilidade do consumidor. Além disso, devido ao maior número de lesões nas carcaças os comportamentos agressivos e sexuais podem comprometer a qualidade da carcaça.

A partir dos resultados do presente estudo, verificou-se a necessidade da realização de futuros estudos exploratórios. Estudos que alojem suínos em grupos maiores por baia, a fim de se aproximar a realidade industrial suinícola; que verifiquem a expressão gênica da μ -calpaína e da calpastatina combinada a atividade da μ -calpaína e o nível de calpastatina no músculo de suínos; que realizem análise sensorial diferenciando os níveis (baixo, médio e alto) dos compostos que causam odor sexual na carne; e que verifiquem a percepção sensorial de diferentes perfis de consumidores (faixa etária, gênero e região) a fim de garantir maior precisão na aceitabilidade do consumidor.