UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MIRELE DAIANA POLETI

**Variação nos genes dos receptores mineralocorticoide e
glicocorticoide e suas implicações proteômicas na
qualidade da carne de bovinos Nelore**

Pirassununga

2013

MIRELE DAIANA POLETI

**Variação nos genes dos receptores mineralocorticoide e
glicocorticoide e suas implicações proteômicas na
qualidade da carne de bovinos Nelore**

--- Versão corrigida ---

Tese apresentada à Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo, como
parte dos requisitos para a obtenção
do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Qualidade e
Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Júlio César de
Carvalho Balieiro

Pirassununga

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo

P765v	<p>Poleti, Mirele Daiana</p> <p>Variação nos genes dos receptores mineralocorticoide e glicocorticoide e suas implicações proteômicas na qualidade da carne de bovinos Nelore / Mirele Daiana Poleti. -- Pirassununga, 2013.</p> <p>116 f.</p> <p>Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo. Departamento de Ciências Básicas.</p> <p>Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Júlio César de Carvalho Balieiro.</p> <p>1. Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal 2. Eletroforese bidimensional 3. Estresse 4. Maciez da carne 5. Polimorfismos de nucleotídeo único. I. Título.</p>
-------	---

Dedico ...

Aos meus pais, Maria e Osvaldir, por serem o alicerce da minha caminhada sempre me ensinando e incentivando. Obrigada por todo carinho e amor!

Ao meu marido, Denis Maia dos Santos, que sempre foi meu amigo, companheiro e minha paixão. Pelo seu amor que me cativa a cada dia.

À toda a minha família! Por toda força e descontração. É muito bom ter vocês nessa jornada!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter pego em minhas mãos e conduzido-me durante toda essa trajetória. Pela fé que me ensinaste a ter e a nunca desistir.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Júlio César de Carvalho Balieiro, pela oportunidade, ensinamentos, paciência, mas principalmente pela amizade, e exemplo de bom profissional.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP), pelo acolhimento, conhecimento e oportunidades.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão inicial da bolsa de estudos.

Ao Programa Erasmus Mundus, pela oportunidade de intercâmbio.

À Universidade de Leiden, por ter me acolhido durante o intercâmbio.

Ao Prof. Dr. Roel De Rijk, que prontamente me recebeu na Universidade de Leiden e compartilhou comigo suas pesquisas. Pela atenção e ensinamentos dispensados que despertaram meu interesse pelo ESTRESSE.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de bolsa de estudos (Processo nº 2010/07057-0) e pelo financiamento do auxílio pesquisa (Processo nº 2010/07078-7).

À Dra. Alessandra Fernandes Rosa, por ser uma verdadeira líder lutando para que tudo desse certo. Pela amizade e companheirismo durante essa jornada.

Ao Prof. Dr. Saulo da Luz e Silva, pela grande parceira. Muito obrigada por ter fornecido os fenótipos dos animais e permitido que nossas amostras fossem coletadas. Sem dúvida, foi essencial!

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Trindade, por ter cedido parte do seu laboratório para a nossa equipe, permitindo que muitas pesquisas fossem desenvolvidas.

Ao Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho, pela disponibilização do seu laboratório para a realização das análises de genética e pelas dicas concedidas durante o período.

Ao Prof. Dr. João Alberto Negrão, por permitir a realização das análises de hormônios no seu laboratório e pela discussão dos resultados.

Ao Prof. Carlos Alberto Labate e sua equipe, por ajudar na parte de identificação das proteínas.

Aos funcionários do Matadouro, Maurício, Dori, Dito, Mário, Scharlack e Elso pelo carinho e apoio durante as coletas.

À funcionária, Sandra Oliveira, pelo auxílio nas análises hormonais.

Aos amigos que fiz no Laboratório de Biotecnologia Animal na ESALQ durante minha estadia, pela acolhida, convivência e ajuda: Minos, Nirlei, Gustavo, Andrezza e Aline.

À Cristina Tschorny Moncau, por estar sempre disposta a ajudar, pelas trocas de experiências, convivência diária, e, principalmente, pela grande amizade.

Ao pessoal do GMA pela convivência diária: Gerson, Isabela, Fernanda, Marina, Miguel, Adalfredo, Cucco, Vitor e, em especial a grandes amigas e companheiras: Priscila e Elisângela.

À Vanessa Mello, Bárbara Silva e Fábio Mateus, companheiros de grupo, por em algum momento me ajudarem a concluir essa caminhada.

À todas as pessoas que me acompanharam em algum momento dessa trajetória, principalmente a Sabrina, Vinicius, Gabi, André, Lais, Davi e Valéria.

Em especial, a minha “*pet*” July, pelos carinhos e pela alegria contagiante ao chegar em casa. Pelo apoio de estar sempre ao meu lado no computador enquanto escrevia.

*“Nem tudo que se enfrenta pode ser
modificado, mas nada pode ser
modificado até que seja enfrentado.”*

Albert Einstein

RESUMO

POLETI, M.D. **Variação nos genes dos receptores mineralocorticoide e glicocorticoide e suas implicações proteômicas na qualidade da carne de bovinos Nelore.** 2013. 116 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal é o principal sistema neuroendócrino envolvido na regulação e adaptação da resposta ao estresse e, o principal hormônio secretado é o cortisol. O cortisol exerce seus efeitos por meio dos receptores mineralocorticoide (MR) e glicocorticoide (GR). Variações nos genes desses receptores têm sido associadas à sensibilidade aos glicocorticoides e mudanças no perfil metabólico. O objetivo geral desse trabalho foi compreender a variabilidade existente em relação às respostas fisiológicas de bovinos por meio da identificação de polimorfismos genéticos em genes envolvidos na resposta ao estresse e, verificar as consequências dessa variação genética em características de qualidade da carne. Dessa forma, três abordagens foram propostas: (1) avaliar a incidência de carne DFD (*dark, firm and dry*) e seu impacto no perfil metabólico, endócrino e características de qualidade da carne bovina, uma vez que o estresse é um dos principais fatores que levam a essa condição desfavorável; (2) avaliar a contribuição de fatores genéticos, por meio da identificação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), no gene do MR e GR, e suas associações com as características mensuradas; (3) avaliar os efeitos desses polimorfismos sobre o perfil proteico do músculo bovino. Foram utilizados 241 bovinos da raça Nelore. Os resultados evidenciaram implicações direta do pH 24 horas *post-mortem* nos atributos de cor e perdas por cozimento da carne. A incidência de carnes DFD ($\text{pH} \geq 5,8$) foi de 18,7%. Os polimorfismos identificados mostraram influenciar em algumas características mensuradas. Os SNPs NR3C2_1 e NR3C2_2 no gene do MR foram associados ao conteúdo de glicogênio muscular e nível plasmático do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) *post-mortem*, e o SNP NR3C1_1 no gene do GR foi associado aos níveis plasmático de cortisol *post-mortem*. As análises proteômicas demonstraram que a maioria das proteínas reguladas por esses SNPs estão envolvidas na contração muscular, metabolismo e defesa celular. Portanto, é possível inferir que o pH tem impacto nas características de qualidade da carne e que polimorfismos em MR e o GR levam a mudanças na atividade do eixo HPA, no perfil metabólico do organismo e no perfil proteico do músculo, sugerindo que esses genes estão envolvidos em uma complexidade de funções e podendo ser alvos de estudos em sistemas de produção que visam melhorar a produtividade.

Palavras chave: eixo hipotálamo-pituitária-adrenal; eletroforese bi-dimensional; estresse; maciez da carne; polimorfismos de nucleotídeo único

ABSTRACT

POLETI, M.D. **Variation in the mineralocorticoid and glucocorticoid receptors genes and proteomics implications for meat quality in cattle of Nellore breed.** 2013. 116 f. PhD Thesis - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

The hypothalamic-pituitary-adrenal axis is the main neuroendocrine system involved in the regulation and adaptation in stress response and the primary hormone secreted is cortisol. Cortisol exerts its effects through the mineralocorticoid (MR) and glucocorticoid (GR) receptors. Variations in the genes of these receptors have been associated with sensitivity to glucocorticoids and changes in the metabolic profile. The general objective of this work was to understand the variability in relation to physiological responses of cattle through identification of genetic polymorphisms in genes involved in stress response and, checking the consequences of this genetic variation in meat quality traits. Thus, three approaches have been proposed: (1) evaluate the incidence of DFD meat (dark, firm and dry) and its impact on metabolics, endocrines profiles and meat quality traits, since stress is the major factor that lead to this unfavorable condition; (2) evaluate the contribution of genetic factors through identification single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the MR and GR gene and its association with the measured traits; (3) evaluate the effects of these polymorphisms on the protein profile of bovine muscle. A total of 241 Nellore cattle were used. The results evidenced direct implications of 24 hours pH *post-mortem* in color attributes and cooking losses. The incidence of DFD meat (pH $\geq$ 5.8) was 18.7%. The polymorphisms identified demonstrated to influence some on measured characteristics. The NR3C2_1 and NR3C2_2 SNPs in MR gene were associated with muscle glycogen content and *post-mortem* adrenocorticotrophic hormone (ACTH) plasma levels and, the NR3C1_1 SNP in GR was associated with *post-mortem* cortisol plasma levels. The proteomic analysis demonstrated that most proteins regulated by these SNPs are involved in muscle contraction, metabolism and cellular defense. Therefore, it is possible to infer that pH has impact on meat quality traits and MR and GR polymorphisms lead to changes in the HPA axis activity, metabolic profile and protein muscle profile, suggesting that these genes are involved in a complexity of functions and may be targets for studies on production systems to improve productivity.

Keywords: hypothalamic-pituitary-adrenal axis; single nucleotide polymorphisms; stress; tenderness; two-dimensional electrophoresis

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1.** Gel referência de eletroforese bi-dimensional (2-DE) de músculo *Longissimus dorsi* bovino. A 2-DE foi realizada usando faixa de pH 4-7 na primeira dimensão e SDS-PAGE (12,5%) na segunda. A quantidade de proteína aplicada foi 500 µg e o gel foi corado usando procedimento de Coomassie coloidal. A calibração de pI (ponto isoelétrico) e Mr (peso molecular) realizou-se por meio do software *Image Master 2D platinum*. As setas e os números referem-se aos *spots* significativos nas análises, sendo **em preto** os *spots* significativos para géis realizados com amostras coletadas 24 h *post-mortem* e **em vermelho** os *spots* significativos para géis realizados com amostras coletadas com 14 dias de maturação.83
- Figura 4.2.** Estimativas de médias da intensidade do volume de cada *spot* significativo na análise de variância entre os diferentes genótipos (CC, TC e TT) referente ao marcador NR3C2_1 g.115 T>C (ss528103346), presente no gene do receptor mineralocorticoide (MR). Análise realizada nas amostras de carne coletadas às **24 horas post-mortem**.84
- Figura 4.3.** Estimativas de médias da intensidade do volume de cada *spot* significativo na análise de variância entre os diferentes genótipos (CC, TC e TT) referente ao marcador NR3C2_1 g.115 T>C (ss528103346), presente no gene do receptor mineralocorticoide (MR). Análise realizada nas amostras de carne coletadas com **14 dias** de maturação.85
- Figura 4.4.** Estimativas de médias da intensidade do volume de cada *spot* significativo na análise de variância entre os diferentes genótipos (AA e GA) referente ao marcador NR3C1_1 g.3293A>G (ss528103353), presente no gene do receptor glicocorticoide (GR). Análise realizada nas amostras de carne coletadas com **24 horas post-mortem** (A) e amostras de carne coletadas com **14 dias** de maturação (B).....86

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1.	Número de observações (N), Média (MED), desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimo (MIN) e máximo (MAX) para as características avaliadas	38
Tabela 2.2.	Estimativas de médias de quadrados mínimos, erro padrão (EP) e nível de significância (valor P) para as características avaliadas nos grupos de carnes normais (pH<5,8) e carnes DFD - <i>dark, firm and dry</i> - (pH pH≥5,8)	41
Tabela 2.3.	Coeficientes de correlação entre as características endócrinas, metabólicas e qualidade da carne dentro de cada grupo de carne. Coeficientes para carnes classificadas como normais (pH <5,8) estão na diagonal acima e coeficientes para carnes classificadas como DFD – <i>dark, firm and dry</i> – (pH≥5,8) estão na diagonal abaixo (negrito)	42
Tabela 3.1.	Sequência dos primers utilizadas para sequenciamento do exon 2 do receptor glicocorticoide (<i>NR3C1</i>) e exon 1 do gene do receptor mineralocorticoide (<i>NR3C2</i>)	54
Tabela 3.2.	Nome e informações dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) identificados pelo sequenciamento nos genes do receptor glicocorticoide (GR) e receptor mineralocorticoide (MR).....	57
Tabela 3.3.	Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) identificados nos genes do receptor mineralocorticoide (MR) e receptor glicocorticoide (GR).....	58
Tabela 3.4.	Número de observações (N), Média (MED), desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimo (MIN) e máximo (MAX) para as características avaliadas	59
Tabela 3.5.	Estimativa dos efeitos aditivos (α), efeitos de dominância (δ), e efeitos de substituições gênicas (β_{1i}) e erro padrão (EP) para as características significativas segundo os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no gene do receptor glicocorticoide (GR).....	61

Tabela 3.6.	Estimativa dos efeitos aditivos (α), efeitos de dominância (δ), e efeitos de substituições gênicas (β_1) e erro padrão (EP) para as características significativas segundo os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) no gene do receptor mineralocorticoide (MR)	62
Tabela 4.1.	Número de indivíduos (N) distribuídos nas diferentes combinações de genótipos entre os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) nos genes dos receptores glicocorticoides (GR) e mineralocorticoide (MR)	74
Tabela 4.2.	Número de observações (N), Média (MED), desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimo (MIN) e máximo (MAX) para as características avaliadas.....	81
Tabela 4.3.	Estimativas de médias (MED) e respectivo erro-padrão (EP) das intensidades do volume dos <i>spots</i> significativos para efeito principal da interação entre os marcadores NR3C1_1 g.3293A>G (ss528103353) n o GR (receptor glicocorticoide) x NR3C2_1 g.115 T>C (ss528103346) no MR (receptor mineralocorticoide), para as amostras de carne bovina coletadas às 24 horas <i>post-mortem</i>	87
Tabela 4.4.	Estimativas de médias (MED) e respectivo erro-padrão (EP) das intensidades do volume dos <i>spots</i> significativos para efeito principal da interação entre os marcadores NR3C1_1 g.3293A>G (ss528103353) no GR (receptor glicocorticoide) x NR3C2_1 g.115 T>C (ss528103346) no MR (receptor mineralocorticoide), para as amostras de carne bovina coletadas com 14 dias de maturação	88
Tabela 4.5.	Proteínas diferencialmente expressas no músculo <i>Longissimus dorsi</i> bovino identificadas por espectrometria de massas	91
Tabela 4.6.	Estimativas da constante de regressão, erro padrão (EP), coeficientes de regressão, valores de estatística F e a respectiva probabilidade de cada coeficiente de regressão, obtidos para os <i>spots</i> significativos para os polimorfismos NR3C1_1 g.3.293A>G e NR3C2_1 g115 T>C em relação às características endócrinas, metabólicas e pH <i>post-mortem</i> para as amostras de músculo <i>Longissimus dorsi</i> bovino coletadas às 24 horas <i>post-mortem</i>	93

Tabela 4.7. Estimativas da constante de regressão, erro padrão (EP), coeficientes de regressão, valores de estatística F e a respectiva probabilidade de cada coeficiente de regressão, obtidos para os <i>spots</i> significativos para os polimorfismos NR3C1_1 g.3.293A>G e NR3C2_1 g115 T>C em relação às características endócrinas, metabólicas e pH <i>post-mortem</i> para as amostras de músculo <i>Longissimus dorsi</i> bovino coletadas com 14 dias de maturação.....	94
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
	Referências	25
2	A INCIDÊNCIA DE CARNE DFD (<i>DARK, FIRM AND DRY</i>) E ALTERAÇÕES NAS CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS, ENDÓCRINAS E DE QUALIDADE DA CARNE BOVINA.....	30
	Resumo	30
	Abstract	31
	2.1 Introdução	32
	2.2 Material e Métodos	33
	2.2.1 Animais e amostras	33
	2.2.2 Mensuração de pH.....	34
	2.2.3 Mensuração da cor	34
	2.2.4 Determinação de glicogênio e lactato no músculo.....	34
	2.2.5 Mensurações endócrinas.....	35
	2.2.6 Análises de maciez	35
	2.2.7 Análises estatísticas	36
	2.3 Resultados e Discussão	37
	2.4 Conclusão	44
	Referências	45
3	ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS EM GENES DO EIXO HIPOTÁLAMO-PITUITÁRIA-ADRENAL E CARACTERÍSTICAS ENDÓCRINAS, METABÓLICAS E QUALIDADE DA CARNE BOVINA	48
	Resumo	48
	Abstract	49
	3.1 Introdução	50
	3.2 Material e Métodos	51
	3.2.1 Animais	51
	3.2.2 Amostras <i>ante- e post-mortem</i>	52
	3.2.3 Força de cisalhamento <i>Warner-Bratzler</i>	53
	3.2.4 Mensurações endócrinas.....	53
	3.2.5 Determinação de glicogênio e lactato no tecido muscular	53
	3.2.6 Detecção de variações na sequência do DNA e genotipagem	54
	3.2.7 Análises estatísticas	55

3.3 Resultados	56
3.3.1 Identificação dos polimorfismos nos genes NR3C1 e NR3C2	56
3.3.2 Frequências genotípicas e alélicas	57
3.3.3 Características fenotípicas avaliadas	58
3.3.4 Análises de associação	60
3.4 Discussão	63
3.5 Conclusão	66
4 ANÁLISE PROTEÔMICA DO EFEITO DE POLIMORFISMOS EM GENES DO EIXO HIPOTÁLAMO-PITUITÁRIA-ADRENAL NA CARNE BOVINA	70
Resumo	70
Abstract	71
4.1 Introdução	72
4.2 Material e métodos	73
4.2.1 Amostras de músculo para proteômica	73
4.2.2 Determinações das características fenotípicas	74
4.2.3 Extração de proteínas do músculo	75
4.2.4 Eletroforese bi-dimensional (2-DE)	75
4.2.5 Visualização das proteínas	76
4.2.6 Análise das Imagens	77
4.2.7 Análises estatísticas	77
4.2.8 Digestão dos <i>spots</i> “ <i>in gel</i> ”	79
4.2.9 Identificação das proteínas por MALDI-TOF/TOF MS/MS	80
4.3 Resultados	81
4.3.1 Características fenotípicas	81
4.3.2 Análise proteômica	82
4.3.2.1 Avaliação dos spots em relação aos genótipos	82
4.3.2.2 Identificação dos spots significativos	89
4.3.2.3 Relação dos spots significativos com características fenotípicas ..	92
4.4 Discussão	95
4.5 Conclusão	101
Referências	102
APÊNDICES	108

1 INTRODUÇÃO

As características de um organismo vivo são resultantes da complexa organização do genoma, transcriptoma, proteoma e sua interação com o ambiente. Cada tecido do organismo é a expressão diferenciada do genoma e o músculo esquelético é o tecido mais abundante, constituindo cerca de 40% do corpo de mamíferos (YAN et al., 2001; XU et al., 2012).

Após a morte do animal, o músculo é convertido em carne por meio de um processo complexo, onde bioquímica, fisiologia, nutrição, saúde, tecnologia, bem como, outros fatores combinam-se para afetar a estrutura e a integridade do músculo (PAREDI et al., 2012).

O processo de conversão do músculo em carne inicia-se com o metabolismo anaeróbico, devido ao interrompimento de oxigênio, resultando em acúmulo de ácido láctico e, conseqüente, declínio do pH. A acidificação causa a perda da capacidade de retenção de água, liberação de cálcio e leva a formação das pontes entre os filamentos de miosina e actina, caracterizando uma contração do músculo rígida e inextensível, denominada *rigor mortis* (PICARD et al., 2010; PAREDI et al., 2012).

Subsequentemente, mudanças como a desnaturação de proteínas e degradação de enzimas começam a ocorrer, tornando a carne menos rígida. Sistemas de proteinases, como as calpaínas dependentes de cálcio, catepsinas lisossomais e o proteasoma, têm sido bem caracterizados nesse processo de proteólise *post-mortem* (MALTIN et al., 2003; HUFF LONERGAN; ZHANG; LONERGAN, 2010).

As características de qualidade da carne são complexas e influenciadas pela vida do animal (JIA et al., 2006). Fatores genéticos/raça, sexo, idade, castração, nutrição, peso no abate, sistema de criação, manejo, transporte, processo de abate e manejo *post-mortem* influenciam na qualidade da carne e estão por trás da grande variabilidade determinantes da maciez (LAMETSCH; BENDIXEN, 2001; PAREDI et al., 2012).

A influência da subespécie foi bem caracterizada em alguns trabalhos, demonstrando que animais com maior porcentagem de *Bos taurus indicus* tendem a ter carne com menos marmoreio e menos macia do que animais *Bos taurus taurus* (KOCH; CUNDIFF; GREGORY, 1982; CROUSE et al., 1989).

Atualmente, o Brasil detém o segundo maior rebanho bovino no mundo, com cerca de 185,8 milhões de cabeças e produzindo 7,9 mil toneladas de equivalente de carcaça. É o segundo maior exportador de carne do mundo, atrás da Austrália (ANUALPEC, 2012). Cerca de 80% do rebanho bovino brasileiro é composto por animais de raças zebuínas (*Bos indicus*), por serem animais de comprovada rusticidade e adaptação ao clima tropical predominante no Brasil, sendo que 90% desta parcela são animais da raça Nelore ou anelorados (ABIEC, 2012).

Os consumidores estão cada vez mais buscando por produtos de elevada qualidade e, portanto, entender os mecanismos que levam a uma carne de maior qualidade é um desafio para os pesquisadores e um assunto de grande interesse para indústria. Nesse contexto, os estudos na área de genômica, transcriptômica e proteômica animal estão sendo realizados visando entender esse mecanismo complexo.

Na genômica, o desenvolvimento de marcadores genéticos, identificação de genes responsáveis por diferenças individuais para uma característica em particular, na produção animal vêm sendo alvo de diversas pesquisas para melhorar a produção e a qualidade da carne (MULLEN et al., 2006). Para maciez de carne, uma média de 2,2 QTLs (*Quantitative traits locus*) foi detectada acometendo até 25% da variância fenotípica (BURROW et al., 2001). Nos genes das enzimas calpaína e calpastatina, proteases envolvidas na degradação das miofibrilas *post-mortem*, polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) foram identificados e mostraram ser bons preditores da maciez (PAGE et al., 2002, 2004; WHITE et al., 2005; CASAS et al., 2006; SCHENKEL et al., 2006).

Os estudos de transcriptoma têm possibilitado identificar as diferenças de expressão gênica entre tipos de fibras musculares (CAMPBELL et al., 2001) e também a associação de alguns genes com maciez da carne (BERNARD et al., 2007). Mudanças na expressão de 137 genes devido à variação da maciez da carne induzida pelo estresse agudo foi constatada no estudo de Zhao et al. (2012), sendo que esses genes estão envolvidos, principalmente, na resposta imune e processos metabólicos.

Na proteômica, Bouley, Chambon e Picard (2004) foram um dos primeiros a fazer o mapeamento de proteínas do músculo bovino, o que permitiu um progresso no entendimento dos mecanismos do metabolismo *post-mortem* e demonstraram que a maioria das proteínas presentes no músculo está relacionada com

metabolismo, seguida pelas proteínas de estrutura, defesa celular e aparatos contráteis.

Mudanças nas proteínas metabólicas no músculo *Longissimus thoracis* de bovinos do estado *ante* e *post-mortem* foram investigadas por Jia et al. (2006). As expressões de 24 proteínas mudaram após o abate, sendo classificadas dentro de dois grupos: proteínas metabólicas, envolvidas na via da glicólise e do ciclo do ácido tricarboxílico; e proteínas *heat shock*, as quais estão relacionadas à resposta celular ao estresse do ambiente. Em continuação a esse estudo, Jia et al. (2007) verificaram as mudanças no proteoma por mais tempo *post-mortem* (1, 2, 3, 6, 10 e 24 horas) e encontraram alterações em 47 *spots*, incluindo enzimas metabólicas associadas com a via de geração de ATP, proteínas de defesa e estresse, e enzimas proteolíticas.

Deste modo, é possível notar que entre os diversos processos metabólicos que ocorrem na transformação do músculo em carne e, aos inúmeros fatores que podem alterar a qualidade do produto comercial, o metabolismo de energia e, consequente diminuição do pH estão entre as alterações mais importantes (JIA et al., 2006; PAREDI et al., 2012).

O processo de glicólise anaeróbico *post-mortem* ocorre devido à metabolização do glicogênio presente no músculo para suportar a geração de ATP e continuar a atividade muscular. O metabolismo anaeróbico é acompanhado da produção e acúmulo do lactato no músculo e consequente queda do pH (HUFF LONERGAN; ZHANG; LONERGAN, 2010).

As reservas de glicogênio são, portanto, importantes para queda adequada do pH *post-mortem*. Altos valores de pH 24 horas resultam em carne de cor escura, firme e seca descrita como “*dark cutting*” ou DFD (*dark, firm and dry*) (MALTIN et al., 2003), a qual para maciez, suas qualidades são discutíveis na literatura. Segundo Dransfield (1981), a carne DFD tende a ser mais macia do que a carne normal, porém, outro estudo relata que a carne DFD tem maior valor de força de cisalhamento e menor palatabilidade do que carnes normais (WULF et al., 2002). Entretanto, devido a sua aparência de cor não agradável, os consumidores a rejeitam, ocasionando grandes perdas para indústria da carne. Segundo Smith et al. (1995), a indústria americana perde cerca de \$172 milhões anualmente pela presença de carne DFD.

O principal fator que afeta as reservas de glicogênio é o estresse pré-abate. O estresse pode ser uma exaustão física, psicológica ou ambos (IMMONEN et al, 2000), sob o qual o organismo reage com reações fisiológicas e mudanças comportamentais para restabelecer a homeostase (FERGUSON; WARNER, 2008).

Quando o sistema nervoso central reconhece uma situação de estresse dois eixos neuroendócrinos integrados são ativados: o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e o eixo simpático-adrenal (MCEWEN, 2000). A ativação do eixo HPA, estimula a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) da glândula pituitária anterior, o qual é liberado na corrente sanguínea, e desencadeia a secreção de glicocorticoides (cortisol) do córtex adrenal. A ativação do eixo simpático-adrenal induz a liberação de catecolaminas (epinefrina e norepinefrina) da medula adrenal (AXELROD; REISINE, 1984).

A secreção das catecolaminas resulta em alterações no metabolismo de energia, incluindo proteólise, lipólise, glicogenólise no músculo e gliconeogênese (FERGUSON; WARNER, 2008), enquanto que os glicocorticoides aumentam a gliconeogênese pelo fígado e inibem a captação de glicose por tecidos não essenciais durante a exposição ao estresse, como o músculo. Ademais, também atuam na proteólise e lipólise (GUPTA; BHATIA, 2008). Os glicocorticoides amplificam e estendem os efeitos metabólicos das catecolaminas (DANZTER; MORMEDE, 1983).

Os efeitos exercidos pelas catecolaminas são de curta duração e, portanto, não tem impacto significativo ao longo prazo sobre o bem-estar animal. Além disso, a mensuração da sua atividade é muito limitada devido à dificuldade de avaliar a resposta rápida do sistema em experimentos conduzidos fora do laboratório. Por outro lado, o cortisol é de fácil mensuração e seus efeitos são lentos, persistentes e de amplo efeito pelo corpo (MORBERG, 2000).

A ação do cortisol é dividida em dois modos de operação. O primeiro, modo *pro-ativo*, mantém a atividade basal do eixo HPA e controla a homeostase corpórea na coordenação do ritmo circadiano como ingestão de alimentos e o ciclo dormir/acordar. No segundo, modo *re-ativo*, o cortisol promove uma contrarresposta ao estresse e finaliza a ativação do eixo HPA, recuperando a homeostase (DE KLOET et al., 1998; DE RIJK; SCHAAF; DE KLOET, 2002).

Um estado de descontrole da resposta ao estresse pode levar a uma condição patológica. O cortisol exerce grande efeito no metabolismo, sistema imune,

processos inflamatórios e função cerebral. Nos sistemas de produção animal, o cortisol tem efeitos negativos na taxa de crescimento e eficiência alimentar (MORMÈDE et al., 2011). Portanto, a regulação do eixo HPA é de grande interesse nos sistemas de produção animal onde desempenho e bem-estar são fatores importantes (MANTEUFFEL, 2002).

O cortisol exerce seus efeitos por meio de dois receptores de padrões de afinidades distintas em: (i) alta afinidade, receptor mineralocorticoide (MR) e (ii) baixa afinidade, receptor glicocorticoide (GR). O cortisol se liga a esses receptores, os quais se deslocam para o núcleo da célula e se ligam ao DNA influenciando então, a transcrição de genes específicos (DE KLOET; OITZL; JOËLS, 1999).

Os receptores MR e GR são proteínas com três distintas regiões funcionais: domínio N-terminal de transativação, domínio central de ligação ao DNA, e o domínio C-terminal de ligação ao ligante hormonal (MORMÈDE et al., 2011).

A função clássica do MR é mediar os efeitos da aldosterona na balança eletrolítica e pressão arterial por meio da regulação do transporte de sódio. Entretanto, o MR possui afinidade pelo cortisol na mesma intensidade que para aldosterona (CAPRIO et al., 2007). Em particular, sua afinidade pelo cortisol é dez vezes maior que a do GR e por isso, está envolvido no processo inicial de avaliação e resposta ao estresse. O GR que só é ativado por grandes quantidades de cortisol, finaliza a resposta ao estresse e ainda, confere memória para eventos futuros (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005).

Os animais diferem no perfil fisiológico e comportamental sob uma situação de estresse (TERLOUW; RYBARCZYK, 2008; BOURGUET et al., 2010) e essa variabilidade na resposta ao estresse pode ser explicada por fatores genéticos e ambientais, como experiências anteriores (LIGHTMAN, 2008).

Estudos de variabilidade genética nos genes do MR e GR em humanos vêm sendo realizados e associados com diferenças na reatividade do eixo HPA e mudanças no perfil metabólico. No gene do GR, no exon 2, o polimorfismo ER22/23EK, que consiste de mutações em um único nucleotídeo nos códons 22 e 23, está associado com relativa resistência aos glicocorticoides e perfil metabólico de baixa insulina e baixos níveis de colesterol (VAN ROSSUM et al., 2002). Russcher et al. (2005a) demonstraram que o ER22/23EK aumenta em 15% a expressão da isoforma A do receptor glicocorticoide e diminui em 14% a atividade transcricional do receptor. Ainda no exon 2, códon 363 (N363S), outro polimorfismo

em GR está associado com alta sensibilidade aos glicocorticoides, aumento do índice de massa corporal, elevado colesterol e obesidade (VAN ROSSUM; LAMBERTS, 2004). Os polimorfismos ER22/23EK e N2363S afetam diretamente a expressão gênica regulada pelo glicocorticoide (RUSSCHER et al., 2005b). No íntron do GR, o polimorfismo *BclI*, localizado a 646 bp do exon 2, está associado com obesidade visceral (VAN ROSSUM; LAMBERTS, 2004).

Em suínos, Muráni et al. (2010) encontraram associação de um polimorfismo presente no gene do GR (NR3C1 c.*2122A>G) com concentração de cortisol plasmático e peso da adrenal, onde o alelo A exibiu os menores valores.

Em humanos, no gene do MR, no exon 2, portadores do polimorfismo MR I180V, localizado no códon 180 e promotor da troca de uma isoleucina para uma valina, foram testados para avaliar a resposta neuroendócrina a um estressor e observou-se que o polimorfismo induz a maior resposta de cortisol plasmático e salivar e aumento na taxa cardíaca. *In vitro*, o polimorfismo afeta o efeito de transcrição induzido pelo cortisol (DE RIJK et al., 2006). O MR I180V também parece associado com características metabólicas. Fernandes-Rosa et al. (2010) encontrou que indivíduos hipertensos portadores desse polimorfismo apresentaram maiores índices de massa corpórea e níveis de colesterol LDL.

Na posição -2 do MR, dois nucleotídeos antes do primeiro códon inicial ATG, um SNP G/C foi identificado e demonstrou-se também ter efeitos sobre a atividade transcricional em resposta ao cortisol ou a dexametasona (VAN LEEUWEN et al., 2010).

Os mecanismos de ação do MR e GR demonstram que esses receptores exercem efeitos altamente regulados de ativação e inibição durante uma situação estressora, de tal modo que, se há um desequilíbrio, os indivíduos perdem a habilidade de manter a homeostase desencadeando uma cascata de eventos potencialmente prejudiciais as funções do organismo. A heterogeneidade existente na resposta ao estresse devido a variabilidade genética é um ponto importante na regulação do eixo HPA podendo levar a alterações de comportamento e diferenças no perfil metabólico.

O presente trabalho visa compreender a variabilidade existente em relação às respostas fisiológicas de bovinos sob uma situação de estresse por meio de polimorfismos genéticos em genes envolvidos na resposta ao estresse e, verificar as consequências dessa variação genética nas características de qualidade da carne e

no perfil proteico da carne. O contexto será dividido em três partes: no primeiro capítulo será discutido a incidência de carne DFD no rebanho bovino e suas implicações nas características de qualidade da carne, uma vez que a presença da carne DFD é o indicativo do estresse animal. Subsequentemente, o segundo capítulo descreve a influência da genética sobre as características de qualidade da carne, especificamente avaliando a associação de polimorfismos em genes centrais do eixo do estresse, Hipotálamo-Pituitária-Adrenal, com características metabólicas, endócrinas e de qualidade da carne. Por fim, no terceiro capítulo, uma abordagem proteômica é discutida, caracterizando a influência dos polimorfismos genéticos sobre a tradução das proteínas e verificando quais proteínas influenciaram as características metabólicas, endócrinas e de qualidade da carne.

Referências

ABIEC. **Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne**. Rebanho Bovino Brasileiro. Disponível em: < http://www.abiec.com.br/3_rebanho.asp. Acesso em: 29 dez. 2012.

ANUALPEC. **Anuário da Pecuária Brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2012.

AXELROD, J.; REISINE, T.D. Stress Hormones: Their Interaction and Regulation. **Science**, v.224, p.452-459, 1984.

BERNARD, C. et al. New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v.55, p.5229-5237, 2007.

BOULEY, J.; CHAMBON, C.; PICARD, B. Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Proteomics**, v.4, p.1811-1824, 2004.

BOURGUET, C. et al. Characterizing the emotional reactivity of cows to understand and predict their stress reactions to the slaughter procedure. **Applied Animal Behaviour Science**, v.125, p.9-21, 2010.

BURROW, H.M. et al. Quantitative and molecular genetics influences on properties of beef: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.41, p.893-919, 2001.

CAMPBELL, W.G. et al. Differential global gene expression in red and white skeletal muscle. **American Journal of Physiology – Cell Physiology**, v.280, p.763-768, 2001.

CAPRIO, M. et al. Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis. **The FASEB Journal**, v.21, p.2185-2194, 2007.

CASAS, E. et al. Effects of calpastatin and μ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits. **Journal of Animal Science**, v.84, p.520-525, 2006.

CROUSE, J.D. et al. Comparisons of *Bos indicus* and *Bos taurus* inheritance for carcass beef characteristics and meat palatability. **Journal of Animal Science**, v.67, p.2661–2668, 1989.

DANTZER, R.; MORMEDE, P. Stress in farm animals: A need for reevaluation. **Journal of Animal Science**, v.57, p.6-18, 1983.

DE KLOET, E.R et al., Brain Corticosteroid Receptor Balance in Health and Disease. **Endocrine Reviews**, v.19, p.269-301, 1998.

DE KLOET, E.R.; JOËLS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nature**, v.6, p.463-472, 2005.

DE KLOET, E.R.; OITZL, M.S.; JOËLS, M. Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? **Trends in Neuroscience**, v.22, p.422-426, 1999.

DE RIJK, R.H.; SCHAAF, M.; DE KLOET, E.R. Glucocorticoids receptor variants: clinical implications. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v.81, p.103-122, 2002.

DE RIJK, R.H. et al. A Common Polymorphism in the Mineralocorticoid Receptor Modulates Stress Responsiveness. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.91, p.5083-5089, 2006.

DRANSFIELD, E. Eating quality of DFD beef. **Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science**, v.10, p.344–361, 1981.

FERGUSON, D.M.; WARNER, R.D. Have we underestimated the impact of pre-slaughter stress on meat quality in ruminants? **Meat Science**, v.80, p.12-19, 2008.

FERNANDES-ROSA, F.L. et al. Mineralocorticoid receptor p180V polymorphism: Association with body mass index and LDL-cholesterol levels. **Journal of Endocrinological Investigation**, v.33, p.472-477, 2010.

GUPTA, P.; BHATIA, V. Corticosteroid Physiology and Principles of Therapy. **Indian Journal of Pediatrics**, v.75, p.1039-1044, 2008.

HUFF LONERGAN, E.; ZHANG, W.; LONERGAN, S.M. Biochemistry of postmortem muscle – Lessons on mechanisms of meat tenderization. **Meat Science**, v.86, p.184-195, 2010.

IMMONEN, K. et al. Bovine muscle glycogen concentration in relation to finishing diet, slaughter and ultimate pH. **Meat Science**, v.55, p.25-31, 2000.

JIA, X. et al. Changes in Enzymes Associated with Energy Metabolism during the Early Post Mortem Period in *Longissimus Thoracis* Bovine Muscle Analyzed by Proteomics. **Journal of Proteome Research**, v.5, p.1763-1769, 2006.

JIA, X. et al. Proteome Changes in Bovine *Longissimus Thoracis* Muscle During the Early Postmortem Storage Period. **Journal of Proteome Research**, v.6, p.2720-2731, 2007.

KOCH, R.M.; CUNDIFF, L.V.; GREGORY, K.E. Heritabilities and genetic, environmental and phenotypic correlations of carcass traits in a population of diverse biological types and their implications in selection programs. **Journal of Animal Science**, v.55, p.1319-1329, 1982.

LAMETSCH, R.; BENDIXEN, E. Proteome Analysis Applied to Meat Science: Characterizing Post Mortem Changes in Porcine Muscle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.4531-4537, 2001.

LIGHTMAN, S.L. The Neuroendocrinology of Stress: A Never Ending Story. **Journal of Neuroendocrinology**, v.20, p.880-884, 2008.

MALTIN, C. et al. Determinants of meat quality: tenderness. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.62, p.337-347, 2003.

MANTEUFFEL, G. Central nervous regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and its impact of fertility, immunity, metabolism and animal welfare – a review. **Archiv Tierzucht Dummerstorf**, v.45, p.575-595, 2002.

MCEWEN, B.S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. **Brain Research**, v.886, p.172-189, 2000.

MORBERG, G.P. Biological Response to Stress: Implication for Animal Welfare. In: MORBERG, G.P.; MENCH, J.A. **The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for animal welfare**. New York: CABI Publishing, 2000. cap. 1, p.1-19.

MORMÈDE, P. et al. Molecular genetics of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and function. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1220, p.127-136, 2011.

MULLEN, A.M. et al. Understanding meat quality through the application of genomic and proteomics approaches. **Meat Science**, v.74, p.3-16, 2006.

MURÁNI, E. et al. Association of HPA axis-related genetic variation with stress reactivity and aggressive behavior in pigs. **BMC Genetics**, v.11, p.74-85, 2010.

PAGE, B.T. et al. Association of markers in the bovine CAPN1 gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. **Journal of Animal Science**, v.82, p.3474-3481, 2004.

PAGE, B.T. et al. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. **Journal of Animal Science**, v.80, p.3077–3085, 2002.

PAREDI, G. et al. “Muscle to meat” molecular events and technological transformations: The proteomics insight. **Journal of Proteomics**, v.75, p.4275-4289, 2012.

PICARD, B. et al. Skeletal muscle proteomics in livestock production. **Briefings in Functional Genomics**, v.9, p.259-278, 2010.

RUSSCHER, H. et al. Increased Expression of the Glucocorticoid Receptor-A Translation Isoform as a Result of the ER22/23EK polymorphism. **Molecular Endocrinology**, v.19, p.1687-1696, 2005a.

RUSSCHER, H. et al. Two Polymorphisms in the Glucocorticoid Receptor Gene Directly affect glucocorticoid-regulated Gene expression. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.90, p.5804-5810, 2005b.

SCHENKEL, F.S. et al. Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.84, p.291-299, 2006.

SMITH, G.C. et al. Improving the quality, consistency, competitiveness and market-share of beef—The final report of the second blueprint for total quality management in the fed-beef (slaughter steer/heifer) industry. The Final Report of the National Beef Quality Audit—1995. **National Cattlemen’s Beef Association**, 1995.

TERLOUW, E.M.C.; RYBARCZYK, P. Explaining and predicting differences in meat quality through stress reactions at slaughter: The case of Large White and Duroc pigs. **Meat Science**, v.79, p.795-805, 2008.

VAN LEEUWEN, N. et al. The Functional c.-2G>C Variant of the Mineralocorticoid Receptor Modulates Blood Pressure, Renin and Aldosterone Levels. **Journal of the American Heart Association**, v.56, p.995-1002, 2010.

VAN ROSSUM, E.F. et al. A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene, which decreases sensitivity to glucocorticoids in vivo, is associated with low insulin and cholesterol levels. **Diabetes**, v.51, p.3128–3134, 2002.

VAN ROSSUM, E.F.C.; LAMBERTS, S.W.J. Polymorphisms in the Glucocorticoid Receptor Gene and Their Associations with Metabolic Parameters and Body Composition. **Recent Progress in Hormone Research**, v.59, p.333-357, 2004.

WHITE, S.N. et al. A new single nucleotide polymorphism in CAPN1 extends the current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent. **Journal of Animal Science**, v.83, p.2001-2008, 2005.

WULF, D.M. et al. Relationships among glycolytic potential, dark cutting (dark, firm, and dry) beef, and cooked beef palatability. **Journal of Animal Science**, v.80, p.18595-1903, 2002.

XU, Y. et al. Differential proteome and transcriptome analysis of porcine skeletal muscle during development. **Journal of Proteomics**, v.75, p.2093-2108, 2012.

YAN, J.X. et al. Separation and identification of rat skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Proteomics**, v.1, p.424-434, 2001.

ZHAO, C. et al. Functional Genomic Analysis of Variation on Beef Tenderness Induced by Acute Stress in Angus Cattle. **Comparative and Functional Genomics**, doi:10.1155/2012/756284, 2012.

2 A INCIDÊNCIA DE CARNE DFD (*DARK, FIRM AND DRY*) E ALTERAÇÕES NAS CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS, ENDÓCRINAS E DE QUALIDADE DA CARNE BOVINA

Resumo

Carnes com alto pH 24 horas após o abate são consequência da diminuição das reservas de glicogênio antes do abate e, induzem ao aparecimento de carne do tipo DFD (*dark, firm and dry*), altamente desfavorável para qualidade. O objetivo desse trabalho foi avaliar a incidência de carne DFD em bovinos da raça Nelore e avaliar a relação entre pH da carne 24 horas com perfis metabólicos, endócrinos e características de qualidade da carne. Foram utilizados 241 bovinos da raça Nelore (± 24 meses de idade e ± 508 kg no momento do abate) e 23 características foram mensuradas. No músculo *Longissimus dorsi* na carcaça esquerda foram determinados valores de pH a 1 hora e 24 horas *post-mortem*. Para qualidade da carne mensurou-se valores de cor (L^* , a^* , b^*), perdas por cozimento e força de cisalhamento em três tempos de maturação (um, sete e 14 dias). Os hormônios avaliados foram ACTH e cortisol *ante-mortem* e *post-mortem*, e os metabólicos foram conteúdo de glicogênio e lactato muscular *post-mortem*. A incidência de carnes DFD ($\text{pH} \geq 5,8$) foi de 18,7%. Diferenças na cor e nas perdas por cozimento ($P < 0,05$) foram observadas entre carnes normais e DFD. O conteúdo de glicogênio muscular foi correlacionado com pH 24 horas em amostras DFD (-0,76). Nenhuma alteração na força de cisalhamento entre os dois grupos foi observada. Os hormônios não tiveram efeito nas características de qualidade da carne. Em conclusão, o pH 24 horas tem implicações direta nos atributos de cor e perdas por cozimento, ocasionando redução da qualidade da carne.

Palavras chave: cor da carne; estresse; glicogênio; maciez da carne; pH

Abstract

Meat with high pH 24 hours after slaughter are consequence of diminishing reserves of glycogen before slaughter and induce the appearance of a meat DFD type (dark, firm and dry), highly unfavorable for quality. The objective of this work was to evaluate the incidence of DFD meat in Nellore cattle and to evaluate the relationship between 24 hours pH meat with the metabolic, endocrine profiles and meat quality traits. A total of 241 Nellore cattles (± 24 months of age and ± 508 kg at slaughter) were used and 23 characteristics were measured. At the *Longissimus dorsi* muscle in left carcasses, pH values were determined at 1 hour and 24 hours *post-mortem*. For meat quality were measured color values (L^* , a^* , b^*), cooking losses and shear force in three times of ageing (one, seven and 14 days). The hormones evaluated were ACTH and cortisol *ante-mortem* and *post-mortem*, and metabolites were glycogen and lactate muscle *post-mortem*. The incidence of DFD meat ($\text{pH} \geq 5.8$) was 18.7%. Differences in color and cooking losses ($P < 0.05$) were observed between normal and DFD meat. The glycogen content was correlated with 24 hours pH in DFD samples (-0.76). No change in shear force between the two groups was observed. Hormones had no effect on meat quality traits. In conclusion, the 24 hours pH has direct implications on the color and cooking losses attributes, resulting in reduced quality of meat.

Keywords: glycogen; meat color; pH; stress; tenderness meat

2.1 Introdução

A queda do pH no músculo durante a conversão do músculo em carne é um fator extremamente importante que pode levar a alterações significativas na qualidade da carne. Particularmente, na carne bovina, uma das principais alterações caracterizada pelo alto pH 24 horas *post-mortem* é conhecida como carne DFD (*dark, firm and dry*). Carnes com essa característica são diferenciadas por exibirem alta capacidade de retenção de água, superfície seca, firme e com cor vermelha escura quando comparada a carnes normais (APPLE et al., 1995; VILJOEN; DE KOCH; WEBB, 2002; WULF et al., 2002). Além disso, carnes DFD apresentam maior variação de maciez (WULF et al., 2002).

A condição de carne DFD implica em grandes perdas econômicas para a indústria devido à redução da vida de prateleira, fraco sabor de carne (SILVA; PATARATA; MARTINS, 1999; IMMONEN et al., 2000) além do aspecto de cor escura, geralmente indesejável ao consumidor (VILJOEN; DE KOCH; WEBB, 2002). A indústria espanhola, por exemplo, penaliza a carcaça com alto pH com descontos entre 30% e 60% (MACH et al., 2008).

O alto pH *post-mortem* está associado ao conteúdo de glicogênio presente no músculo no momento do abate do animal (APPLE et al., 1995; LAHUCKY et al., 1998; IMMONEN et al., 2000). A diminuição do pH, imediatamente após a morte, é resultado de esforços do músculo para manter a homeostase e, portanto, o nível de ATP constante. Assim, o glicogênio é metabolizado via glicólise anaeróbica gerando lactato, o qual se acumula no músculo e favorece o declínio do pH intracelular. O pH 24 horas *post-mortem* deve cair para valores entre 5,4 e 5,7 (TORNBERG, 1996; MALTIN et al., 2003; YOUNG et al., 2004; YLÄ-AJOS; RUUSUNEN; PUOLANNE, 2006).

Vários fatores *ante-mortem* podem levar a redução das reservas de glicogênio no músculo. Dentre eles, destacam-se a alimentação inadequada, longo período de jejum, exaustão física e o estresse pré-abate (IMMONEN, et al. 2000; LAWRIE, 2005; MACH et al., 2008). Segundo Immonen et al. (2000), o estresse pré-abate, seja físico, psicológico ou ambos, é o pior inimigo do glicogênio, uma vez que a liberação de catecolaminas, sob uma situação de estresse, aumenta a glicogenólise no músculo.

O presente trabalho foi conduzido para avaliar a incidência de carne DFD em bovinos da raça Nelore, bem como, avaliar as alterações ocorridas em características metabólicas, endócrinas e de qualidade da carne.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Animais e amostras

Esse trabalho foi desenvolvido de acordo com as normas estabelecidas no Regimento Geral do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo. Foram utilizados no experimento 241 bovinos machos da raça Nelore (119 não castrados e 122 castrados) recriados a pasto e terminados em confinamento. O experimento foi implantado em três anos consecutivos, sendo 76 animais do ano de 2009, 79 no ano de 2010 e 86 no ano de 2011. Em todos os anos, os animais foram alimentados com dietas de alto concentrado (85%), composto por milho, farelo de soja, casca de soja, glúten de milho, sal mineral e ureia, contendo 14,6% de proteína bruta e 74,5% de NDT. A fonte de volumoso utilizada foi o bagaço de cana de açúcar (15%).

No final do experimento, os animais foram transportados por 200 metros até o abatedouro em caminhão boiadeiro, atordoados e abatidos seguindo a regulamentação técnica dos métodos de atordoamento para abate humanitário (BRASIL, 2000). O abate foi realizado em animais com idade média de $24 \pm 1,2$ meses e peso médio de 508 ± 39 kg.

Amostras de sangue para obtenção de plasma foram coletadas, sendo divididas em dois períodos, uma no início do confinamento (*ante-mortem*) e outra na exsanguinação no abate (*post-mortem*). Essas amostras foram utilizadas para determinação dos níveis de cortisol e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) plasmático.

Aproximadamente 30 min após a morte do animal uma amostra de músculo *Longissimus dorsi* (LD) foi retirada da carcaça na região da 12ª costela e congelada em nitrogênio líquido para as determinações de glicogênio e lactato. Três bifes de 2,5 cm de altura do músculo LD (entre a 11ª e 13ª costelas) foram removidos às 24 horas *post-mortem* do lado esquerdo da carcaça para maturação e análises de

maciez. Os bifes foram embalados individualmente a vácuo em filme plástico de alta barreira (BB3; Cryovac) e mantidos em câmara fria a 2-4°C para maturação.

2.2.2 Mensuração de pH

O pH foi mensurado individualmente nas carcaças esquerdas usando um medidor digital portátil de pH (*pH 11 Economy Meter, Oakton instruments*) composto por uma sonda de perfuração de vidro (pH) e sonda metálica (temperatura). O pHmetro foi calibrado com tampões de pH 4,0 e 7,0 e o pH foi mensurado com uma hora e 24 horas após a morte do animal na altura da 12^a costela. Leituras de pH 24 horas mensuradas na carcaça superiores ou iguais a 5,8 foram consideradas como carne DFD (*dark, firm and dry*) e leituras de pH menores que 5,8 foram consideradas como carne normal de acordo com os trabalhos de Vijoen, De Koch e Webb (2002), Mach et al. (2008), Chmiel et al. (2012).

2.2.3 Mensuração da cor

A embalagem a vácuo com os bifes foram abertas em cada tempo de maturação (um, sete e 14 dias) e a superfície do bife foi exposta ao ar por 20 minutos para permitir a oxigenação. Os valores associados à cor (L^* , a^* , b^*) de cada bife foi mensurada usando um colorímetro portátil (*CM-2500d, Konica Minolta*) operando no sistema CIE (L^* , a^* , b^* , 1976), com fonte de luz de D65, ângulo de observação de 10° e abertura da célula de medida de 30 mm. L^* representa a luminosidade, a^* indica a variação do verde para vermelho e b^* do azul para amarelo. Foram realizadas três medidas em pontos diferentes do bife, tomando-se a média como valor de L^* , a^* , b^* da amostra. O colorímetro foi calibrado usando padrões específicos branco e preto.

2.2.4 Determinação de glicogênio e lactato no músculo

As determinações do conteúdo de lactato e glicogênio muscular foram feitas simultaneamente. Amostras de tecido muscular foram preparadas usando o método descrito por Ramos e Gomide (2007). Tecidos de LD congelados (0,5g), retirados 30 minutos *post-mortem* de cada animal, foram homogeneizados em ácido perclórico

0,6 M gelado com o homogeneizador Turratrec (*TE-102, Tecna*) para desproteinizar o tecido. Amostras foram centrifugadas a 3.000 x g por 10 min a 4°C e o sobrenadante filtrado em papel de filtro nº 54 (*Whatman*). O filtrado foi neutralizado com uma solução de hidróxido de potássio (2 M KOH, 0,4 M Imidazol e 0,4 M KCl) até atingir pH 7,0. O lactato e o glicogênio foram determinados espectrofotometricamente com o Kit de Análise de Lactato EnzyChrom™ (*BioAssay Systems, Hayward, USA*) e Análise de Glicogênio EnzyChrom™ (*BioAssay Systems, Hayward, USA*) de acordo com as instruções do fabricante. A intensidade colorimétrica de cada poço foi determinada usando um leitor de microplaca a 570 nm.

2.2.5 Mensurações endócrinas

As amostras de plasma coletadas no início do confinamento dos animais e durante a exsanguinação no abate foram armazenadas a -20°C e utilizadas para determinação da concentração de cortisol e ACTH. Os níveis de cortisol e ACTH foram mensurados com o uso de kits imunoenzimáticos viáveis comercialmente (*Cortisol Accu Bind, Monobind Inc., Lake Forest, CA, USA* e *ACTH ELISA, Bioamerica Inc., Irvine, CA, USA*) e utilizados de acordo com as instruções do fabricante. Amostras foram analisadas em duplicata e em cada placa foram utilizados padrões inter e intra ensaio para validação. Os ensaios foram validados para uso em bovinos pelo estudo de uma curva de diluição de duas amostras com valores extremos para as dosagens.

2.2.6 Análises de maciez

Os bifes foram escolhidos aleatoriamente em cada período pré-determinado de maturação (um, sete ou 14 dias *post-mortem*), retirados da câmara fria e imediatamente utilizados. A determinação da maciez foi realizada conforme preconizado pela *American Meat Science Association* (AMSA, 1995) com algumas modificações. As embalagens a vácuo foram abertas, os bifes pesados (P_i) e em seguida, assados em forno elétrico pré-aquecido com um termostato ajustado para 170°C. A temperatura interna de cada bife foi monitorada com termopares (*Data Logger digital 700-10s, Gulterm*) inseridos no centro geométrico do bife e,

registradas usando um registrador de temperatura digital. Ao atingir a temperatura interna de 42°C os bifes foram virados e cozidos até a temperatura interna final de 71°C. Após o cozimento, os bifes de LD foram mantidos a temperatura ambiente até atingir a temperatura interna de 28°C para serem pesados (P_i), embalados em filme plástico e armazenados em geladeira por 24 horas.

No dia seguinte, seis cilindros de 1,27 cm de diâmetro foram removidos paralelamente a orientação longitudinal das fibras musculares. No mínimo seis e máximo de oito cilindros foram obtidos de cada bife. Cada cilindro foi cisalhado uma vez no centro usando o aparelho *Warner-Bratzler Shear Force* (WBSF), com sonda *Warner Bratzler* deslocando-se em velocidade de 500 mm/min. A força de cisalhamento de cada amostra foi determinada pela média dos valores dos cilindros.

Os pesos da amostra antes e depois do cozimento foram utilizados para determinar as perdas por cozimento (PC), ou seja, $[PC=(P_i-P_f)/P_i]$, expressa em %.

2.2.7 Análises estatísticas

As análises das características endócrinas, metabólicas e indicadoras da qualidade da carne, em relação aos tipos de carnes identificadas (normais *versus* DFD), foram realizadas com auxílio do procedimento PROC MIXED do programa *Statistical Analysis System*, versão 9.1.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), de acordo com o seguinte modelo misto:

$$Y_{ijklm} = \mu + R_i + AP_j + C_k + T_l + e_{ijklm}$$

Em que, Y_{ijklm} = é o valor para determinada variável endócrina ou variável metabólica ou variável indicadora da qualidade da carne observada no tipo de carne l, do animal de condição sexual k, no ano e ordem de abate j e filho do reprodutor i; μ = constante comum para todas as observações (média); R_i = efeito aleatório do reprodutor i, com média 0 e variância σ^2_R , sendo $i=1, 2, \dots, 30$; AP_j = efeito fixo do ano e período de abate j, sendo $j = 1$ (2009-1), 2(2009-2), 3(2009-3), 4(2009-4), 5(2010-1), ..., 12(2011-4); C_k = efeito fixo da condição sexual k do animal, sendo $k=1$ (não castrado) ou 2 (castrado); T_l = efeito fixo do tipo de carne, sendo $l = 1$ (normal, com pH <5,8) ou 2 (DFD, com pH $\geq 5,8$); e_{ijklm} = é o erro aleatório associado à variável endócrina ou variável metabólica ou variável indicadora da qualidade da carne observada no tipo de carne l, do animal de condição sexual k, no ano e ordem de

abate j e filho do reprodutor i , suposto normal e independentemente distribuído, com média 0 e variância σ_e^2 .

Para o modelo acima descrito, quando observado efeito significativo para a fonte de variação tipo de carne, o Teste F da ANOVA foi considerado discriminatório.

Para avaliar as possíveis relações existentes entre as variáveis endócrinas, metabólicas e indicadoras da qualidade da carne, foram realizadas análises de correlação Momento-Produto de *Pearson*, dentro de cada tipo de carne avaliada. Estas análises foram realizadas por meio do procedimento PROC CORR do programa anteriormente citado.

2.3 Resultados e Discussão

A incidência de carcaças com potencial de DFD, por apresentarem pH 24 horas maiores ou iguais a 5,8, foi de 18,7%. Essa taxa de ocorrência é próxima aos relatos observados na literatura. Na Suécia, Fabiansson, Erichsen e Reuterswärd (1984) utilizando $\text{pH}_{24\text{h}} \geq 6,2$ para identificar carcaças DFD encontraram, respectivamente, 3,4 e 13,2% de carnes DFD para carcaças estimuladas e não-estimuladas eletricamente. No Reino Unido, uma baixa incidência de carcaças DFD ($\text{pH}_{24\text{h}} \geq 6,0$) foi relatada, em torno de 4,1% (BROWN; BEVIS; WARRIS, 1990). Mach et al. (2008) em um estudo na Espanha relataram a incidência de 13,89% de carcaças com pH 24 horas maior que 5,8.

As estatísticas descritivas das mensurações realizadas na carcaça, na carne maturada, bem como, para as variáveis metabólicas e endócrinas estão apresentadas na Tabela 2.1. As médias para cor e perdas por cozimento apresentaram-se dentro do relatado na literatura para carnes normais (WHIPPLE et al., 1990; WULF; WISE, 1999; PFLANZER; FELÍCIO, 2009; CHMIEL et al., 2012).

A maturação da carne por 14 dias resultou em diminuição dos valores de força de cisalhamento. Evidências demonstram que no processo de maturação a proteólise de proteínas miofibrilares é a razão da maciez da carne (KOOHMARIE, 1996). A degradação dessas proteínas promove o enfraquecimento das miofibrilas e, portanto, a maciez. Os valores de força de cisalhamento (FC) para carne de bovinos Nelore determinados aos 14 dias de maturação nesse estudo são similares aos descritos por Pflanze e Felício (2009), os quais relataram valores em torno de 6,5

kg. Oliveira et al. (2012) avaliaram amostras de carne sem maturação para animais da mesma raça e relataram valores de FC de 5,97 kg. De acordo com Maltin et al. (2003) inúmeros fatores podem afetar a maciez da carne no período *post-mortem* como temperatura, comprimento de sarcômero, proteólise, tipo de fibra que compõe o músculo e sua capacidade tamponante, bem como, raça e o estado nutricional do animal.

Tabela 2.1. Número de observações (N), Média (MED), desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimo (MIN) e máximo (MAX) para as características avaliadas

Variável ¹	N	MED	DP	CV	MIN	MAX
pH 1 hora	240	6,62	0,23	3,50	5,50	7,41
pH 24 horas	241	5,61	0,26	4,72	5,01	6,70
L* 1 dia	240	31,84	7,31	22,96	12,36	44,52
L* 7 dias	241	34,89	5,21	14,94	11,80	46,20
L* 14 dias	223	34,06	6,66	19,55	19,25	46,01
a* 1 dia	240	18,62	4,14	22,23	10,37	29,10
a* 7 dias	241	16,33	3,27	20,01	9,33	26,99
a* 14 dias	223	17,91	4,07	22,71	9,17	28,38
b* 1 dia	240	15,30	4,17	27,25	5,95	23,37
b* 7 dias	241	15,21	3,39	22,26	7,07	24,46
b* 14 dias	223	15,55	3,39	21,81	6,71	27,37
PC (%) 1 dia	235	23,52	4,93	20,95	1,22	42,34
PC (%) 7 dias	233	24,81	4,77	19,24	12,51	43,84
PC (%) 14 dias	240	24,31	4,15	17,06	12,27	41,44
FC (kg) 1 dia	241	9,18	2,12	23,10	2,97	15,65
FC (kg) 7 dias	241	7,86	1,78	22,71	3,60	13,88
FC (kg) 14 dias	241	6,47	1,63	25,24	3,50	13,23
Glicogênio (µmol/g)	240	15,94	6,71	42,09	1,71	72,51
Lactato (µmol/g)	240	15,47	7,95	51,40	1,54	49,53
ACTH AM (pg/mL)	237	16,09	14,73	91,53	0,58	79,99
ACTH PM (pg/mL)	238	10,17	10,71	105,31	0,58	87,19
Cortisol AM (µg/dL)	240	4,34	2,33	53,61	1,00	18,57
Cortisol PM (µg/dL)	240	6,35	2,57	40,49	1,32	13,91

¹ pH 1 hora e 24 horas = pH intramuscular mensurado a 1 hora e 24 horas *post-mortem*; L* a* b* mensurações de cor realizadas nos bifes no 1º, 7º e 14º dia de maturação; PC = perdas por cozimento mensurada nos bifes no 1º, 7º e 14º dia de maturação; FC = força de cisalhamento no 1º, 7º e 14º dia de maturação; ACTH AM e Cortisol AM = concentração desses hormônios determinadas em amostras de sangue coletadas dos animais no confinamento (*ante-mortem*); ACTH PM e Cortisol PM = concentração desses hormônios determinadas em amostras de sangue coletadas no momento da sangria no abate (*post-mortem*).

A transformação do músculo em carne resulta na passagem de um metabolismo aeróbico para um metabolismo anaeróbico, o qual o músculo *post-mortem* utiliza as reservas de glicogênio gerando lactato. O lactato acumula-se no músculo diminuindo o pH intracelular. Reservas insuficientes de glicogênio no abate resultam em valores de pH mais elevados, ocasionando problemas de qualidade da carne. A principal causa de uma diminuição das reservas de glicogênio é o estresse (IMMONEN et al., 2000; WULF et al., 2002). Deste modo, a determinação das concentrações de hormônios e metabólitos, como ACTH, cortisol, glicogênio e lactato funcionam como indicadores do nível de estresse do animal e seus possíveis efeitos prejudiciais para obtenção de carnes com qualidade.

O conteúdo de glicogênio e lactato verificado no músculo dos animais variaram de 1,71 a 72,51 $\mu\text{mol/g}$ e 1,54 a 49,53 $\mu\text{mol/g}$, respectivamente, indicando que alguns animais possuíam pouca reserva de glicogênio muscular fato este, que pode ser responsável pelos altos valores de pH 24 horas encontrados nesse trabalho. No abate, a produção de lactato no músculo normal, em virtude do conteúdo de glicogênio, deve ser em torno de 100 μmol de lactato/g de músculo segundo Maltin et al. (2003). Entretanto, Ramos e Gomide (2007) relatam que a concentração de ácido láctico em músculo *Longissimus dorsi* de bovinos imediatamente após o abate é de 6 a 16 $\mu\text{mol/g}$.

Para glicogênio, Lahucky et al. (1998) encontraram valores com uma hora *post-mortem* variando de 13,6 a 68,7 $\mu\text{mol/g}$ em touros. Já Sanz et al. (1996) reportaram valores de glicogênio oscilando entre 14,82 e 55,91 $\mu\text{mol/g}$ para touros Pardos-Suíços e Pirenaico, em músculo *Longissimus dorsi*.

Como verificado na literatura e no presente trabalho, os valores para glicogênio e lactato são variáveis e as reservas podem ser reduzidas por qualquer estresse fisiológico a que o animal é submetido. Os níveis de glicogênio podem variar consideravelmente mesmo em animais da mesma espécie, devido a dependência do estado nutricional, fatores hormonais do animal durante o abate e manejo pré-abate (RAMOS; GOMIDE, 2007).

As mensurações dos níveis hormonais foram utilizadas como indicadoras de estresse fisiológico no momento do abate. Os valores encontrados, tanto para cortisol quanto para ACTH *ante-mortem* e *post-mortem*, foram próximos. Bourguet et al. (2010) obtiveram níveis de cortisol e adrenalina plasmático maiores em amostras coletadas no abate quando comparadas às amostras realizadas durante o

confinamento. Esses autores relataram valores de cortisol que variaram 2 para 7 $\mu\text{g/dL}$.

As características indicadoras da qualidade da carne, nas amostras consideradas com potencial à DFD ($\text{pH} \geq 5,8$), bem como, nas amostras assumidas como normais ($\text{pH} < 5,8$) estão apresentados na Tabela 2.2. Os resultados indicaram que o pH 24 horas afeta principalmente as mensurações de cor (L^* , a^* , b^*) e as perdas por cozimento no 1º e 14º dia de maturação.

Os valores de L^* , a^* , b^* nas carnes DFD foram menores indicando que essas carnes foram mais escuras, menos vermelha e menos amarela. Apple et al. (1995) também relataram valores de L^* , a^* , b^* menores em cordeiros estressados, com alto pH *post-mortem*.

Segundo Viljoen, De Koch e Webb (2002) a cor da carne é um atributo importante para a aceitabilidade do produto pelo consumidor, sendo a cor vermelha brilhante mais atrativa do que a cor vermelho-púrpura de carnes DFD.

Os valores de pH 1 hora e 24 horas *post-mortem* foram correlacionados medianamente com mensurações de cor, além de algumas perdas por cozimento dentro do grupo DFD (Tabela 2.3) confirmando os resultados encontrados anteriormente nas análises de variância. Valores de a^* e b^* foram mais correlacionados com pH do que valores L^* , o que também foi encontrado por Wulf e Wise (1999) e Page, Wulf e Schwotzer (2001). As correlações encontradas entre essas características foram negativas indicando que maiores valores de pH foram associados a menores valores de cor.

A mudança da cor da carne é resultado de alterações que ocorrem na mioglobina, proteína hidrossolúvel presente no músculo responsável pela oxigenação, e depende de vários fatores como tempo, temperatura, pH e competição por oxigênio com a mitocôndria (AMSA, 2012). A mioglobina pode apresentar-se em quatro estados de oxidação: deoximioglobina (vermelho-púrpura), oximioglobina (vermelho-brilhante), carboximioglobina (vermelho-brilhante mais estável) e metamioglobina (marrom) (MANCINI; HUNT, 2005).

Tabela 2.2. Estimativas de médias de quadrados mínimos, erro padrão (EP) e nível de significância (valor P) para as características avaliadas nos grupos de carnes normais (pH<5,8) e carnes DFD - *dark, firm and dry* - (pH pH≥5,8)

Características ¹	pH<5.8		pH≥5.8		Valor P
	Média	±EP	Média	±EP	
pH 1 hora	6,61	0,02	6,67	0,03	0,0847
L* 1 dia	32,74	0,31	30,04	0,59	<0,0001
L* 7 dias	35,66	0,31	32,91	0,57	<0,0001
L* 14 dias	34,84	0,32	31,21	0,59	<0,0001
a* 1 dia	18,56	0,22	17,12	0,38	0,0003
a* 7 dias	16,65	0,17	14,64	0,34	<0,0001
a* 14 dias	17,81	0,22	16,68	0,39	0,0056
b* 1 dia	15,58	0,15	13,71	0,29	<0,0001
b* 7 dias	15,52	0,13	12,95	0,28	<0,0001
b* 14 dias	15,23	0,15	13,36	0,29	<0,0001
PC (%)1 dia	23,87	0,31	22,01	0,69	0,0172
PC (%) 7 dias	25,20	0,36	23,83	0,75	0,0993
PC (%) 14 dias	24,90	0,34	22,56	0,63	0,0005
FC (kgf) 1dia	9,29	0,13	8,86	0,28	0,1816
FC (kgf) 7 dias	7,90	0,14	7,79	0,26	0,7072
FC (kgf) 14 dias	6,46	0,17	6,65	0,26	0,4377
Glicogênio (μmol/g)	16,26	0,42	14,33	0,94	0,0682
Lactato (μmol/g)	16,01	0,41	14,72	0,93	0,2144
ACTH AM (pg/mL)	15,30	1,03	18,66	2,32	0,1962
ACTH PM (pg/mL)	10,12	0,88	11,84	1,79	0,3781
Cortisol AM (μg/dL)	4,45	0,22	4,65	0,39	0,6180
Cortisol PM (μg/dL)	6,22	0,19	6,91	0,37	0,0864

¹ pH 1 hora e 24 horas = pH intramuscular mensurado a 1 hora e 24 horas *post-mortem*; L* a* b* mensurações de cor realizadas nos bifes no 1º, 7º e 14º dia de maturação; PC = perdas por cozimento mensurada nos bifes no 1º, 7º e 14º dia de maturação; FC = força de cisalhamento no 1º, 7º e 14º dia de maturação; ACTH AM e Cortisol AM = concentração desses hormônios determinadas em amostras de sangue coletadas dos animais no confinamento (*ante-mortem*); ACTH PM e Cortisol PM = concentração desses hormônios determinadas em amostras de sangue coletadas no momento da sangria no abate (*post-mortem*).

Tabela 2.3. Coeficientes de correlação entre as características endócrinas, metabólicas e qualidade da carne dentro de cada grupo de carne. Coeficientes para carnes classificadas como normais (pH <5,8) estão na diagonal acima e coeficientes para carnes classificadas como DFD – *dark, firm and dry* – (pH≥5,8) estão na diagonal abaixo (negrito)

Item ¹	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.	20.	21.	22.	23.
1. pH 1 hora		-0,05	0,34	0,28	0,33	-0,28	-0,15	-0,29	0,05	-0,07	-0,23	0,15	0,11	0,04	0,21	0,15	0,13	-0,05	-0,07	-0,22	-0,07	-0,14	-0,08
2. pH 24 horas	0,31		-0,13	-0,02	-0,10	-0,05	-0,51	-0,16	-0,15	0,04	0,05	0,03	-0,19	-0,15	0,25	0,25	0,14	-0,13	-0,06	-0,12	-0,12	-0,28	-0,13
3. L* 1 dia	0,40	0,27		0,85	0,89	-0,81	-0,33	-0,62	-0,20	-0,19	-0,21	0,32	0,18	0,17	0,28	0,16	0,15	-0,06	0,38	-0,30	0,01	-0,10	-0,04
4. L* 7 dias	0,17	-0,19	0,58		0,86	-0,72	-0,41	-0,52	-0,27	-0,13	-0,14	0,31	0,13	0,09	0,25	0,08	0,09	0,03	0,39	-0,26	0,00	-0,12	-0,06
5. L* 14 dias	0,30	0,14	0,83	0,80		-0,75	-0,28	-0,71	-0,21	-0,29	-0,28	0,33	0,15	0,19	0,30	0,15	0,14	-0,05	0,41	-0,29	0,00	-0,21	-0,05
6. a* 1 dia	-0,42	-0,54	-0,71	-0,21	-0,52		0,43	0,64	0,54	0,37	0,36	-0,17	-0,08	-0,14	-0,36	-0,29	-0,25	0,18	-0,30	0,28	0,05	0,16	0,08
7. a* 7 dias	-0,30	-0,37	-0,49	-0,45	-0,47	0,74		0,53	0,06	0,12	0,09	-0,12	0,05	0,09	-0,23	-0,19	-0,17	0,07	0,02	0,17	-0,06	0,24	0,00
8. a* 14 dias	-0,42	-0,45	-0,72	-0,41	-0,73	0,83	0,75		0,10	0,51	0,52	-0,15	-0,04	-0,02	-0,27	-0,27	-0,21	0,09	-0,19	0,27	-0,05	0,29	0,05
9. b* 1 dia	0,00	-0,23	0,15	0,24	0,29	0,43	0,44	0,15		0,33	0,16	0,00	0,12	-0,02	-0,40	-0,25	-0,22	0,15	-0,24	0,17	0,15	0,04	0,10
10. b* 7 dias	-0,33	-0,52	-0,46	-0,06	-0,37	0,74	0,57	0,76	0,43		0,73	0,07	0,00	0,09	-0,27	-0,36	-0,31	0,18	-0,16	0,00	0,01	0,02	0,10
11. b* 14 dias	-0,52	-0,57	-0,57	-0,13	-0,54	0,76	0,57	0,89	0,14	0,75		0,09	-0,05	0,00	-0,19	-0,28	-0,25	0,17	-0,04	0,07	0,04	0,03	0,07
12. PC 1 dia	-0,05	-0,31	0,12	0,31	0,08	0,03	-0,03	0,18	-0,12	0,13	0,44		0,22	0,22	0,52	0,24	0,15	-0,02	0,16	-0,17	0,02	-0,08	0,00
13. PC 7 dias	-0,11	-0,40	0,19	0,57	0,36	0,08	-0,13	-0,07	0,10	0,12	0,20	0,31		0,23	0,14	0,24	-0,06	-0,05	-0,04	-0,07	-0,04	-0,06	0,04
14. PC 14 dias	-0,43	-0,26	-0,26	-0,02	-0,15	0,31	0,41	0,41	0,12	0,47	0,48	0,08	0,29		0,14	0,13	0,27	-0,12	0,00	0,02	0,01	-0,02	0,09
15. FC 1 dia	-0,10	-0,48	-0,10	0,16	-0,14	0,13	-0,03	0,26	-0,23	0,27	0,32	0,35	0,11	0,04		0,69	0,41	-0,16	0,17	-0,22	-0,11	-0,10	-0,03
16. FC 7 dias	-0,03	-0,21	-0,08	-0,06	-0,22	-0,07	-0,09	0,12	-0,40	-0,07	0,07	0,18	-0,02	0,02	0,72		0,57	-0,28	0,06	-0,22	-0,16	-0,21	-0,13
17. FC 14 dias	0,23	-0,04	0,14	-0,02	0,02	-0,35	-0,15	-0,20	-0,37	-0,24	-0,28	0,04	-0,05	0,07	0,48	0,76		-0,26	0,07	-0,09	-0,08	-0,11	-0,06
18. Glicogênio	-0,32	-0,76	-0,23	0,34	-0,02	0,63	0,39	0,51	0,31	0,51	0,62	0,29	0,41	0,25	0,35	0,00	-0,19		0,08	0,17	0,46	0,16	0,04
19. Lactato	0,03	0,32	0,53	0,20	0,41	-0,51	-0,39	-0,51	-0,02	-0,49	-0,52	-0,13	-0,14	-0,22	-0,09	0,15	0,22	-0,27		-0,04	0,15	-0,03	-0,16
20. ACTH AM	-0,15	-0,28	-0,11	-0,03	-0,14	0,31	0,32	0,28	0,03	0,14	0,27	0,31	0,06	0,10	0,19	0,06	0,05	0,34	0,12		0,37	0,40	0,21
21. ACTH PM	0,09	-0,14	0,37	0,33	0,41	-0,10	0,05	-0,08	0,16	0,01	-0,04	0,27	0,17	0,07	0,03	-0,05	0,04	0,27	0,36	0,57		0,17	0,11
22. Cortisol AM	0,08	-0,09	-0,06	-0,21	-0,13	0,04	0,26	0,10	0,01	0,06	0,00	0,07	-0,07	0,17	-0,05	0,04	0,18	-0,11	-0,03	0,44	0,33		0,41
23. Cortisol PM	-0,33	-0,18	-0,23	-0,05	-0,29	0,22	0,08	0,37	-0,20	0,23	0,38	0,15	0,08	0,16	0,03	-0,01	-0,15	0,17	-0,25	0,19	-0,02	0,16	

¹ pH 1 hora e 24 horas = pH intramuscular mensurado a 1 hora e 24 horas *post-mortem*; L* a* b* mensurações de cor realizadas nos bifes no 1º, 7º e 14º dia de maturação; PC = perdas por cozimento mensurada nos bifes no 1º, 7º e 14º dia de maturação; FC = força de cisalhamento no 1º, 7º e 14º dia de maturação; ACTH AM e Cortisol AM = concentração desses hormônios determinadas em amostras de sangue coletadas dos animais no confinamento (*ante-mortem*); ACTH PM e Cortisol PM = concentração desses hormônios determinadas em amostras de sangue coletadas no momento da sangria no abate (*post-mortem*).

Valores altos de pH *post-mortem* devido a insuficiente formação de ácido láctico durante a glicólise anaeróbica *post-mortem*, típica de carnes DFD, permitem que o potencial metabólico da mitocôndria continue ativo estimulando a competição pelo oxigênio presente no músculo. Assim, a mioglobina é desoxigenada acarretando a formação de deoximioglobina (TANG et al., 2005). Além disso, o alto pH do músculo favorece a formação de ligação forte entre proteínas e a água, diminuindo a água livre e deixando as fibras musculares mais inchadas. Consequentemente, o espaço entre as fibras diminui e a cor da carne torna-se mais escura, pois há menos água livre para refletir luz (LAWRIE, 2005).

As perdas por cozimento foram menores em carnes DFD, corroborando Silva, Patarata e Martins (1999). A diminuição das perdas por cozimento é um reflexo do aumento da capacidade de retenção de água associado com carnes de alto pH 24 horas (BOUTON; HARRIS; SHORTOSE, 1971), uma vez que as proteínas presentes no músculo continuam ligadas a água dificultando a sua saída (HUFF-LONERGAN; LONERGAN, 2007). Bouton et al. (1973) consideraram que a maior capacidade de retenção de água de carne em alto pH 24 horas poderia contribuir para carnes com maior maciez.

A maciez da carne verificada pela força de cisalhamento não foi alterada pelo pH 24 horas (Tabela 2.2). Entretanto, Silva, Patarata e Martins (1999) observaram que carne de pH normal é significativamente mais dura do que carne DFD em diferentes tempos *post-mortem* (um, seis e 13 dias). Em contradição, Wulf et al. (2002) observaram que carnes DFD tem valores maiores de FC e a maciez nesse grupo é altamente variável. Segundo Dransfield (1996) carnes com alto pH 24 horas são mais macias em relação a carnes de pH normal devido a uma maior taxa de tenderização, mas que, com uma maturação prolongada, a maciez final torna-se similar. No estudo de Viljoen, De Koch e Webb (2002) avaliando os atributos sensoriais entre carnes normais e DFD não observaram diferenças significativas de aceitabilidade na textura e no sabor pelos consumidores.

Diferenças entre o conteúdo de glicogênio muscular entre carnes normais e DFD foram observadas ($P < 0,07$) junto com alta correlação negativa de pH 24 horas com o conteúdo de glicogênio no músculo do grupo DFD (-0,76). Este fato demonstra a importância de maiores concentrações de glicogênio muscular serem necessários para que a conversão do músculo em carne ocorra de maneira satisfatória.

Dentro do grupo de carnes normais, pH 24 horas foi correlacionado medianamente com a^* mensurado aos 7 dias de maturação, glicogênio com ACTH *post-mortem*, ACTH *ante-mortem* com cortisol *ante-mortem* e cortisol *ante-mortem* com cortisol *post-mortem*. As variáveis endócrinas foram correlacionadas positivamente entre si e não afetaram diretamente as características de qualidade da carne.

Em ambos os grupos, todas as variáveis de cor foram correlacionadas entre si. L^* 1 dia é capaz de predizer os valores de L^* aos 7 e 14 dias de maturação, assim como para a^* . Já para os valores b^* , apenas a mensuração aos 7 dias foi correlacionada com b^* aos 14 dias. Os valores L^* aos 14 dias foram correlacionados medianamente com conteúdo de lactato muscular.

As forças de cisalhamento foram correlacionadas apenas entre os tempos de maturação, não sendo afetadas por nenhuma outra característica.

2.4 Conclusão

A incidência de carne com potencial para DFD nas amostras avaliadas é de 18,7%. Alto valor de pH 24 horas *post-mortem* influencia à cor e as perdas por cozimento da carne. Não foi observada diferença de maciez entre as amostras normais e com potencial DFD. O conteúdo de glicogênio no músculo é um dos fatores que contribui para a queda do pH 24 horas *post-mortem*.

Referências

AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION - AMSA - Meat Color Measurement Guidelines. **American Meat Science Association**, 2012.

AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION - AMSA - Research guidelines for cookery, sensory evaluation, and instrumental tenderness of fresh meat. **American Meat Science Association and National Live Stock and Meat Board**, 1995.

APPLE, J.K. et al. Effects of restraint and isolation stress and epidural blockade on endocrine and blood metabolite status, muscle glycogen metabolism, and incidence of dark-cutting longissimus muscle of sheep. **Journal of Animal Science**, v.73, p.2295-2307, 1995.

BOURGUET, C. et al. Characterising the emotional reactivity of cows to understand and predict their stress reactions to the slaughter procedure. **Applied Animal Behaviour Science**, v.125, p.9-21, 2010.

BOUTON, P.E. et al. Influence of pH and fibre contraction state upon factors affecting the tenderness of bovine muscle. **Journal of Food Science**, v.38, p.404-407, 1973.

BOUTON, P.E.; HARRIS, P.V., SHORTHOSE, W.R. Effect of ultimate pH upon the water-holding capacity and tenderness of mutton. **Journal of Animal Science**, v.36, p.435-439, 1971.

BRASIL (2000). Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, **Regulamento Técnico de Métodos de Insensibilização para o abate humanitário de animais de açougue**. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento.

BROWN, S.N.; BEVIS, E.A.; WARRIS, P.D. An Estimate of the Incidence of Dark Cutting Beef in the United Kingdom. **Meat Science**, v.27, p.249-258, 1990.

CHMIEL, M. et al. Application of a computer vision system (CVS) to classify beef as normal or DFD. **Journal of Animal Science**, v.90, p.4126-4130, 2012.

CIE. **Recommendations on uniform color spaces - color difference equations, Psychometric Color Terms**. Commission Internationale de l'Eclairage, Paris Supplement No. 2 to CIE Publication No. 15 (E-1.3.1)1978, 1971/(TC-1-1), 1976.

DRANSFIELD, E. The texture of meat: conditioning and ageing. In: TAYLOR, S.A. et al. **Meat quality and meat packaging**. Utrecht, The Netherlands: ECCEAMST, 1996, p.65-87.

FABIANSSON, S.; ERICHSEN, I.; REUTERSWÄRD, A.L. The Incidence of Dark Cutting Beef in Sweden. **Meat Science**, v.10, p.21-33, 1984.

HUFF-LONERGAN, E.; LONERGAN, M. New frontiers in understanding drip loss in pork: recent insights on the role of postmortem muscle biochemistry. **Journal of Animal Breeding Genetics**, v.124, p.19-26, 2007.

IMMONEN, K. et al. Bovine muscle glycogen concentration in relation to finishing diet, slaughter and ultimate pH. **Meat Science**, v.55, p.25-31, 2000.

KOOHMARAIE, M. Biochemical factor regulation the toughening and tenderization processes of meat. **Meat Science**, v.43, p.193-201, 1996.

LAHUCKY, R. et al. Effect of preslaughter handling on muscle glycogen level and selected meat quality traits in beef. **Meat Science**, v.50, p.389-393, 1998.

LAWRIE, R.A. **Ciência da Carne**. Tradução de Jane Maria Rubensan. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.249-295.

MACH, N. et al. Association between animal, transportation, slaughterhouse practices, and meat pH in beef. **Meat Science**, v.78, p. 232-238, 2008.

MALTIN, C. et al. Determinants of meat quality: tenderness. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.62, p.337-347, 2003.

MANCINI, R.A.; HUNT, M.C. Current research in meat color. **Meat Science**, v.71, p.100-121, 2005.

OLIVEIRA, E.A. et al. Quality traits and lipid composition of meat from Nellore young bulls fed with different oils either protected or unprotected from rumen degradation. **Meat Science**, v.90, p.28-35, 2012.

PAGE, J.K.; WULF, D.M.; SCHWOTZER, T.R. A survey of beef muscle color and pH. **Journal of Animal Science**, v.79, p. 678-687, 2001.

PFLANZER, S.B.; FELÍCIO, P.E. Effects of teeth maturity and fatness of Nellore (*Bos indicus*) steer carcasses on instrumental and sensory tenderness. **Meat Science**, v.83, p.697-701, 2009.

RAMOS, E.M.; GOMIDE, L.A.M **Avaliação da Qualidade de Carnes: Fundamentos e Metodologias**. Viçosa-MG:UFV, 2007.

SANZ, M.C. et al. Effect of Breed on the Muscle Glycogen Content and Dark Cutting Incidence in Stressed Young Bulls. **Meat Science**, v.43, p.37-42, 1996.

SILVA, J.A.; PATARATA, L.; MARTINS C. Influence of ultimate pH on bovine meat tenderness during ageing. **Meat Science**, v.52, p.453-459, 1999.

TANG, J. et al. Postmortem oxygen consumption by mitochondria and its effects on myoglobin form and stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.1223-1230, 2005.

TORNBERG, E. Biophysical aspects of meat tenderness. **Meat Science**, v.43, p.175-191, 1996.

VILJOEN, H.F.; DE KOCH, H.L.; WEBB, E.C. Consumer acceptability of dark, firm and dry (DFD) and normal pH beef steaks. **Meat Science**, v.61, p.181-185, 2002.

WHIPPLE, G. et al. Evaluation of attributes that affect longissimus muscle tenderness in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, v.68, p.2716-2728, 1990.

WULF, D.M. et al. Relationships among glycolytic potential, dark cutting (dark, firm and dry) beef, and cooked beef palatability. **Journal of Animal Science**, v.80, p.1895-1903, 2002.

WULF, D.M.; WISE, J.W. Measuring muscle color on beef carcasses using the L*a*b* color space. **Journal of Animal Science**, v.77, p.2418-2427, 1999.

YLÄ-AJOS, M.; RUUSUNEN, M.; PUOLANNE, E. The significance of the activity of glycogen debranching enzyme in glycolysis in porcine and bovine muscles. **Meat Science**, v.72, p.532-538, 2006.

YOUNG, O.A. et al. A method for early determination of meat ultimate pH. **Meat Science**, v.66, p.493-498, 2004.

3 ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS EM GENES DO EIXO HIPOTÁLAMO-PITUITÁRIA-ADRENAL E CARACTERÍSTICAS ENDÓCRINAS, METABÓLICAS E QUALIDADE DA CARNE BOVINA

Resumo

O eixo neuroendócrino hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) é um importante sistema de reposta ao estresse com reconhecido impacto na produção animal. Os receptores glicocorticoides (GR) e mineralocorticoides (MR) são componentes centrais do eixo e atuam para coordenar as respostas aos agentes estressores, visando restabelecer a homeostase. Esse trabalho tem como objetivo identificar polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos genes do MR e GR em bovinos Nelore, bem como, avaliar a associação desses SNPs com as características endócrinas *ante-* e *post-mortem*, características metabólicas e variáveis indicadoras da qualidade da carne. Foram identificados cinco marcadores do tipo SNPs nos genes estudados, sendo dois em GR (NR3C1_1; NR3C1_2) e três em MR (NR3C2_1; NR3C2_2; NR3C2_3). Foi evidenciada associação significativa do marcador NR3C1_1 com níveis de cortisol plasmático *post-mortem* ($P=0,001$). O marcador NR3C1_2 foi associado com pH na carcaça a 1 hora *post-mortem* ($P=0,04$). Os marcadores NR3C2_1 e NR3C2_2 foram associados com conteúdo de glicogênio no músculo ($P=0,02$ e $P=0,001$) e nível de ACTH *post-mortem* ($P=0,04$ e $P=0,04$). O marcador NR3C2_3 apresentou associação significativa com cor a^* mensurado aos sete dias de maturação ($P=0,03$). As associações verificadas neste trabalho mostraram que o SNP no gene MR promoveu alterações na quantidade de glicogênio muscular, podendo influenciar a qualidade da carne. Por outro lado, o SNP em GR, apresentou relação com o hormônio cortisol, um indicador de resposta ao estresse.

Palavras chave: cortisol; estresse; glicogênio; maciez de carne; raça Nelore

Abstract

The hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) neuroendocrine axis is an important stress response system that has a recognised impact on animal production. The glucocorticoids receptors (GR) and mineralocorticoids receptors (MR) are central components of this axis and coordinate the responses to stress agents to re-establish homeostasis. This work aim to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the MR and GR genes of Nelore cattle and evaluate the association between these SNPs and *ante-* and *post-mortem* endocrine characteristics, metabolic characteristics and variables that are indicators of meat quality. Five SNPs markers were identified in the genes studied; two were located in GR (NR3C1_1; NR3C1_2), and three were in MR (NR3C2_1; NR3C2_2; NR3C2_3). There was a significant relationship between the marker NR3C1_1 and *post-mortem* plasma cortisol levels ($P = 0.001$). The marker NR3C1_2 was associated with the pH of the carcass at 1 h *post-mortem* ($P = 0.04$). The markers NR3C2_1 and NR3C2_2 were associated with muscle glycogen content ($P = 0.02$ and $P = 0.001$) and *post-mortem* ACTH levels ($P = 0.04$ and $P = 0.04$). The marker NR3C2_3 was significantly associated with the colour a^* measured at 7 days of maturation ($P = 0.03$). The associations observed in the present study show that an SNP in the MR gene resulted in changes in the amount of muscle glycogen, which can influence meat quality. Conversely, the SNP in GR, was related with cortisol hormone, a indicator of the stress response.

Keywords: cortisol; glycogen; meat tenderness; Nelore cattle; stress

3.1 Introdução

O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) é o principal sistema neuroendócrino envolvido na resposta a agentes estressores. Uma vez que o sistema é ativado, desencadeia-se a liberação de hormônios a fim de restabelecer a homeostase. O cortisol é o principal hormônio do eixo e atua em diversas células e tecidos por meio da interação com dois receptores nucleares, os receptores glicocorticoides (GR) codificados pelo gene *NR3C1* e os receptores mineralocorticoides (MR), codificados pelo gene *NR3C2* (MCEWEN; DE KLOET; ROSTENE, 1986; DE KLOET, 1991). O MR e o GR agem por meio de ações genômicas e não-genômicas que controlam o início e a terminação da resposta ao estresse (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005).

Prévios estudos relatam que o estresse tem um grande impacto na produção animal, com sérias implicações econômicas (MOUNIER et al., 2006; FERGUSON; WARNER, 2008). O cortisol influencia o sistema imune, reprodução, processos inflamatórios, vias metabólicas e funções cerebrais (MINTON, 1994; MANTEUFFEL, 2002; MORMÈDE et al., 2011). A qualidade da carne, por sua vez, sofre influência de agentes estressores. Em casos de estresse crônico, as reservas de glicogênio muscular esgotam-se e acabam por resultar em carcaças com alto pH 24 horas *post-mortem*, favorecendo ao aparecimento de uma carne de cor escura, consistente e não-exsudativa (DFD - *dark, firm, dry*), a qual possui baixa aceitabilidade por parte de consumidores (APPLE et al., 1995).

Dessa forma, a complexa regulação do eixo HPA pode desencadear diversos efeitos e tem atraído interesse nos sistemas de produção (MANTEUFFEL, 2002). Mudanças na sinalização do cortisol devido à variabilidade de MR ou GR poderiam explicar a base da existência de respostas distintas para o mesmo agente estressor em animais. Em humanos, os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs – *single nucleotide polymorphisms*) 215G/C e I180V em MR mudaram a sinalização do cortisol *in vitro* (ARAI et al., 2003). O 215G/C foi associado com o aumento do cortisol plasmático e salivar (KUNINGAS et al., 2007; MUHTZ et al., 2011). Alguns polimorfismos em GR influenciaram a capacidade de transativação deste receptor, implicando em sensibilidade aos glicocorticoides (RUSSCHER et al., 2005). Em humanos, no gene do GR, a variação ER22/23EK foi associada com resistência ao

cortisol (VAN ROSSUM et al., 2002) enquanto os polimorfismos N363S e BclI aumentaram a sensibilidade ao cortisol (VAN ROSSUM et al., 2002, VAN ROSSUM et al., 2003). O SNP c*2122A>G em GR mostrou forte associação com concentração de cortisol plasmático em suínos (MURÁNI et al., 2010).

Pelo exposto, os objetivos deste trabalho foram identificar polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos genes do MR e GR em bovinos da raça Nelore, bem como, avaliar a associação dos SNPs encontrados com as características endócrinas *ante-* e *post-mortem*, metabólicas e variáveis indicadoras da qualidade da carne.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Animais

Esse trabalho foi desenvolvido de acordo com as normas estabelecidas no Regimento Geral do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo. Foram utilizados no experimento 241 bovinos machos da raça Nelore (119 não castrados e 122 castrados) recriados a pasto e terminados em confinamento. O experimento foi implantado em três anos consecutivos, sendo 76 animais do ano de 2009, 79 no ano de 2010 e 86 no ano de 2011. Em todos os anos, os animais foram alimentados com dietas de alto concentrado (85%), composto por milho, farelo de soja, casca de soja, glúten de milho, sal mineral e ureia, contendo 14,6% de proteína bruta e 74,5% de NDT. A fonte de volumoso utilizada foi o bagaço de cana de açúcar (15%).

No final do experimento, os animais foram transportados por 200 metros até o abatedouro em caminhão boiadeiro, atordoados e abatidos seguindo a regulamentação técnica dos métodos de atordoamento para abate humanitário (BRASIL, 2000). O abate foi realizado em animais com idade média de $24 \pm 1,2$ meses e peso médio de 508 ± 39 kg. Após o abate, carcaças foram armazenadas a 4°C durante a noite.

3.2.2 Amostras *ante- e post-mortem*

Duas amostras de sangue foram coletadas em tubos heparinizados, sendo uma através de punção na veia jugular no início do confinamento (*ante-mortem*) e outra no abate durante a exsanguinação (*post-mortem*), para análise dos níveis de cortisol e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Tubos foram mantidos no gelo até centrifugação e alíquotas de plasma foram congeladas a -20°C até as análises. Aproximadamente 30 minutos *post-mortem*, uma amostra de tecido foi retirada do *Longissimus dorsi* (LD) na região da 12ª costela e congelada em nitrogênio líquido. As amostras de tecido muscular foram transferidas para um ultrafreezer e armazenadas a -80°C para mensuração posterior do glicogênio e lactato.

O pH das carcaças foram determinados pela inserção de um eletrodo de vidro e uma sonda de temperatura diretamente dentro de cada meia-carcaça esquerda na região da 12ª costela a 1 e 24 horas *post-mortem*.

No dia seguinte, após o período de resfriamento de 24 horas, três bifes de 2,5 cm de altura foram cortados do músculo LD entre a 11ª e 13ª costelas e embalados a vácuo. Os bifes foram armazenados a 2-4°C durante 14 dias para o processo de maturação. Ao 1º, 7º e 14º dia um bife foi removido da câmara fria e usado para determinação da Força de Cisalhamento (FC) em aparelho *Warner-Bratzler*. As embalagens a vácuo eram abertas e os bifes pesados (P_i) em uma balança semi-analítica. Após 20 minutos de exposição ao oxigênio foi realizada a mensuração dos componentes de cor L^* , a^* , e b^* (CIE, 1976) usando um colorímetro portátil (*CM-2500d*, *Konica Minolta*) com fonte de luz de D65, ângulo de observação de 10° e abertura da célula de medida de 30 mm.

Em seguida, os bifes foram assados em forno elétrico até atingir a temperatura interna de 40°C, virado e cozido, até atingir a temperatura interna final de 71°C. Após o cozimento, os bifes de LD foram mantidos a temperatura ambiente até atingir a temperatura interna de 28°C para serem pesados (P_f), embalados em filme plástico e armazenados a 4°C por 24 horas. As temperaturas foram monitoradas com termopares inseridos no centro geométrico do bife e registradas usando um registrador de temperatura de mão.

Os pesos da amostra antes e depois do cozimento foram utilizados para determinar as perdas por cozimento (PC), ou seja, $[PC=(P_i-P_f)/P_i]$, expressa em %.

3.2.3 Força de cisalhamento *Warner-Bratzler*

Após o resfriamento dos bifes LD por 24 horas a 4°C, cilindros de 1,27 cm de diâmetro foram removidos paralelamente a orientação longitudinal das fibras musculares. Um mínimo de 4 e máximo de 6 cilindros foram obtidos de cada bife. Os cilindros foram cisalhados uma vez cada no centro usando o aparelho *Warner-Bratzler*. A força de cisalhamento de cada amostra foi determinada pela média dos valores dos cilindros.

3.2.4 Mensurações endócrinas

As amostras de sangue coletadas de cada animal foram colocadas no gelo e mais tarde centrifugadas a 3.000 x g por 15 min. a temperatura ambiente para obter o plasma. A amostra de plasma resultante foi armazenada a -20°C até a realização das análises da concentração de cortisol e ACTH. Os níveis de cortisol e ACTH foram mensurados com o uso de *kits* imunoenzimáticos viáveis comercialmente (*Cortisol Accu Bind, Monobind Inc., Lake Forest, CA, USA* e *ACTH ELISA, Bioamerica Inc., Irvine, CA, USA*). Amostras foram analisadas em duplicata e, em cada placa, foram utilizados padrões inter e intra ensaio para validação. Os ensaios foram validados para uso em bovinos pelo estudo de uma curva de diluição de duas amostras com valores extremos para as dosagens.

3.2.5 Determinação de glicogênio e lactato no tecido muscular

Amostras de tecido muscular foram preparadas usando o método descrito por Ramos e Gomide (2007). Tecidos de LD congelados (0,5g), foram homogeneizados com o auxílio de um homogeneizador Turratec (*TE-102, Tecnal*) em ácido perclórico 0,6 M gelado para desproteinizar o tecido. Amostras foram centrifugadas a 3.000 x g por 10 min a 4°C e o sobrenadante filtrado em papel de filtro nº 54 (*Whatman*) para análise. O lactato e o glicogênio foram determinados espectrofotometricamente com o *kit* de Análise de Lactato EnzyChrom™ (*BioAssay Systems, Hayward, USA*) e Análise de Glicogênio EnzyChrom™ (*BioAssay Systems, Hayward, USA*). A intensidade colorimétrica de cada poço foi determinada usando um leitor de microplaca a 570 nm.

3.2.6 Detecção de variações na sequência do DNA e genotipagem

As sequências dos genes bovino *NR3C1* (NC_007305.5) e *NR3C2* (NC_007315.5) foram obtidas no banco de dados do NCBI. Um total de 10 pares de primers foi desenhado empregando o programa Primer 3 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) para amplificar as regiões do exon 2 do *NR3C1* e exon 1 do *NR3C2* (Tabela 3.1). O DNA genômico foi isolado de sangue total de acordo com o protocolo de Olerup e Zetterquist (1992) e a região de interesse foi amplificado por técnicas padrões de reação em cadeia da polimerase (PCR). A PCR foi realizada para um volume final de 25 µl, contendo 20 ng do DNA genômico, 5 pmol de primers direto e reverso, 0,5 mM dNTPs, 2,5 µl do Tampão de Reação sem Magnésio (10x), 2,5 mM MgCl₂, e 0,2 µl de *Taq* DNA polimerase platinum (*Invitrogen*). Os ciclos da PCR foram: 2 min a 95°C, 31 ciclos a 95°C por 30 s, 58°C por 30 s e 72°C por 30 s, seguido por um ciclo de 72°C por 5 min. A presença do produto da PCR e tamanho foi verificada em eletroforese de gel de agarose antes da purificação com ExoSAP (*GE Healthcare*).

Tabela 3.1. Sequência dos primers utilizadas para sequenciamento do exon 2 do receptor glicocorticoide (*NR3C1*) e exon 1 do gene do receptor mineralocorticoide (*NR3C2*)

Gene	Primer	Sequência do Primer (5' → 3')		Tamanho do produto (bp)
		Forward	Reverse	
<i>NR3C1</i>	1	CAAGGAATTAGATCCGGTGTT	CCAGAGGAAAGGCTGATTTG	472
	2	ATGGGAAATGACCTGGGATT	CAGTCCTCATTCGAGCTTCC	455
	3	TGGGTCCCCAAGTAAAGAGA	CTGAACCGACAGGAATTGGT	482
	4	CCATTTCTGTTACGGTGTG	AATCACTGCCCAATGGGATA	473
<i>NR3C2</i>	1	CTTTTAGAGTAACTGCTATCCACGA	GGACCGACTGTTGTCTTGCT	314
	2	GTGGGGTCAACTTTCTCAGC	GGTGGCCGTTCTCTTTGTAA	401
	3	TTCCGTGAGAGAGGCTGACT'	CTCAACGGACTGGAGAGAGG	468
	4	TGTGTGTCCTCCACTTCAGC'	CTGGACTGGAACCATCTCT	454
	5	ATCTGTAGCCCTGGAAGCAC	CCATCATCCGGTCTTGTTT	503
	6	GGGCTTCGATGGTAACTGTG	TGACCATGCTCCAAAAGAAA	450

O sequenciamento foi realizado no sequenciador automático ABI 3100 (*Applied Biosystems, Life Technologies Corporation*) e SNPs foram identificados por alinhamento e comparação das sequências de 50 animais escolhidos aleatoriamente com o auxílio dos programas *Phred/Phrap/Consed* (EWING; GREEN, 1998; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998). Foram sequenciadas as fitas diretas e reversas do DNA de cada animal a fim de confirmar os polimorfismos encontrados.

Os SNPs identificados foram avaliados na população total (N=241) através de genotipagem pelo método de discriminação alélica usando *TaqMan Universal Master Mix* (*Applied Biosystems, Life Technologies Corporation*) em *Real Time PCR*. Os genótipos gerados foram analisados com o programa *TaqMan Genotyper* versão 1.2 (*Applied Biosystems, Life Technologies Corporation*). Para confirmar os resultados dos genótipos, amostras controles de animais previamente sequenciados, foram utilizadas nas placas.

3.2.7 Análises estatísticas

As análises de associação das características endócrinas, metabólicas e variáveis indicadoras da qualidade da carne em relação aos genótipos dos SNPs identificados foram realizadas com auxílio do procedimento MIXED do programa *Statistical Analysis System*, versão 9.1.3 (*SAS Institute Inc., Cary, NC, USA*), de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + S_i + C_j + M_k + e_{ijkl}$$

Em que, Y_{ijkl} = é o valor observado para determinada variável endócrina ou variável metabólica ou variável indicadora da qualidade da carne; μ = constante comum para todas as observações; S_i = efeito aleatório do reprodutor, com média 0 e variância σ^2_R ; C_j = efeito fixo do grupo de contemporâneo (isto é, animais abatidos no mesmo ano-condição sexual) j ; M_k = efeito fixo do marcador k ; e_{ijkl} = efeito aleatório residual associado a características Y_{ijkl} com média 0 e variância σ^2_s . Esse modelo foi usado para testar efeito aditivo e efeito de dominância, estimado pelo contraste entre genótipos homozigotos e pelo contraste entre o efeito do genótipo heterozigoto e o efeito médio dos dois genótipos homozigotos, respectivamente.

Esse efeito e os valores de probabilidade associados foram obtidos por meio da opção estimativa do procedimento MIXED do SAS. O segundo modelo (modelo de regressão) foi realizado para estimar os efeitos de substituição. Esse modelo foi uma regressão no número de cópias de 1 dos 2 alelos presentes nos genótipos, assumindo efeitos aditivos para esse marcador. Por exemplo, para o polimorfismo A/G, o genótipo AA foi codificado 0, AG 1 e GG 2. Os outros efeitos foram os mesmos como no primeiro modelo. Cada SNP foi avaliado de forma independente. Os valores de probabilidade não foram corrigidos para múltiplos testes. As frequências genóticas e alélicas foram avaliadas para o desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg pelo Teste de Qui-quadrado (χ^2).

3.3 Resultados

3.3.1 Identificação dos polimorfismos nos genes NR3C1 e NR3C2

As regiões exon 2 para GR e exon 1 para MR foram escolhidas para sequenciamento em virtude de trabalhos descritos na literatura com humanos mostrando que polimorfismos no exon 2 tanto em GR quanto em MR são regiões mais associadas com sensibilidade a corticosteroides e mudanças no metabolismo (ARAI et al., 2003; VAN ROSSUM et al., 2003; VAN ROSSUM; LAMBERTS, 2004; DE RIJK; DE KLOET, 2005; DE RIJK et al., 2006). Assim, foi realizado um estudo de similaridade das sequências do exon 2 de MR e GR entre *Homo sapiens* e *Bos taurus*, por meio do programa BLAST (*Basic local Alignment Search tool*) disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>. Foi verificada uma similaridade de 86% para GR e para MR observou-se que o exon 2 em *Homo sapiens* corresponde em cerca de 85% ao exon 1 em *Bos taurus*. Esses dados levaram-nos a sequenciar o exon 1 ao invés do exon 2 para o MR.

Foram identificados 5 polimorfismos nos genes estudados, sendo três no gene NR3C2 (MR) e dois no NR3C1 (GR). No MR, os três SNPs estão localizados no exon 1 e no GR o primeiro SNP está localizado no exon 2 e o outro em região intrônica, 11 bases após o exon 2 (Tabela 3.2). Todos os polimorfismos encontrados são de transição, ou seja, troca entre duas purinas (A/G ou G/A) ou duas pirimidinas (C/T ou T/C) e não estão localizados em domínios funcionais conhecidos.

O *NR3C1_1* g.3.293A>G e o *NR3C2_1* g.115 T>C resultam em mutações não sinônimas enquanto que os demais resultam em mutações sinônimas. No *NR3C1_1* g.3.293A>G, a variação no códon CAG para CGG promove a troca do códon de leitura do aminoácido, acarretando na substituição do aminoácido glutamina para arginina. No *NR3C2_1* g.115 T>C a transição de TCC para CCC muda o aminoácido de serina para prolina. A glutamina pertence ao grupo dos aminoácidos polares neutros e a arginina dos aminoácidos polares básicos e, em outra substituição, a serina é um aminoácido polar neutro e a prolina um aminoácido apolar. Consequentemente, essas substituições podem acarretar implicações na estrutura e função da proteína.

Tabela 3.2. Nome e informações dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) identificados pelo sequenciamento nos genes do receptor glicocorticoide (GR) e receptor mineralocorticoide (MR)

Gene	Nome SNP	Posição	Região	SNP	Troca de aminoácido	Número de acesso dbSNP ss
GR (NR3C1)	NR3C1_1	g.3293	Exon 2	A/G	Glutamina/Arginina	528103353
	NR3C1_2	g.3982	Intron	T/C	----	528103355
MR (NR3C2)	NR3C2_1	g.115	Exon 1	T/C	Serina/Prolina	528103346
	NR3C2_2	g.570	Exon 1	T/C	---	528103349
	NR3C2_3	g.819	Exon 1	G/A	---	528103351

Os cinco novos SNPs identificados foram submetidos ao banco de dados de SNP (dbSNP) do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) e os números de acesso estão na Tabela 3.2.

3.3.2 Frequências genotípicas e alélicas

As frequências alélicas e genotípicas obtidas para os SNPs identificados na população estudada junto com o equilíbrio de Hardy-Weinberg estão apresentadas na Tabela 3.3. A distribuição de todos os SNPs não desvio significativamente do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Para o SNP *NR3C1_1* não foi encontrado indivíduos homozigotos para GG e, portanto, a frequência do alelo A foi maior do que a do alelo G. Para o SNP *NR3C1_2*, o alelo C apresentou maior frequência em relação ao alelo T.

No gene do MR, os SNPs *NR3C2_1* e *NR3C2_2*, o alelo C apresentou maior frequência em relação ao alelo T e para o SNP *NR3C2_3* observou-se baixa frequência do alelo A, com apenas um animal apresentando genótipo AA.

Tabela 3.3. Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) identificados nos genes do receptor mineralocorticoide (MR) e receptor glicocorticoide (GR)

Gene	Nome SNP	Frequência Genotípica			Frequência Alélica		$P > \chi^2$ [#]
GR (NR3C1)	NR3C1_1	AA 0,829	AG 0,172	GG ---	A 0,91	G 0,09	0,767
	NR3C1_2	TT 0,121	TC 0,506	CC 0,372	T 0,37	C 0,63	0,447
MR (NR3C2)	NR3C2_1	TT 0,059	TC 0,423	CC 0,519	T 0,27	C 0,73	0,535
	NR3C2_2	TT 0,050	TC 0,406	CC 0,544	T 0,25	C 0,75	0,514
	NR3C2_3	GG 0,875	GA 0,121	AA 0,004	G 0,94	A 0,06	0,905

[#] Valor de P para Equilíbrio de Hardy-Weinberg pelo Teste χ^2

3.3.3 Características fenotípicas avaliadas

As características relacionadas a qualidade da carne, como pH, cor (L^* a^* b^*), perda por cozimento (PC) e força de cisalhamento (FC) para carnes maturadas por 1, 7 e 14 dias; variáveis endócrinas (cortisol e ACTH) para avaliar níveis hormonais nos animais durante o confinamento e no momento do abate; e características metabólicas do músculo (glicogênio e lactato) estão apresentadas na Tabela 3.4. Algumas carcaças apresentaram uma tendência a condição de carne DFD (*dark, firm and dry*), com valores de pH 24 horas maiores que 5,8, valores de L^* , a^* e b^* baixos, pouco conteúdo de glicogênio muscular e uma baixa perda de água por cozimento. Os valores de força de cisalhamento diminuíram com o tempo de

maturação como esperado, porém algumas carnes apresentaram altos valores de força de cisalhamento sugerindo uma diminuição de maciez.

Níveis hormonais, utilizados como indicadores fisiológicos de estresse, apresentaram-se variáveis, contudo as médias para ambos os hormônios foram próximas nas condições *ante-* e *post-mortem*.

Tabela 3.4. Número de observações (N), Média (MED), desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimo (MIN) e máximo (MAX) para as características avaliadas

Variável ¹	N	MED	DP	CV	MIN	MAX
pH 1 hora	240	6,62	0,23	3,50	5,50	7,41
pH 24 horas	241	5,61	0,26	4,72	5,01	6,70
L* 1 dia	240	31,84	7,31	22,96	12,36	44,52
L* 7 dias	241	34,89	5,21	14,94	11,80	46,20
L* 14 dias	223	34,06	6,66	19,55	19,25	46,01
a* 1 dia	240	18,62	4,14	22,23	10,37	29,10
a* 7 dias	241	16,33	3,27	20,01	9,33	26,99
a* 14 dias	223	17,91	4,07	22,71	9,17	28,38
b* 1 dia	240	15,30	4,17	27,25	5,95	23,37
b* 7 dias	241	15,21	3,39	22,26	7,07	24,46
b* 14 dias	223	15,55	3,39	21,81	6,71	27,37
PC (%) 1 dia	235	23,52	4,93	20,95	1,22	42,34
PC (%) 7 dias	233	24,81	4,77	19,24	12,51	43,84
PC (%) 14 dias	240	24,31	4,15	17,06	12,27	41,44
FC (kgf) 1 dia	241	9,18	2,12	23,10	2,97	15,65
FC (kgf) 7 dias	241	7,86	1,78	22,71	3,60	13,88
FC (kgf) 14 dias	241	6,47	1,63	25,24	3,50	13,23
Glicogênio (µmol/g)	240	15,94	6,71	42,09	1,71	72,51
Lactato (µmol/g)	240	15,47	7,95	51,40	1,54	49,53
ACTH AM (pg/mL)	237	16,09	14,73	91,53	0,58	79,99
ACTH PM (pg/mL)	238	10,17	10,71	105,31	0,58	87,19
Cortisol AM (µg/dL)	240	4,34	2,33	53,61	1,00	18,57
Cortisol PM (µg/dL)	240	6,35	2,57	40,49	1,32	13,91

¹ pH 1 hora e 24 horas = pH intramuscular mensurado a 1 hora e 24 horas *post-mortem*; L* a* b* mensurações de cor realizadas nos bifes no 1º, 7º e 14º dia de maturação; PC = perdas por cozimento mensurada nos bifes no 1º, 7º e 14º dia de maturação; FC = força de cisalhamento no 1º, 7º e 14º dia de maturação; ACTH AM e Cortisol AM = concentração desses hormônios determinadas em amostras de sangue coletadas dos animais no confinamento (*ante-mortem*); ACTH PM e Cortisol PM = concentração desses hormônios determinadas em amostras de sangue coletadas no momento da sangria no abate (*post-mortem*).

3.3.4 Análises de associação

As associações significativas determinadas entre os polimorfismos e as características de qualidade da carne, mensurações hormonais e metabólicas estão demonstradas nas Tabelas 3.5 e 3.6.

Para os marcadores relacionados ao receptor glicocorticoide (*NR3C1_1* e *NR3C1_2*), foram verificadas associações significativas entre *NR3C1_1* e o valor de cortisol determinado *post-mortem* ($P=0,001$). O alelo G aumenta $1,48\pm0,43$ $\mu\text{g/dL}$ o nível de cortisol plasmático. O marcador *NR3C1_2* teve efeito aditivo com pH determinado a 1 hora *post-mortem* ($P=0,026$). O efeito do genótipo TT foi $+0,87\pm0,39$ unidades de pH 1 hora *post-mortem* em relação ao genótipo CC.

Os SNPs no gene do receptor mineralocorticoide influenciaram principalmente a concentração de glicogênio muscular e ACTH plasmático *post-mortem*. Os resultados indicaram que há uma associação significativa entre os polimorfismos *NR3C2_1* e *NR3C2_2* e valores de ACTH *post-mortem* ($P=0,015$ e $P=0,012$) e conteúdo de glicogênio muscular ($P=0,022$ e $P=0,011$). A substituição do alelo C pelo T, para *NR3C2_1*, aumenta em média, o glicogênio no músculo em $1,57\pm0,68$ $\mu\text{mol/g}$ de tecido para cada alelo presente. Para *NR3C2_2*, a cada alelo T que o animal possui, observa-se aumento de $1,77\pm0,68$ $\mu\text{mol/g}$ de tecido de glicogênio no músculo. O alelo C no *NR3C2_1* e *NR3C2_2* diminuem a concentração de ACTH plasmático em $3,09\pm1,26$ pg/mL e $3,24\pm1,28$ pg/mL , respectivamente. Para o polimorfismo *NR3C2_3* foi encontrado efeito aditivo e efeito de dominância com cor a^* do músculo LD determinado aos 7 dias *post-mortem* ($P = 0,011$ e $P = 0,031$). O efeito do genótipo AA foi $-6,16\pm2,40$ na cor a^* do músculo LD a 7 dias *post-mortem* em relação ao genótipo GG.

Não foram evidenciadas associações significativas ($P>0,05$) entre as demais variáveis avaliadas e os genótipos dos polimorfismos relacionados ao GR e MR.

Tabela 3.5. Estimativa dos efeitos aditivos (α), efeitos de dominância (δ), e efeitos de substituições gênicas (β_{1i}) e erro padrão (EP) para as características significativas segundo os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no gene do receptor glicocorticoide (GR)

Variável ¹	Efeito Aditivo			Efeito de Dominância			Efeito de Substituição		
	Estimativa	EP	Pr > t	Estimativa	EP	Pr > t	Estimativa	EP	Pr > t
NR3C1_1									
Cortisol PM $\mu\text{g/dL}$	-	-	-	-	-	-	1,482	0,432	0,001
NR3C1_2									
pH 1 hora	0,868	0,387	0,026	-0,456	0,237	0,056	0,303	0,182	0,098

¹ Cortisol PM = concentração de cortisol determinada em amostras de sangue coletadas no momento da sangria no abate (*post-mortem*); pH 1 hora = pH intramuscular mensurado a 1 hora *post-mortem*.

Tabela 3.6. Estimativa dos efeitos aditivos (α), efeitos de dominância (δ), e efeitos de substituições gênicas (β_{1i}) e erro padrão (EP) para as características significativas segundo os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) no gene do receptor mineralocorticoide (MR)

Variável ¹	Efeito Aditivo			Efeito de Dominância			Efeito de Substituição		
	Estimativa	EP	Pr > t	Estimativa	EP	Pr > t	Estimativa	EP	Pr > t
NR3C2_1									
ACTH PM pg/mL	-4,810	3,189	0,133	1,292	1,848	0,485	3,090	1,257	0,015
Glicogênio $\mu\text{mol/g}$	-5,075	1,734	0,004	-1,790	1,008	0,077	1,570	0,678	0,022
NR3C2_2									
ACTH PM pg/mL	6,022	3,366	0,075	0,414	1,958	0,833	3,241	1,282	0,012
Glicogênio $\mu\text{mol/g}$	6,578	1,810	0,000	-2,675	1,055	0,012	1,767	0,686	0,011
NR3C2_3									
a* 7 dias	-6,157	2,398	0,011	2,782	1,279	0,031	-0,634	0,454	0,164

¹ ACTH PM = concentração do hormônio adrenocorticotrófico determinada em amostras de sangue coletadas no momento da sangria no abate (*post-mortem*); a* 7 dias = intensidade de vermelho na carne mensurada no bife no 7º dia de maturação.

3.4 Discussão

Este é o primeiro trabalho que buscou avaliar a variabilidade da resposta ao estresse e as implicações com características de qualidade da carne de bovinos, por meio de polimorfismos na sequência de DNA em receptores dos genes MR e GR envolvidos na ativação do eixo HPA em bovinos.

Dois polimorfismos no gene do GR (*NR3C1_1* g.3293A>G e *NR3C1_2* g.3982 T>C) foram identificados, sendo um associado ao nível de cortisol *post-mortem* e outro com pH da carcaça determinada a 1 hora *post-mortem*. Portadores do alelo G para o *NR3C1_1* g.3293A>G apresentaram valores de cortisol plasmático maiores após o abate, sugerindo que animais GG são mais sensíveis à ativação do eixo HPA. Esses resultados estão em concordância com Muráni et al. (2010), os quais avaliaram em suínos polimorfismo em GR. Esses autores encontraram associação significativa com a concentração de cortisol plasmático e peso da adrenal. Adicionalmente, polimorfismos no GR em humanos vêm sendo estudados e revelaram associação com a reatividade do eixo HPA (DE RIJK, 2009). Os portadores do polimorfismo ER22/23EK tiveram maiores níveis de cortisol após teste de supressão com dexametasona (VAN ROSSUM; LAMBERTS, 2004), indicando que esse alelo influencia na capacidade de transativação do GR (RUSSCHER et al., 2005).

Outros polimorfismos ainda em GR (N363S e *BclI*) foram associados com maior sensibilidade aos glicocorticoides (VAN ROSSUM et al., 2003; VAN ROSSUM; LAMBERTS, 2004). O N363S aumenta a capacidade de transativação do GR (RUSSCHER et al., 2005) e o *BclI* diminui o nível de cortisol nos portadores do alelo G (KUNINGAS et al., 2007).

Recentemente, Cafe et al. (2011) demonstraram, em novilhos Brahman, que o temperamento e a atividade do eixo HPA estão relacionados e juntos, influenciam características de crescimento, eficiência, carcaça e de qualidade da carne.

Por outro lado, Mormède et al. (2011) destacam que altos níveis de cortisol têm efeitos negativos na taxa de crescimento e eficiência alimentar em animais de produção, mas que, o cortisol também tem seu aspecto positivo em características relacionadas a respostas adaptativas.

No gene do MR foram identificados três polimorfismos (*NR3C2_1* g.115T>C; *NR3C2_2* g.570 T>C e *NR3C2_3* g.819 G>A), os quais foram associados com o conteúdo de glicogênio muscular, nível de ACTH plasmático *post-mortem* e cor da carne a* aos 7 dias de maturação.

Reações comportamentais e fisiológicas no abate influenciam o metabolismo do músculo *ante-* e *post-mortem* e, conseqüentemente, a qualidade sensorial da carne (TERLOUW; RYBARCZYK, 2008). Segundo Ferguson e Warner (2008), quando o animal é submetido ao estresse durante a fase pré-abate, ao ser abatido, ativa o sistema neuroendócrino, liberando catecolaminas e glicocorticoides. As catecolaminas estimulam a glicogenólise, levando a mobilização dos estoques de glicogênio muscular e hepático, junto com o aumento da glicose sanguínea e concentrações de lactato. Como o efeito das catecolaminas é rápido, o cortisol atua secundariamente intensificando esses efeitos. A excessiva glicogenólise *ante-mortem* prejudica o processo de transformação do músculo em carne, uma vez que o suplemento de energia para glicólise anaeróbica, após a morte do animal, estaria reduzido. O efeito deste processo é bem relatado em vários atributos importantes de qualidade da carne, como pH 24h, maciez, potencial de maturação, cor e capacidade de retenção de água.

A cor da carne é altamente influenciada pelo pH, sendo que os valores de a* e b* são mais correlacionados com pH do músculo do que os valores de L*. Page et al. (2001) relataram que valores altos de pH no músculo favoreceriam fortemente a ligação de proteínas à água, diminuindo a quantidade de água livre para refletir luz. Então, a carne terá cor mais escura caracterizando o “*dark cutting*”.

Nesse trabalho, os SNPs identificados no MR e associados com o conteúdo de glicogênio muscular e cor da carne a* aos 7 dias de maturação, demonstram os efeitos metabólicos do cortisol em atributos relacionados a qualidade da carne. Por outro lado, o SNP identificado no GR associado ao nível de cortisol plasmático demonstra estar mais associado à reatividade do eixo HPA. A relação do SNP em GR com os valores de pH 1 hora *post-mortem* refletem os efeitos do cortisol no glicogênio muscular.

Alguns resultados sugerem que polimorfismos em MR e GR não estão somente associados com as diferenças na sensibilidade a glicocorticoides, mas também associados ao desenvolvimento de fenótipos metabólicos. Os efeitos de

polimorfismos no gene do GR associado com parâmetros metabólicos e composição corporal foram relatados na literatura. Os portadores do polimorfismo N363S têm uma tendência para baixa densidade mineral óssea e aumento do índice de massa corporal (IMC), enquanto portadores do polimorfismo *BclI* apresentaram aumento da obesidade abdominal e baixo IMC. Portadores do polimorfismo ER22/23EK tiveram menores níveis de colesterol total e de lipoproteína de baixa densidade-colesterol (LDL); e mais massa muscular (VAN ROSSUM; LAMBERTS, 2004).

Fernandes-Rosa et al. (2010) sugeriram que polimorfismos em MR devem estar associados ao desenvolvimento do fenótipo metabólico. Esses autores testaram uma variação comum no gene do MR (I180V) com marcadores antropométricos e bioquímicos de risco cardiometabólico e demonstraram uma associação significativa com o aumento do IMC e LDL-colesterol em indivíduos hipertensos. O papel do MR no desenvolvimento da obesidade e complicações metabólicas foi descrito por Caprio et al. (2007), relatando uma função essencial do MR na mediação da adipogênese induzida pelos glicocorticoides. De acordo com Marzolla et al. (2012), o MR está envolvido na promoção da diferenciação e proliferação celular dos adipócitos marrons e, em adipócitos brancos na proliferação celular, diferenciação e inflamação. Os efeitos do cortisol sobre a diferenciação do tecido adiposo são provavelmente mediados por MR e GR. A ativação do GR pelo cortisol diretamente inicia a cascata transcricional conduzindo a diferenciação de adipócitos, e caracteriza-se pelo acúmulo de triglicerídeos, expressão da lipoproteína lipase e aumento da atividade enzimática da glicerol-3-fosfato desidrogenase. A ativação do MR parece similar a do GR, mas ainda não foi esclarecida (ZENNARO; CAPRIO; FÈVE, 2009).

Portanto, polimorfismos no gene do GR e MR podem levar à desregulação da atividade do eixo HPA, resultando na sensibilidade de músculo, gordura e/ou fígado aos glicocorticoides. O efeito do aumento dos glicocorticoides nesses tecidos pode influenciar o perfil metabólico (CHROUSOS; KINO, 2009).

Em humanos, polimorfismos no gene do MR foram relatados estarem associados a mudanças no nível de cortisol (DE RIJK et al., 2006; KUNINGAS et al., 2007). Os portadores do polimorfismo MRI180V demonstraram maiores níveis de cortisol plasmático e salivar e, um aumento na taxa cardíaca em resposta a um teste de estresse social em relação a não portadores (DE RIJK et al., 2006). Para o SNP

215G/C, os portadores do alelo C possuem menores níveis de cortisol plasmático (KUNINGAS et al., 2007).

Nesse estudo fora verificado associação de polimorfismo no MR com o nível de ACTH *post-mortem*. Entretanto, sabe-se que os MRs parecem controlar a atividade do eixo HPA determinando o início da ativação do sistema do estresse (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005), e o ACTH é o precursor da secreção do cortisol.

Os resultados refletem o envolvimento dos hormônios glicocorticoides nos processos fisiológicos relacionados ao metabolismo de energia, bem como, que variabilidade nos receptores centrais do eixo HPA influenciam nos níveis hormonais circulantes, podendo afetar diversas características do músculo.

3.5 Conclusão

O presente resultado evidencia que polimorfismos em genes do GR e MR estão relacionados com mudanças na atividade do eixo HPA e perfil metabólico em bovinos, podendo levar a variações individuais em características de qualidade de carne. Embora, poucos estudos foram realizados com animal de produção, esses genes controlam várias funções e parecem ser interessantes para o entendimento da complexidade das características de qualidade de carne. Além disso, MR e GR devem ser alvos para estudos em sistemas de produção para melhorar produtividade. Mais estudos genômicos globais são necessários para um melhor entendimento do envolvimento desses receptores no perfil metabólico.

Referências

APPLE, J.K et al. Effects of restraint and isolation stress and epidural blockade on endocrine and blood metabolic status, muscle glycogen metabolism, and incidence of dark-cutting longissimus muscle of sheep. **Journal of Animal Science**, v.73, p.2295-2307, 1995.

ARAI, K. et al. Functional polymorphisms in the mineralocorticoid receptor and amiloride-sensitive sodium channel genes in a patient with sporadic pseudohypoaldosteronism. **Human Genetics**, v.112, p.91-97, 2003.

BRASIL (2000). Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, **Regulamento Técnico de Métodos de Insensibilização para o abate humanitário de animais de açougue**. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento.

CAFE, L.M. et al. Cattle temperament: Persistence of assessments and associations with productivity, efficiency, carcass and meat quality traits. **Journal of Animal Science**, v.89, p.1452-1465, 2011.

CAPRIO, M. et al Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis. **The FASEB Journal**, v.21, p.2185-2194, 2007.

CIE. **Recommendations on uniform color spaces - color difference equations, Psychometric Color Terms**. Commission Internationale de l'Eclairage, Paris Supplement No. 2 to CIE Publication No. 15 (E-1.3.1)1978, 1971/(TC-1-1), 1976.

CHROUSOS, G.P.; KINO, T. Glucocorticoid Signaling in the Cell – Expanding Clinical Implication to Complex Human Behavioral and Somatic Disorders. **Annals of the New York Academy of Science**, v.1179, p.153-166, 2009.

DE KLOET, E.R. Brain corticosteroid receptor balance and homeostatic control. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.12, p.95–164, 1991.

DE KLOET, E.R.; JOËLS, M.; HOLLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Neuroscience**, v.6, p.463-475, 2005.

DE RIJK, R.H.; DE KLOET, E.R. Corticosteroid receptor genetic polymorphism and stress responsivity. **Endocrine**, v.28, p.263–269, 2005.

DE RIJK, R.H. et al. Common Polymorphism in the Mineralocorticoid Receptor Modulates Stress Responsiveness. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.91, p.5083-5089, 2006.

DE RIJK, R.H. Single Nucleotide Polymorphisms Related to HPA Axis Reactivity. **Neuroimmunomodulation**, v.16, p.340-352, 2009.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequence traces using Phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v.8, p.186-194, 1998.

FERNANDES-ROSA, F.L. et al. Mineralocorticoid receptor p.I180V polymorphism: Association with body mass index and LDL-cholesterol levels. **Journal of Endocrinological Investigation**, v.33, p.472-477, 2010.

FERGUSON, D.M.; WARNER R.D. Have we underestimated the impact of pre-slaughter stress on meat quality in ruminants? **Meat Science**, v.80, p.12-19, 2008.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v.8, p.195-202, 1998.

KUNINGAS, M. et al. Mental performance in old age dependent on cortisol genetic variance in the mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. **Neuropsychopharmacology**, v.32, p.1295-1301, 2007.

MANTEUFFEL, G. Central nervous regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and its impact on fertility, immunity, metabolism and animal welfare – a review. **Archives Animal Breeding**, v.45, p.575-595, 2002.

MARZOLLA, V. et al. The role of the mineralocorticoid receptor in adipocyte biology and fat metabolism. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.350, p.281-288, 2012.

MCEWEN, B.S.; DE KLOET, E.R.; ROSTENE, W. Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. **Physiological Reviews**, v.66, p.1121–1188, 1986.

MINTON, J.E. Function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the sympathetic nervous system in models of acute stress in domestic farm animals. **Journal of Animal Science**, v.72, p.1891-1898, 1994.

MORMÈDE, P. et al. Breeding for robustness: the role of cortisol. **Animal**, v.5, p.651-657, 2011.

MOUNIER, L. et al. Variations in meat pH of beef bulls in relation to conditions of transfer to slaughter and previous history of the animals. **Journal of Animal Science**, v.84, p.1567-1576, 2006.

MUHTZ, C. et al. Association of a common mineralocorticoid receptor gene polymorphism with salivary cortisol in healthy adults. **Psychoneuroendocrinology**, v.36, p.298-301, 2011.

MURÁNI, E. et al. Association of hpa axis-related genetic variation with stress reactivity and aggressive behavior in pigs. **BMC Genetics**, v.11, p.74-84, 2010.

OLERUP, O.; ZETTERQUIST, H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSCP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient, matching in cadaveric transplantation. **Tissue Antigens**, v.39, p.225-235, 1992.

PAGE, J.K.; WULF, D.M.; SCHWOTZER, T.R. A survey of beef muscle color and pH. **Journal of Animal Science**, v.79, p.678-687, 2001.

RAMOS, E.M.; GOMIDE, L.A.M **Avaliação da Qualidade de Carnes: Fundamentos e Metodologias**. Viçosa-MG:UFV, 2007.

RUSSCHER, H. et al. Two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene directly affect glucocorticoid-regulated gene expression. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.90, p.5804-5810, 2005.

TERLOUW, E.M.C.; RYBARCZYK, P. Explaining and predicting differences in meat quality through stress reactions at slaughter: The case of Large White and Duroc pigs. **Meat Science**, v.79, p.795-805, 2008.

VAN ROSSUM, E.F. et al. A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene, which decreases sensitivity to glucocorticoids in vivo, is associated with low insulin and cholesterol levels. **Diabetes**, v.51, p.3128-3134, 2002.

VAN ROSSUM, E.F.C. et al. Identification of the BclI polymorphism in the glucocorticoid receptor gene: association with sensitivity to glucocorticoids in vivo and body mass index. **Clinical Endocrinology**, v.59, p.585-592, 2003.

VAN ROSSUM, E.F.; LAMBERTS, S.W. Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and their associations with metabolic parameters and body composition. **Recent Progress in Hormone Research**, v.59, p.333-357, 2004.

ZENNARO, M.-C.; CAPRIO, M.; FÈVE, B. Mineralocorticoid receptors in the metabolic syndrome. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v.20, p.444-451, 2009.

4 ANÁLISE PROTEÔMICA DO EFEITO DE POLIMORFISMOS EM GENES DO EIXO HIPOTÁLAMO-PITUITÁRIA-ADRENAL NA CARNE BOVINA

Resumo

Os receptores glicocorticoides (GR) e mineralocorticoides (MR) são essenciais na coordenação da resposta ao estresse do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, devido à suas intrínsecas relações às respostas do cortisol para restabelecer a homeostase. Mutações no gene desses receptores têm implicado em alterações na atividade do eixo e resultando em mudanças em diversas funções do organismo. Nesse estudo, a análise proteômica funcional foi utilizada como ferramenta para promover maior compreensão sobre o efeito de dois polimorfismos de nucleotídeo único (SNP), o NR3C2_1 no gene do MR e NR3C1_1 no gene do GR, sobre o perfil proteico da carne bovina. Foram avaliados músculos *Longissimus dorsi* de bovinos Nelore homozigotos e heterozigotos para os SNPs coletados a 24 horas e 14 dias *post-mortem*. As proteínas foram separadas por técnica de eletroforese bi-dimensional e identificadas por MALDI TOF/TOF MS/MS. Dez proteínas foram alteradas pelos polimorfismos em amostras 24 horas e dezenove em amostras de 14 dias. Quatro proteínas dentro de cada tempo foram alteradas pela interação da combinação de genótipo entre MR e GR. A maioria das proteínas foi alterada pelo SNP em MR. Entre as identificações estão proteínas envolvidas na contração muscular, metabolismo, defesa celular e outras. Os resultados sugerem que os MR e GR estão envolvidos em diversas funções, podendo ser alvos de estudos que visam entender a complexidade da conversão do músculo em carne.

Palavras chave: eletroforese em gel bi-dimensional; estresse; receptor glicocorticoide; receptor mineralocorticoide; polimorfismo de único nucleotídeo

Abstract

The glucocorticoids receptors (GR) and mineralocorticoids receptors (MR) are essential in the coordination of responses to stress of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, due to its intrinsic relations of the cortisol responses to restore homeostasis. Mutations in these receptors genes have been implicated in changes in axis activity and resulting in organism alterations in many functions. In this study, the functional proteomic analysis was used as a tool to promote more comprehension of the effect of two single nucleotide polymorphisms (SNP), the NR3C2_1 in MR and NR3C1_1 in GR, on the protein profile of bovine meat. *Longissimus dorsi* muscle was analyzed from homozygotes and heterozygotes Nellore cattle for SNPs collected 24 hours and 14 days *post-mortem*. Proteins were separated by two-dimensional electrophoresis technique and identified by MALDI TOF/TOF MS/MS. Ten proteins were significantly altered by polymorphisms in 24 hours samples and nineteen in 14 day samples. Four proteins, within each time, were changed by the interaction between genotype combination of MR and GR. The most proteins were altered by SNP in MR. Among the identifications are proteins involved in muscle contraction, metabolism, cellular defense and others. The results suggest that the GR and MR are involved in various functions, which may be targets for studies aimed at understanding the complexity of the conversion of muscle in meat.

Keywords: glucocorticoid receptor; mineralocorticoid receptor; single nucleotide polymorphisms; stress; two-dimensional gel electrophoresis

4.1 Introdução

A conversão do músculo em carne é um processo complexo. Diversas características biológicas da vida do animal como genética, bioquímica, fisiologia, nutrição, saúde, combinam-se para afetar a estrutura e a integridade do músculo (BENDIXEN, 2005; PAREDI et al., 2012). O processo se torna ainda mais complexo em relação às características de qualidade da carne, pois além desses fatores, também estão inclusos os sistemas de criação e o manuseio *post-mortem* (D'ALESSANDRO; ZOLLA, 2012).

O efeito do estresse pré-abate sobre o pH do músculo *post-mortem* e na qualidade da carne está bem relatado na literatura (FERGUSON; WARNER, 2008). O estresse promove a diminuição das reservas de glicogênio no músculo e, conseqüentemente, leva a alterações na carne, como a condição DFD (*dark, firm and dry*) (APPLE et al., 1995; LAHUCKY et al., 1998; IMMONEN et al., 2000).

O principal eixo regulatório do estresse é o Hipotálamo-Pituitária Adrenal (HPA), o qual inicia e termina as reações a fim de restabelecer a homeostase. O cortisol é o principal hormônio desse eixo e tem influência sobre a glicogenólise muscular (MCEWEN; DE KLOET; ROSTENE, 1986; DE KLOET, 1991; FERGUSON; WARNER, 2008).

A ação desse hormônio é regulada por dois receptores, o receptor mineralocorticoide (MR) e glicocorticoide (GR), os quais estão localizados no citoplasma celular e atuam sobre a transcrição de alguns genes (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005). Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) presentes nesses receptores demonstraram afetar a funcionalidade dos mesmos e influenciar em rotas metabólicas (DE RIJK, 2009). Trabalho prévio do nosso grupo avaliou a associação de polimorfismos no gene do GR e MR com características endócrinas, metabólicas e de qualidade da carne e, verificou-se que o SNP NR3C1_1 g.3293A>G (ss528103353) em GR está associado com níveis de cortisol plasmático *post-mortem* e o SNP NR3C2_1 g.115 T>C (ss528103346) em MR foi associado com níveis de ACTH plasmático *post-mortem* e conteúdo de glicogênio muscular (dados não publicados).

Diversos trabalhos de investigação proteômica vêm relatando as mudanças que ocorrem no músculo *post-mortem* visando uma melhor compreensão do

processo de amaciamento na carne (LAMETSCH; BENDIXEN, 2001; LAMETSCH; ROEPSTORFF, BENDIXEN, 2002; HWANG et al., 2005; JIA et al., 2006, 2007). Contudo, nenhum trabalho relata a influência de genótipos sobre as características de qualidade da carne. Estudos pioneiros do nosso grupo avaliaram a influência de genótipos contrastantes para calpaína e calpastatina no perfil de expressão proteica durante o período de maturação da carne (MONCAU, 2012; SILVA, 2012).

Nesse contexto, a proteômica surge como uma ferramenta complementar ao genoma, permitindo sua caracterização e possibilitando entender como as informações do genoma são traduzidas e direcionando-nos para um produto de melhor qualidade e uma produção animal mais sustentável (BENDIXEN, 2005). Assim, o presente trabalho insere-se buscando avaliar os efeitos traducionais de polimorfismos relacionados ao eixo do estresse. Mais especificamente, avaliar as possíveis implicações dos polimorfismos NR3C1_1 g.3293A>G (ss528103353) no gene do GR e NR3C2_1 g.115 T>C (ss528103346) no gene do MR no perfil proteico do músculo bovino às 24 horas *post-mortem* e 14 dias de maturação.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Amostras de músculo para proteômica

Foram utilizadas amostras de músculo *Longissimus dorsi* (LD) de bovinos da raça Nelore, homozigotos e heterozigotos para o SNP presente no gene do receptor glicocorticoide (NR3C1_1 g.3293A>G; ss528103353) e SNP presente no gene do receptor mineralocorticoide (NR3C2_1 g.115 T>C; ss528103346). Ambos SNPs resultam em mutações não sinônimas e estão associadas com alterações de níveis hormonais de cortisol e características de qualidade da carne, respectivamente.

Foram utilizados no experimento 27 animais criados a pasto e terminados em confinamento, ou seja, cinco animais por combinação genotípica, exceto para uma combinação genotípica, a qual foi encontrada apenas dois animais (Tabela 4.1).

Os animais foram alimentados com dietas de alto concentrado (85%), composto por milho, farelo de soja, casca de soja, glúten de milho, sal mineral e ureia, contendo 14,6% de proteína bruta e 74,5% de NDT. A fonte de volumoso utilizada foi o bagaço de cana de açúcar (15%).

No final do experimento, os animais foram transportados por 200 metros até o abatedouro em caminhão boiadeiro, atordoados e abatidos seguindo a regulamentação técnica dos métodos de atordoamento para abate humanitário (BRASIL, 2000). O abate foi realizado em animais com idade média de $24 \pm 1,2$ meses e peso médio de 508 ± 39 kg. Após o abate, carcaças foram armazenadas a 4°C durante a noite.

As amostras foram coletadas em dois tempos diferentes. Uma amostra de músculo coletada 24 horas após a morte do animal, e a outra amostra coletada de um bife de 2,5 cm retirado a 24 h *post-mortem*, embalado a vácuo e maturado por 14 dias em câmara fria a $2-4^{\circ}\text{C}$. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C até a realização das extrações de proteínas.

Tabela 4.1. Número de indivíduos (N) distribuídos nas diferentes combinações de genótipos entre os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) nos genes dos receptores glicocorticoides (GR) e mineralocorticoide (MR)

SNP	Genótipos	GR NR3C1_1 g.3293A>G	
		AA (N)	GA (N)
MR NR3C2_1 g.115 T>C	CC	Pool 1 (5)	Pool 4 (5)
	TC	Pool 2 (5)	Pool 5 (5)
	TT	Pool 3 (5)	Pool 6 (2)

4.2.2 Determinações das características fenotípicas

Foram coletadas características fenotípicas de pH da carcaça 24 horas, mensurações de conteúdo de glicogênio e lactato muscular *post-mortem* e determinações de níveis hormonais de cortisol e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) *ante* e *post-mortem*.

Para análise dos níveis de cortisol e ACTH, duas amostras de sangue foram coletadas em tubos heparinizados, sendo uma através de punção na veia jugular no início do confinamento (*ante-mortem*) e outra no abate durante a exsanguinação (*post-mortem*). Tubos foram mantidos no gelo até centrifugação e alíquotas de plasma foram congeladas a -20°C até as análises. Os níveis de cortisol e ACTH foram mensurados com o uso de *kits* imunoenzimáticos viáveis comercialmente

(*Cortisol Accu Bind*, Monobind Inc., Lake Forest, CA, USA e *ACTH ELISA*, Bioamerica Inc., Irvine, CA, USA).

O conteúdo de glicogênio e lactato muscular foram determinados a partir de amostra de músculo *Longissimus dorsi* (LD) retirado da carcaça aproximadamente 30 min após a morte do animal e congelado em nitrogênio líquido. Amostras de tecido muscular foram preparadas usando o método descrito por Ramos e Gomide (2007) e os metabólitos determinados espectrofotometricamente com o *kit* de Análise de Lactato EnzyChrom™ (*BioAssay Systems, Hayward, USA*) e Análise de Glicogênio EnzyChrom™ (*BioAssay Systems, Hayward, USA*).

O pH das carcaças foi determinado pela inserção de um eletrodo de vidro diretamente dentro de cada meia-carcaça esquerda na região da 12ª costela as 24 horas *post-mortem*.

4.2.3 Extração de proteínas do músculo

A preparação da amostra foi baseada nas metodologias propostas por Lametsch et al. (2003) e Bouley, Chambon e Picard (2004). Amostras de músculo congelado dos animais pertencentes ao mesmo grupo genético foram picotadas com uma tesoura e misturadas. Dessa mistura, pesou-se 0,5g e homogeneizou com um homogeneizador *Turratrec (TE-102, Tecnal)* em tampão de lise contendo 8 M Urea, 2 M Tiourea, 1% Ditioneitol (DTT), 2% CHAPS, 2% tampão de IPG pH 4-7. Em seguida, os extratos foram vigorosamente agitados por 30 min no gelo e, centrifugados a 10.000 x *g* por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi armazenado e, posteriormente, utilizado para determinação da concentração de proteína total com o *kit PlusOne 2-D Quant (GE Healthcare)*.

4.2.4 Eletroforese bi-dimensional (2-DE)

Para a primeira dimensão, tiras de IPG de 13 cm com gradiente imobilizado de pH 4-7 foram reidratadas por 14 horas com uma alíquota de 500 µg de proteína extraído do músculo, solubilizada no volume final de 250 µl de uma solução de reidratação (*“DeStreak”* : 7 M Uréia, 2 M Tiouréia, 2% CHAPS, 0,002% azul de bromofenol – *Amersham Bioscience*) acrescida de 0,5% de tampão de IPG pH 4-7 e

1% inibidores de protease (*Amersham Bioscience*). A reidratação das tiras foi passiva e a temperatura ambiente dentro do IPG Box (*GE Healthcare*).

Posteriormente, as tiras foram submetidas à focalização isoeletrica no aparelho Ettan IPGphor 3 (*GE Healthcare*) a temperatura de 20°C por aproximadamente 5:30 h. O programa constituiu de corrente de 50 μ A/tira e diferentes voltagens. O perfil utilizado de voltagem foi: 500 V por 500 Vh, gradiente 1000 V por 800 Vh, gradiente 8000 V por 11300 Vh e a fase final de 8000 V por 7000 Vh. O produto total de tempo x voltagem foi de 19.603 Vh.

As tiras focalizadas foram equilibradas por 15 min sob leve agitação em tampão de equilíbrio I (6 M Urea, 75 mM Tris-HCl pH 8.8, 29,3% glicerol, 2% SDS, 0,002% azul de bromofenol, 1% DTT) e, subsequentemente, 15 min em tampão de equilíbrio II, o qual era o mesmo tampão do equilíbrio I, porém o DTT foi substituído por 5% Iodoacetamida.

Depois do equilíbrio, as tiras de IPG e o marcador de peso molecular, aplicado em pequenos retângulos de papel de filtro para *blotting*, foram sobrepostos ao gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12,5%). Ambos foram fixados sobre o gel com uma solução selante de agarose (25 mM Tris, 192 mM Glicina, 0,1% SDS, 0,5% agarose e 0,002% azul de bromofenol).

O tampão de corrida utilizado foi de Laemmli (1970) 1x concentrado para o anodo (25 mM Tris, 192 mM Glicina, 0,1% SDS) e 3 x concentrado para o catodo.

As proteínas foram separadas na segunda dimensão utilizando a cuba eletroforética *SE 600 Ruby* (*Amersham Biosciences*) a 15 mA/gel, 100 V por 30 min e posteriormente, 50 mA/gel, 600 V por aproximadamente 3h ou até o corante sair do gel. A corrida foi mantida a 10°C com um banho-maria termostático circulador (*MultiTemp 3, GE Healthcare*).

4.2.5 Visualização das proteínas

Ao final da corrida, os géis foram corados com o procedimento de coloração de Coomassie G-250 *Colloidal*, o qual consiste primeiramente numa etapa de fixação das proteínas no gel em 40% etanol e 10% ácido acético por 30 min e, posteriormente, na coloração com solução corante (8% sulfato de amônio, 0,8% ácido fosfórico, 0,08% de azul de coomassie G-250, 20% Metanol) *overnight*. Para

visualização dos *spots* o excesso do corante foi retirado por meio de lavagens com água destilada. Os géis foram escaneados no *Image Scanner III (GE Healthcare)* e as imagens armazenadas para posterior análise.

4.2.6 Análise das Imagens

A detecção dos *spots* e quantificação foi realizada no *software Image Master 2D Platinum (GE Healthcare)* automaticamente. Os géis foram realizados em triplicata para possibilitar maior confiança na detecção e posterior validação do *spot*. Assim, para cada amostra e um *spot*, a média de três valores foi calculada. A quantidade de proteína de cada *spot* foi expressa como volume, isto é, a soma da intensidade de pixel dentro do limite do *spot*.

Para avaliar as diferenças na quantidade de cada *spot* foi utilizado o volume relativo (% volume), o qual é um valor normalizado que permanece relativamente independente de variações.

Após a detecção dos *spots* foram realizadas automaticamente análises de comparação (análise de “*Match*”), isto é, avaliar se o *spot* presente em um gel é correspondente em outro gel. Primeiramente, foram sobrepostas e comparadas imagens pertencentes à mesma amostra, e subsequentemente, as imagens de amostras diferentes. Logo em seguida, toda a análise de comparação foi conferida manualmente.

4.2.7 Análises estatísticas

Para avaliar as implicações dos resultados associados à técnica de eletroforese bi-dimensional, em relação aos genótipos contrastantes para os MR e GR, as intensidades dos volumes normalizados obtidos para cada *spot* foram utilizadas como variáveis dependentes.

Para testar os efeitos das combinações genotípicas, considerando dois *loci* simultaneamente, foi adotado o modelo abaixo especificado, para cada tempo de maturação da carne (24 horas e 14 dias *post-mortem*):

$$\text{Modelo: } Y_{ijklm} = \mu + R_i + AP_j + M_k + C_l + MC_{kl} + e_{ijklm}$$

Em que, Y_{ijklm} = é o valor observado para as intensidades dos volumes de expressão normalizados dos *spots* obtidos pela técnica de eletroforese bi-dimensional; μ = é uma constante inerente a todas as observações; R_i = efeito aleatório do reprodutor i associado à característica com média 0 e variância σ^2_R ; AP_j = efeito fixo do ano-período de abate j , com $j=1(2009-1)$, $2(2009-2)$, $3(2009-3)$, $4(2009-4)$, ..., $12(2011-4)$; M_k = é o efeito fixo do genótipo k para marcador MR; C_l = é o efeito fixo do genótipo l para marcador GR; MC_{kl} = é o efeito da interação do genótipo k para marcador MR com o genótipo l para marcador GR; e_{ijklm} = efeito aleatório residual associado à característica Y_{ijklm} , com média 0 e variância σ^2_e .

As análises utilizando os modelos acima descritos foram realizadas com auxílio do procedimento PROC MIXED do programa anteriormente citado.

Em virtude do elevado número de *spots* a serem avaliados, utilizou-se a correção de Bonferroni para controle de nível de significância conjunto em 5%, determinando o valor do nível de significância individual (α), que proporcionaria o nível de significância conjunto (α^*). Como reportado por Silva e Vencovsky (2002), o valor do nível de significância individual (α) que controla o nível de significância conjunto (α^*) pela correção de Bonferroni, pode ser obtido utilizando a seguinte equação:

$$\alpha = -\exp \frac{\ln(1 - \alpha^*)}{t} + 1$$

Em que, t = é o número de testes independentes; α = valor do nível de significância individual a ser utilizado; α^* = valor do nível de significância conjunto desejado.

Para controle de nível de significância conjunto (α^*) em 5%, o valor do nível de significância individual (α), para 278 e 287 testes, foi de 0,0002.

Para avaliação das possíveis relações entre as características endócrinas, metabólicas, pH e as intensidades dos volumes de expressão normalizados obtidos pela eletroforese bi-dimensional, foram utilizadas também análises de regressão por meio do procedimento PROC REG do programa anteriormente citado.

4.2.8 Digestão dos *spots* “*in gel*”

Os *spots* detectados como diferencialmente expressos nas análises estatísticas foram retirados do gel, picotados em fragmentos de aproximadamente 1 mm³ e colocados dentro de microtubos de 1,5 mL.

A digestão foi realizada segundo metodologia descrita por Shevchenko et al (2006). Primeiramente, os *spots* foram descorados com 3 lavagens de 10 min cada usando 200 µl de uma solução de 50% de acetonitrila (ACN) em 25 mM de bicarbonato de amônio pH 8,0 (AMBIC). Em seguida, os fragmentos de gel foram desidratados por 10 min pela adição de 200 µl de 100% ACN. A ACN foi retirada e o resíduo remanescente de gel foi mantido a temperatura ambiente para a evaporação completa. Após, procedeu-se a redução dos fragmentos de gel por 40 min a 56°C com 40 µl de uma solução de 20 mM DTT em 50 mM AMBIC. A solução de DTT foi removida e os fragmentos de gel foram alquilados pela incubação das amostras com 40 µl de 55 mM Iodoacetamida em 50 mM AMBIC por 30 min a temperatura ambiente no escuro. A solução de Iodoacetamida foi removida e os fragmentos de gel foram lavados com 200 µl da solução de 25 mM de AMBIC. Em seguida, procedeu-se duas vezes a desidratação com 100% de ACN, conforme descrito acima.

O próximo passo foi a digestão dos fragmentos de gel. Foram adicionados 15 µL de tripsina em cada amostra na concentração de 20 ng/µl e incubadas por 15 min a 4°C. Em seguida, o excesso de tripsina foi retirado e 40 µl de 50 mM de AMBIC foram adicionados até a cobertura completa dos *spots*. As amostras foram incubadas a 37°C por 14 horas. Após esse período, a ação da tripsina foi interrompida com a adição de 15 µl da solução bloqueadora (5% ácido fórmico em 50% ACN). O sobrenadante da digestão bloqueado foi recuperado em um novo microtubo de 0,6 mL.

Posteriormente a digestão da proteína presente no gel, iniciou-se a etapa de eluição da mesma. Foram realizadas três etapas de eluição, sendo a primeira e a segunda eluição realizada duas vezes cada. Na primeira, 40 µl da solução de eluição I (1% ácido fórmico em 60% Metanol) foram adicionados e as amostras foram incubadas por 15 min a 40°C, com agitação a cada 5 minutos. Na segunda, 40 µl da solução de eluição II (1% ácido fórmico em 50% ACN) foram adicionados e as

amostras foram incubadas por 15 min a 40°C, com agitação a cada 5 minutos. A terceira eluição foi a adição de 40 µl de ACN 100% para desidratar os fragmentos de gel. O sobrenadante foi recuperado em cada etapa da eluição no mesmo tubo que se colocou o sobrenadante da digestão bloqueada. Por fim, o sobrenadante de todas as etapas que estavam juntos foi submetido ao concentrador à vácuo a temperatura ambiente até a secagem completa.

A amostra foi então ressuspensa em 10 µL de ácido trifluoroacético 0,1% e dessalinizada pela passagem em colunas de fase reversa *ZipTip* C18, P10 (*Millipore*), conforme as recomendações do fabricante. Em seguida, a amostra foi seca em concentrador à vácuo.

4.2.9 Identificação das proteínas por MALDI-TOF/TOF MS/MS

Esse procedimento foi realizado no Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ).

As amostras foram ressuspensas em 2 µl de uma solução de 50% Acetonitrila e 0,1% TFA em água ultrapura. Para aplicação na placa utilizou-se 1 µl. A placa foi deixada a temperatura ambiente para secar e sobre cada amostra aplicou-se 1 µl de matriz (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid). Após a secagem da matriz, a identificação das proteínas foi realizada usando o aparelho MALDI-TOF/TOF MS/MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Off Flight Mass Spectrometer* – AB Sciex-5800, Framingham, MA, USA). O espectrômetro de massas foi calibrado com padrões internos utilizando o kit de calibração de massas padrão da ABSciex TOF/TOF (10,2 fmol/µl des-Arg¹-Bradykinin; 13,0 fmol/ µl angiotensina I; 13,0 fmol/ µl Glu¹-fibrinopeptide B e 0,5 fmol/ µl Neurotensin).

Para a obtenção dos espectros MS utilizou-se um intervalo de massa/carga de 800 a 4000 m/z e para o modo MS/MS de 9 a 2500 m/z. Os 5 picos mais abundantes nos espectros de MS foram utilizados como parâmetros de seleção para realização do MS/MS. Os espectros de massas foram obtidos em modo reflector positivo a 400 hz no modo MS e 1000 hz no modo MS/MS. Aplicou-se uma voltagem da fonte de íons de 3400 kvolts no modo MS e 4700 kvolts no modo MS/MS. O programa utilizado para obtenção dos resultados de espectrometria de massa foi o ABSciex MALDI TOF/TOF series Explorer version 4.1.0 (ABSciex, Framingham, MA,

USA) e para análise do conjunto de dados foi o Protein Pilot™ 4.0 (ABSciex, Framingham, MA, USA) usando o sistema de pesquisa MASCOT. As proteínas foram identificadas quando submetidas ao proteoma completo de *Bos taurus*, no banco de dados UniProtKB/Swiss-Prot.

4.3 Resultados

4.3.1 Características fenotípicas

As características relacionadas à qualidade da carne como pH 24 horas, parâmetros endócrinos (cortisol e ACTH), para avaliar níveis hormonais nos animais durante o confinamento e no momento do abate, e metabólitos do músculo (glicogênio e lactato) estão apresentados na Tabela 4.2. Algumas carcaças apresentaram uma tendência a condição de DFD (*dark, firm and dry*), com valores de pH 24 horas maiores que 5,8 e pouco conteúdo de glicogênio muscular. Níveis hormonais utilizados como indicadores fisiológicos de estresse apresentaram-se altamente variável, porém as médias para ambos os hormônios foram próximas nas condições *ante-* e *post-mortem*.

Tabela 4.2. Número de observações (N), Média (MED), desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimo (MIN) e máximo (MAX) para as características avaliadas

Variável ¹	N	MED	DP	CV	MIN	MAX
pH 24h	27	5,46	0,22	4,02	5,20	5,97
Glicogênio (μmol/g)	27	18,20	4,90	26,91	10,74	30,79
Lactato (μmol/g)	27	14,36	6,65	46,27	2,87	27,59
ACTH_AM (pg/mL)	26	15,50	11,87	76,61	2,81	49,67
ACTH_PM (pg/mL)	26	6,76	5,62	83,16	0,59	29,00
Cortisol_AM (μg/dL)	27	4,42	1,88	42,65	1,87	8,98
Cortisol_PM (μg/dL)	27	6,40	2,82	44,07	1,47	13,69

¹ pH 24horas = pH intramuscular mensurado as 24 horas *post-mortem*; ACTH AM e Cortisol AM = concentração desses hormônios determinadas em amostras de sangue coletadas dos animais no confinamento (*ante-mortem*); ACTH PM e Cortisol PM = concentração desses hormônios determinadas em amostras de sangue coletadas no momento da sangria no abate (*post-mortem*).

4.3.2 Análise proteômica

Géis 2-DE foram gerados em triplicata, sendo seis grupos de combinações genóticas, conforme Tabela 4.1, e dois tempos de coleta de amostra, 24 h *post-mortem* e 14 dias de maturação. Foram confeccionados e analisados trinta e seis géis. Em média, 548 *spots* foram detectados com coloração de azul de coomassie nos géis de 24 h e 524 *spots* nos géis de 14 dias.

Todos os *spots* detectados foram usados nas análises de comparação. Entretanto, somente *spots* presentes no mínimo em dois géis por grupo foram levados em consideração nas análises estatísticas, o que revelou 278 *spots* para géis de amostras 24 horas e 287 *spots* para géis de amostras 14 dias.

4.3.2.1 Avaliação dos *spots* em relação aos genótipos

As análises de variância (ANOVA) das intensidades do volume dos *spots* nas amostras de 24 h revelaram 10 *spots* com volumes diferenciados significativamente ($P \leq 0,0002$), sendo: (i) cinco *spots* foram alterados entre os diferentes genótipos para o marcador no gene do receptor mineralocorticoide (MR); (ii) um *spot* alterado entre os genótipos para o marcador no gene do receptor glicocorticoide (GR); e (iii) quatro *spots* alteraram sua intensidade pelo efeito da interação entre genótipos MR x GR.

Para as amostras de 14 dias, as ANOVAs revelaram 19 *spots* com intensidade do volume significativamente alteradas ($P \leq 0,0002$), sendo: (i) 13 *spots* alterados entre os diferentes genótipos para o marcador no gene do MR; (ii) dois *spots* alterados entre os genótipos para o marcador no gene do GR; e (iii) quatro *spots* foram alterados pelo efeito da interação entre genótipos MR x GR.

Esses resultados observados são extremamente relevantes, uma vez que demonstram a influencia dos genótipos do MR e GR sobre a expressão de determinadas proteínas e que algumas proteínas se expressam de maneira independente para cada marcador ou pela interação dos mesmos.

Um gel referência de eletroforese bi-dimensional do perfil proteico do músculo LD bovino realizado com 500 µg de proteína está representado na Figura 4.1, indicando os *spots* que tiveram intensidade do volume significativamente alterados entre os genótipos. As proteínas foram separadas numa faixa de peso molecular

(*Mr*) de 170 a 10 kDa e ponto isoelétrico (*pI*) de 4,0 a 7,0. Observa-se que alguns *spots* foram significativos em ambos os tempos (14/11; 15/13; 77/83; 185/203) de coleta de amostras.

Figura 4.1. Gel referência de eletroforese bi-dimensional (2-DE) de músculo *Longissimus dorsi* bovino. A 2-DE foi realizada usando faixa de pH 4-7 na primeira dimensão e SDS-PAGE (12,5%) na segunda. A quantidade de proteína aplicada foi 500 µg e o gel foi corado usando procedimento de Coomassie coloidal. A calibração de *pI* (ponto isoelétrico) e *Mr* (peso molecular) realizou-se por meio do software *Image Master 2D platinum*. As setas e os números referem-se aos *spots* significativos nas análises, sendo **em preto** os *spots* significativos para géis realizados com amostras coletadas 24 h *post-mortem* e **em vermelho** os *spots* significativos para géis realizados com amostras coletadas com 14 dias de maturação.

Para o SNP presente no gene do MR (NR3C2_1 g.115 T>C; ss528103346) nas amostras 24 horas observou-se que os *spots* 14 e 77 apresentaram maior intensidade do volume no genótipo heterozigoto, ao contrário do *spot* 15. O *spot* 87 apresentou menor intensidade do volume no genótipo CC e o *spot* 198 maior intensidade do volume no genótipo TT (Figura 4.2).

Figura 4.2. Estimativas de médias da intensidade do volume de cada *spot* significativo na análise de variância entre os diferentes genótipos (CC, TC e TT) referente ao marcador NR3C2_1 g.115 T>C (ss528103346), presente no gene do receptor mineralocorticoide (MR). Análise realizada nas amostras de carne coletadas às **24 horas post-mortem**. *Médias no mesmo *spot* e seguidas por uma mesma letra maiúscula não diferem entre si, ao nível de significância conjunta de 5%, pelo teste *t* de Student.

Em amostras de 14 dias, ainda no gene do MR (NR3C2_1 g.115 T>C; ss528103346), 13 *spots* apresentaram diferenças significativas de intensidade do volume. Os *spots* 51, 83, 84, 89, 122, 203 e 253 apresentaram uma intensidade do volume variável entre os genótipos, evidenciando um perfil de tradução específico para cada genótipo. Os *spots* 47, 106, 109 e 115 tiveram maior intensidade do volume em animais heterozigotos. Já, o *spot* 72 teve maior intensidade do volume em homozigotos CC enquanto que o *spot* 88 apresentou menor intensidade nesse grupo genotípico (Figura 4.3).

Figura 4.3. Estimativas de médias da intensidade do volume de cada *spot* significativo na análise de variância entre os diferentes genótipos (CC, TC e TT) referente ao marcador NR3C2_1 g.115 T>C (ss528103346), presente no gene do receptor mineralocorticoide (MR). Análise realizada nas amostras de carne coletadas com **14 dias** de maturação. *Médias no mesmo *spot* e seguidas por uma mesma letra maiúscula não diferem entre si, ao nível de significância conjunta de 5%, pelo teste *t* de Student.

As alterações da intensidade do volume recorrentes do efeito do SNP presente no gene do GR (NR3C1_1 g.3293A>G; ss528103353) foram observadas em poucos *spots*. Somente o *spot* 77 teve sua intensidade do volume alterada nas amostras de 24 horas e os *spots* 108 e 141 nas amostras de 14 dias. Em ambas as amostras o genótipo heterozigoto revelou maior intensidade do volume nos *spots* significativos (Figura 4.4).

Figura 4.4. Estimativas de médias da intensidade do volume de cada *spot* significativo na análise de variância entre os diferentes genótipos (AA e GA) referente ao marcador NR3C1_1 g.3293A>G (ss528103353), presente no gene do receptor glicocorticoide (GR). Análise realizada nas amostras de carne coletadas com **24 horas post-mortem** (A) e amostras de carne coletadas com **14 dias** de maturação (B). *Médias no mesmo *spot* e seguidas por uma mesma letra maiúscula não diferem entre si, ao nível de significância conjunta de 5%, pelo teste *t* de Student.

Em relação ao efeito de interação entre os marcadores observou-se, em ambos os tempos, que quatro *spots* alteram sua intensidade do volume em virtude da combinação genotípica entre MR e GR.

Nas amostras 24 horas (Tabela 4.3), o *spot* 7 apresentou diferenças de intensidade do volume entre todas as combinações genotípicas, consistindo em uma menor intensidade do volume em combinações homozigotas de MR com GR. Porém, dentro do grupo heterozigoto para MR sua intensidade do volume foi maior com o homozigoto para GR.

O *spot* 122 teve sua intensidade do volume alterada dentro dos grupos homozigotos de MR, sendo que para o genótipo CC de MR a intensidade do volume desse *spot* foi maior dentro do grupo heterozigoto para GR e para o genótipo TT sua expressão foi 2,2 vezes maior no genótipo AA de GR. O *spot* 185 apresentou diferenças na intensidade do volume apenas para uma combinação genotípica, o grupo TT de MR teve maior intensidade do volume dentro do genótipo AA de GR. Enfim, para o *spot* 200 o genótipo TT em MR foi o único que não apresentou intensidade do volume diferenciada dentro dos genótipos de GR.

Tabela 4.3. Estimativas de médias (MED) e respectivo erro-padrão (EP) das intensidades do volume dos *spots* significativos para efeito principal da interação entre os marcadores NR3C1_1 g.3293A>G (ss528103353) no GR (receptor glicocorticoide) x NR3C2_1 g.115 T>C (ss528103346) no MR (receptor mineralocorticoide), para as amostras de carne bovina coletadas às 24 horas *post-mortem*

SPOT	MR NR3C2_1 g115 T>C	GR NR3C1_1 g.3293A>G					
		AA			GA		
		MED		EP		MED	
7	CC	1,318	0,035	B	1,532	0,035	A
	TC	1,380	0,043	A	1,119	0,035	B
	TT	1,189	0,035	B	1,677	0,035	A
122	CC	0,144	0,006	B	0,186	0,001	A
	TC	0,169	0,008	A	0,177	0,006	A
	TT	0,169	0,006	A	0,077	0,006	B
185	CC	0,043	0,003	A	0,035	0,003	A
	TC	0,044	0,003	A	0,052	0,003	A
	TT	0,071	0,003	A	0,030	0,003	B
200	CC	0,172	0,022	B	0,411	0,022	A
	TC	0,429	0,027	B	0,629	0,022	A
	TT	0,372	0,022	A	0,336	0,022	A

*Médias na mesma linha e seguidas por uma mesma letra maiúscula não diferem entre si, ao nível de significância conjunta de 5%, pelo teste *t* de Student

Nas amostras de 14 dias (Tabela 4.4), os *spots* 11, 13 e 46 apresentaram diferenças na intensidade do volume apenas em um grupo de combinação genotípica. Os *spots* 11 e 13 tiveram intensidade do volume alterada dentro do genótipo TT em MR, porém o *spot* 11 foi 3,5 vezes mais intenso para o genótipo GA em GR e o *spot* 13 foi 1,9 vezes mais intenso para o genótipo AA em GR. O *spot* 46 teve sua intensidade do volume alterada dentro do genótipo TC em MR e o *spot* 236 apresentou diferenças de intensidade do volume dentro dos genótipos homozigotos em MR, com menor volume dentro do genótipo AA de GR.

Tabela 4.4. Estimativas de médias (MED) e respectivo erro-padrão (EP) das intensidades do volume dos *spots* significativos para efeito principal da interação entre os marcadores NR3C1_1 g.3293A>G (ss528103353) no GR (receptor glicocorticoide) x NR3C2_1 g.115 T>C (ss528103346) no MR (receptor mineralocorticoide), para as amostras de carne bovina coletadas com **14 dias** de maturação

SPOT	MR NR3C2_1 g115 T>C	GR NR3C1_1 g.3293A>G					
		AA			GA		
		MED	EP		MED	EP	
11	CC	1,744	0,075	A	1,537	0,075	A
	TC	1,609	0,075	A	1,753	0,075	A
	TT	0,662	0,075	B	2,329	0,075	A
13	CC	2,001	0,105	A	2,238	0,105	A
	TC	1,315	0,105	A	1,490	0,105	A
	TT	2,461	0,105	A	1,276	0,105	B
46	CC	0,046	0,004	A	0,035	0,004	A
	TC	0,080	0,004	A	0,040	0,004	B
	TT	0,034	0,004	A	0,043	0,004	A
236	CC	0,048	0,006	B	0,070	0,005	A
	TC	0,046	0,005	A	0,052	0,005	A
	TT	0,024	0,005	B	0,100	0,005	A

*Médias na mesma linha e seguidas por uma mesma letra maiúscula não diferem entre si, ao nível de significância conjunta de 5%, pelo teste *t* de Student

4.3.2.2 Identificação dos spots significativos

Os *spots* significativos foram retirados do gel e digeridos com tripsina, a qual cliva as ligações peptídicas do lado carboxila da lisina ou arginina. Os peptídeos resultantes foram eluídos e analisados por espectrometria de massas. De acordo com as análises 29 *spots* tiveram sua intensidade de volume significativamente alterada, porém quatro *spots* foram significativos nas amostras de ambos os tempos, e um *spot* (77) foi significativo para o marcador MR e GR independentemente, o que resultou em 24 *spots* para serem identificados.

Foram identificados com sucesso 24 *spots* correspondentes a 12 proteínas distintas. As proteínas identificadas estão listadas na Tabela 4.5 e mostradas no gel referência apresentado na Figura 4.3. Todos os *scores* das proteínas identificadas foram altos indicando alta confiabilidade dos resultados. *Scores* maiores que 67 são significativos ($P < 0,05$), ou seja, possuem mais de 95% de probabilidade de serem verdadeiros *matches* (MASCOT, 2010).

As proteínas identificadas foram avaliadas quanto a sua funcionalidade no banco de dados do SWISS-PROT. O maior número de proteínas (sete) encontradas está relacionado à estrutura e contração do músculo, envolvidas no processo de ligação de cálcio (Miosina, Troponina) e ATP (Actina). Três proteínas relacionadas ao metabolismo, envolvidas no metabolismo de carboidratos (*Phosphorylase*), transporte de elétrons e proteólise (*Cytochrome b-c1 complex subunit 1*), e biossíntese de proteínas (*Eukaryotic translation elongation factor 1 gamma*). Uma proteína relacionada com defesa celular, envolvida na proteção da célula contra o estresse (*Heat shock 27 kDa*), e outra com transporte de íon ferro (*Serotransferrin*).

Os valores de ponto isoelétrico (*pI*) e massa molecular (M_r) dos *spots* no experimento, na maioria dos casos, variaram pouco em relação aos valores teóricos das proteínas determinados com a ferramenta EXPASY. Variações entre os valores teóricos e experimental de *pI* e M_r pode ser atribuída a desvios de calibração dos parâmetros na 2-DE no programa de análise de imagens e adicionalmente, a modificações pós-traducionais que possam ocorrer, como por exemplo, glicosilação, fosforilação e clivagem proteolítica.

Uma mudança severa entre M_r experimental e teórico foi observada para o *spot 72*, o qual foi identificado como *Phosphorylase*. O M_r experimental foi menor do que o teórico, o qual pode ser atribuído a uma clivagem proteolítica.

Os resultados também demonstram que vários spots foram identificados como uma única proteína, sugerindo a presença de várias isoformas de proteínas. A presença das diferentes isoformas com diferentes pI e M_r sugere modificações pós-traducionais.

Tabela 4.5. Proteínas diferencialmente expressas no músculo *Longissimus dorsi* bovino identificadas por espectrometria de massas

Nº Spot	Nome da Proteína	Nº Acesso Swiss-Prot	Mr teórico/ experimental	pl teórico/ experimental	Score	Nº Fragmentos identificados
7	Myosin, Light chain 1, alkali; skeletal, fast - MYL1 protein (MLC1)	Q08E10	19,5/12,0	4,73/4,50	411	22
11; 14	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform (MLC2)	Q0P571	19,0/14,2	4,88/4,67	271	21
13; 15	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform (MLC2)	Q0P571	19,0/14,3	4,88/4,90	428	28
46	Heat shock 27 kDa protein (HSP27)	Q3T149	22,4/21,0	5,98/5,79	207	14
47	Heat shock 27 kDa protein (HSP27)	Q3T149	22,4/21,1	5,98/5,74	500	15
51	Heat shock 27 kDa protein (HSP27)	Q3T149	22,4/21,05	5,98/6,21	500	16
72	Phosphorylase	F1MJ28	97,3/26,4	6,65/6,73	148	22
77; 83	Troponin T, slow skeletal muscle (TnTs)	Q8MKH6	31,3/30,5	5,71/6,43	171	21
84	Troponin T, slow skeletal muscle (TnTs)	Q8MKH6	31,3/30,9	5,71/6,70	205	22
87	Troponin T, slow skeletal muscle (TnTs)	Q8MKH6	31,3/32,6	5,71/5,90	292	24
88	Troponin T, slow skeletal muscle (TnTs)	Q8MKH6	31,3/32,8	5,71/6,08	272	25
89	Troponin T, slow skeletal muscle (TnTs)	Q8MKH6	31,3/32,7	5,71/5,96	245	24
106	Troponin T, fast skeletal muscle (TnTf)	Q8MKI3	32,1/35,5	5,99/6,61	202	20
108	Troponin T fast skeletal muscle type (TnTf)	Q8MKI4	32,1/35,9	5,93/6,89	174	25
109	Troponin T, fast skeletal muscle (TnTf)	Q8MKI3	32,1/35,8	5,99/6,79	230	22
115	Troponin T, fast skeletal muscle (TnTf)	Q8MKI3	32,1/35,0	5,99/6,3	176	18
122	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	P31800	52,7/40,5	5,94/5,76	492	29
122	Actin, alpha skeletal muscle	P68138	42,0/36,8	5,23/5,86	185	17
141	Eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	Q1JPA2	50,2/41,4	6,33/6,59	254	25
185; 203	Serotransferrin	G3X6N3	77,7/69,6	7,13/6,65	186	35
198	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	P31800	52,7/40,7	5,94/5,65	218	32
200	Myosin, light chain 6B, alkali, smooth muscle and non-muscle (MLC6b)	Q148H2	23,4/19,3	5,4/5,79	367	21
236	Actin, alpha cardiac muscle 1	Q3ZC07	42,0/35,8	5,23/6,38	214	14
253	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform (MLC2)	Q0P571	19,0/13,7	4,88/4,90	247	22

4.3.2.3 Relação dos spots significativos com características fenotípicas

Uma vez que foram encontrados que os genótipos influenciaram na intensidade de alguns *spots* e que, os genótipos estão associados a algumas características fenotípicas, foram avaliados quais *spots* poderiam explicar melhor as características fenotípicas.

Para tanto, todos os *spots* significativos nas análises de variância foram submetidos às análises de regressão linear múltipla e avaliados em relação às variáveis dependentes previamente descritas como pH 24h, glicogênio, lactato, ACTH e cortisol.

Nas Tabelas 4.6 e 4.7 estão apresentados a constante de regressão, os coeficientes de regressão, valores de estatística F e a respectiva probabilidade de cada coeficiente de regressão obtidos nas análises com as amostras coletadas às 24 horas *post-mortem* e 14 dias de maturação, respectivamente.

Os coeficientes de regressão (R^2) para as equações descritas na Tabela 4.6 foram: $R^2 = 0,1383$ para pH 24 horas; $R^2 = 0,5374$ para glicogênio; $R^2 = 0,1343$ para lactato, $R^2 = 0,0000$ e $R^2 = 0,0000$ para cortisol *ante* e *post-mortem*, respectivamente; e, $R^2 = 0,2004$ e $R^2 = 0,2285$ para ACTH *ante* e *post-mortem*, respectivamente.

Para as análises de regressão com os *spots* significativos nas amostras de 24h *post-mortem*, o *spot* 185 ($P < 0,06$) demonstrou ser preditivo de duas variáveis dependentes, pH 24 horas e conteúdo de glicogênio muscular. O conteúdo de glicogênio também pode ser deduzido com base em informações prévias do genótipo do SNP NR3C1_1 g.3.293A>G no gene do GR.

O *spot* 15 foi o melhor preditor do nível de lactato e os *spots* 7 e 77 foram preditivos dos níveis de ACTH *ante* e *post-mortem*, respectivamente. Nenhum *spot* foi significativamente relacionado aos níveis de cortisol *ante* e *post-mortem* encontrados.

Tabela 4.6. Estimativas da constante de regressão, erro padrão (EP), coeficientes de regressão, valores de estatística F e a respectiva probabilidade de cada coeficiente de regressão, obtidos para os *spots* significativos para os polimorfismos NR3C1_1 g.3.293A>G e NR3C2_1 g115 T>C em relação às características endócrinas, metabólicas e pH *post-mortem* para as amostras de músculo *Longissimus dorsi* bovino coletadas às **24 horas** *post-mortem*

Coeficientes	Estimativa (β_i)	EP	Valor de F	Pr>F
pH 24 horas				
Intercepto	5.1637	0.1525	1146.2500	<.0001
Spot 185	6.1812	3.0859	4.0100	0.0561
Glicogênio				
Intercepto	4.0444	3.1591	1.6400	0.2127
GR_S	7.2661	1.4950	23.6200	<.0001
Spot 185	228.9957	57.3898	15.9200	0.0005
Lactato				
Intercepto	6.2258	4.3058	2.0900	0.1606
Spot 15	5.3743	2.7287	3.8800	0.0601
Cortisol <i>ante-mortem</i>				
Intercepto	4.4155	0.3624	148.4200	<.0001
Cortisol <i>post-mortem</i>				
Intercepto	6.4022	0.5430	139.0100	<.0001
ACTH <i>ante-mortem</i>				
Intercepto	-24.6800	16.5176	2.2300	0.1482
Spot 7	30.1357	12.2859	6.0200	0.0218
ACTH <i>post-mortem</i>				
Intercepto	0.7046	2.4773	0.0800	0.7785
Spot 77	22.6324	8.4881	7.1100	0.0135

Para as análises de regressão com os *spots* significativos nas amostras de 14 dias de maturação observou-se que o SNP NR3C2_1 g115 T>C no gene do MR é o que melhor explica os valores de pH 24 horas. Os *spots* 46 e 51 foram os melhores preditores do conteúdo de glicogênio muscular e o *spot* 72 de lactato. Os níveis de cortisol *post-mortem* foram influenciados pelo SNP NR3C1_1 g.3.293A>G no gene do GR e os *spots* 11, 46 e 51.

Os níveis de ACTH *ante-mortem* foram relacionados com os *spots* 51, 89 e 108 e os níveis de ACTH *post-mortem* com o *spot* 84.

Os coeficientes de regressão para as equações descritas na Tabela 4.7 foram: $R^2 = 0,1855$ para pH 24 horas; $R^2 = 0,5169$ para glicogênio; $R^2 = 0,1938$ para

lactato; $R^2 = 0,0000$ e $R^2 = 0,2718$ para cortisol *ante* e *post-mortem*; e, $R^2 = 0,3370$ e $R^2 = 0,1774$ para ACTH *ante* e *post-mortem*, respectivamente.

Tabela 4.7. Estimativas da constante de regressão, erro padrão (EP), coeficientes de regressão, valores de estatística F e a respectiva probabilidade de cada coeficiente de regressão, obtidos para os *spots* significativos para os polimorfismos NR3C1_1 g.3.293A>G e NR3C2_1 g115 T>C em relação às características endócrinas, metabólicas e pH *post-mortem* para as amostras de músculo *Longissimus dorsi* bovino coletadas com **14 dias** de maturação

Coeficientes	Estimativa (β_i)	EP	Valor de F	Pr>F
pH 24 horas				
Intercepto	5.3537	0.0586	8334.3000	<.0001
MR_S	0.1179	0.0494	5.6900	0.0249
Glicogênio				
Intercepto	16.6573	2.5814	41.6400	<.0001
SPOT_46	-193.6321	45.7477	17.9100	0.0003
SPOT_51	99.2202	23.0229	18.5700	0.0002
Lactato				
Intercepto	5.4939	3.8023	2.0900	0.1609
SPOT_72	251.2067	102.4687	6.0100	0.0216
Cortisol <i>ante-mortem</i>				
Intercepto	4.4155	0.3624	148.4200	<.0001
Cortisol <i>post-mortem</i>				
Intercepto	10.6519	2.8128	14.3400	0.0010
GR_S	5.3480	2.0312	6.9300	0.0152
SPOT_11	-4.6474	2.1414	4.7100	0.0411
SPOT_46	142.6235	65.0392	4.8100	0.0392
SPOT_51	-58.1548	23.7173	6.0100	0.0226
ACTH <i>ante-mortem</i>				
Intercepto	6.2069	9.2659	0.4500	0.5099
SPOT_51	-489.7492	148.7173	10.8400	0.0033
SPOT_89	269.0470	96.3255	7.8000	0.0106
SPOT_108	266.5194	111.4466	5.7200	0.0258
ACTH <i>post-mortem</i>				
Intercepto	1.1042	2.6879	0.1700	0.6849
SPOT_84	46.2906	20.3461	5.1800	0.0321

Esses resultados indicam que apenas para glicogênio há um bom ajuste da função, demonstrando que o *spot* 185 nas amostras de 24 horas e os *spots* 46 e 51

nas amostras de 14 dias explicam respectivamente, 53,7% e 51,7% da variação do conteúdo de glicogênio muscular.

4.4 Discussão

Esse estudo integrou o genoma e o proteoma para desvendar as mudanças moleculares que ocorrem no músculo bovino em função de polimorfismos anteriormente identificados nos receptores de hormônios adrenocorticais, GR e MR, e associados com níveis hormonais e parâmetros metabólicos da carne. O SNP NR3C1_1 g.3.293A>G (ss528103353) em GR está associado com níveis de cortisol plasmático *post-mortem* e o SNP NR3C2_1 g.115 T>C (ss528103346) em MR foi associado com níveis de ACTH plasmático e conteúdo de glicogênio muscular *post-mortem*, demonstrando a influencia dessas variações no gene com sensibilidade a ativação do eixo HPA e metabolismo de energia.

Alterações em algum mecanismo molecular de ação do GR ou MR levam a mudanças na sensibilidade do tecido ao cortisol e mais recentemente, vêm sendo demonstrado alterações no perfil metabólico do organismo (VAN ROSSUM et al., 2002; VAN ROSSUM; LAMBERTS, 2004; DE RIJK et al., 2006; FERNANDES-ROSA et al., 2010).

Dessa forma, os resultados desse estudo vêm esclarecer as informações do envolvimento desses polimorfismos sobre a expressão de determinadas proteínas. A técnica de eletroforese bi-dimensional permitiu que aproximadamente 550 *spots* fossem analisados. Resultado similar ao de Bouley, Chambon e Picard (2004) que detectou com a mesma coloração e no mesmo tecido muscular 500 ± 50 *spots*. No estudo de Laville et al. (2007) foram quantificados 351 e 333 *spots* de proteínas musculares sarcoplasmáticas e miofibrilares, respectivamente.

As alterações nas expressões de proteínas foram mais significativas para o SNP em MR do que para o SNP em GR. Nas amostras coletadas a 24h *post-mortem* o SNP no MR alterou a intensidade do volume significativamente de cinco *spots*: dois identificados como *myosin regulatory light chain 2 (MLC2)*, dois de Troponina T e um como *citocromo b-c1 complex subunit 1*, e nas amostras de 14 dias de maturação foram alterados 13 *spots*: dois identificados como *Heat shock 27 kDa protein* (HSP27), um como *Phophorylase*, sete como Troponina T, um como Actina,

um como *Serotransferrin* e um como *Myosin regulatory light chain 2*. Por sua vez, o SNP no GR em amostras de 24 h alterou a intensidade do volume da Troponina T, e nas amostras de 14 dias da Troponina T e a *Eukariotic translation elongation factor 1 gamma*.

A actina e a miosina são as principais proteínas miofibrilares do músculo esquelético e responsáveis pela contração muscular. A actina constitui os filamentos finos, junto com outras proteínas, como a tropomiosina e a troponina. A miosina, conhecida como proteína motor, forma os filamentos grossos (TORNBERG, 1996). No músculo esquelético, a miosina contém duas cadeias polipeptídicas pesadas e quatro cadeias leves (CHOI; KIM, 2009), as quais são cruciais na função muscular em termos de velocidade e força da contração (ZAPATA; ZERBY; WICK, 2009).

No presente estudo, dois *spots* foram identificados como actina e sua expressão foi alterada apenas em amostras de 14 dias. A intensidade de volume do *spot* 122 foi regulada pelo polimorfismo em MR com menor abundância no heterozigoto, e, o volume do *spot* 236 foi regulado pela interação de MR com GR.

Para as miosinas, apenas as de cadeia leve demonstraram ser alteradas pelos polimorfismos. Dois *spots* identificados como MLC2 (*spots* 14 e 253) mantiveram o mesmo perfil de intensidade de volume entre as amostras de 24 horas e 14 dias para o polimorfismo MR, com menor volume no genótipo heterozigoto. A diferença entre esses *spots* foi a massa molecular, um pouco menor para o *spot* 253. Nas amostras de 24 horas, o *spot* 15 também identificado como MLC2, com *pI* mais básico, foi mais intenso em indivíduos heterozigotos para o marcador MR. A intensidade de volume dos *spots* 11 e 13, correspondentes a MLC2, também foi regulada pelo genótipo TT de MR dentro dos genótipos de GR (Tabela 4.4). Deste modo, é possível notar que a expressão da MLC2 é influenciada principalmente pelo genótipo do MR e as variações de *pI* e *Mr* descritas podem ser atribuídas a modificações pós-traducionais, como por exemplo, glicosilação, fosforilação e clivagem proteolítica (BOULEY; CHAMBON; PICARD, 2004). A fosforilação na MLC2 é um importante mecanismo regulatório, podendo aumentar a sensibilidade ao cálcio e determinar a variabilidade na força entre as fibras musculares (BOTTINELLI, 2001).

A abundância da MLC1 (*spot 7*) e MLC6B (*spot 200*) foi regulada pela interação dos polimorfismos em MR com GR em amostras de 24 horas. As isoformas de miosina são as principais determinantes da grande heterogeneidade funcional das propriedades bioquímicas e contráteis das fibras do músculo esquelético, incluindo velocidade de encurtamento, consumo de ATP e força (BOTINELLI; REGGIANI, 2000). A MLC1 está associada à miosina de cadeia pesada e a actina, o que a torna, segundo Anderson, Lonergan e Huff-Lonergan (2012), um potencial indicador de carne macia, pois durante a proteólise *post-mortem* ela é liberada da matriz miofibrilar para a fração citoplasmática em virtude da degradação da miosina e actina.

Anteriormente, Lametsch et al (2003) já tinham demonstrado em amostras de músculo *Longissimus dorsi* suíno que ambas, actina e miosina, são degradadas *post-mortem* e influenciam na textura da carne. Porém, esses autores encontraram correlações significativas entre fragmentos de actina, miosina de cadeia pesada e miosina de cadeia leve tipo 2 com valores de força de cisalhamento. Hwang et al (2005) relataram 27 proteínas relacionadas com mudanças nas características de qualidade da carne durante maturação, sendo a actina, miosina de cadeia leve 1, *heat shock protein 27* kDa, troponina T e peroxiredoxin 2 as mais bem correlacionadas com maciez.

Entre as nove isoformas de Troponina T (TnT) identificadas nesse estudo, cinco pertenciam a fibras de músculo de contração lenta e quatro de fibra muscular contração rápida. Segundo Perry (1998) diferentes genes controlam a expressão de TnT em músculo esquelético lento, rápido e músculo cardíaco, e em todos os músculo, o *splicing* alternativo do RNA produz uma série de isoformas.

A TnT é uma proteína importante na regulação da contração muscular, interagindo com as outras troponinas (I e C), do complexo de troponinas, e permitindo a interação mediada pelo cálcio entre os filamentos finos de actina e os filamentos grossos de miosina (PERRY, 1998). Dessa forma, a degradação da TnT *post-mortem* e o rompimento de suas interações com outras proteínas, possivelmente levam a fragmentação da miofibrila e integridade do músculo, o que conseqüentemente a relaciona com maciez da carne (HUFF LONERGAN; ZHANG; LONERGAN, 2010).

Muroya, Nakajima, Chikuni (2003) relataram quatro fragmentos de TnTf (rápido) e dois fragmentos de TnTs (lento) derivados de diferentes isoformas de RNA mensageiro. Esse autor ainda descreve que alguns fragmentos tiveram uma similaridade alta na massa molecular, porém as isoformas podem resultar de diferenças na sequência de aminoácidos e, portanto, alterar o ponto isoelétrico da proteína. Isso explica o fato de encontrarmos valores próximos de massa molecular e alterações nos valores de pI para as isoformas de TnT. No trabalho de Bouley, Chambon e Picard (2004), 17 isoformas de TnT foram detectadas, sendo seis pertencentes ao tipo de músculo lento e onze para o tipo de músculo rápido.

Neste estudo observou-se que a Troponina T foi influenciada pelos polimorfismos no gene do MR e GR, mas não pela interação dos mesmos. Em ambos os tempos de coleta de amostras, tanto para o MR quanto para o GR, a TnT foi mais abundante no genótipo heterozigoto, evidenciando que indivíduos heterozigotos para esses polimorfismos tem mais TnT. A isoforma TnTf foi diferencialmente expressa apenas nas amostras de 14 dias tanto para MR quanto para GR.

Uma classe interessante de proteínas que vem sendo destacada ultimamente em diversos trabalhos de proteoma do músculo esquelético e, também encontrada nesse estudo são as proteínas *heat shock*, também chamadas de proteínas do estresse. São proteínas com habilidade de estabilizar o citoesqueleto, atuar no sistema de controle de qualidade das proteínas (chaperonas) e com atividade anti-apoptótica (BONCORAGLIO; MINOIA, CARRA, 2012). A HSP27 está envolvida principalmente na estabilidade da actina do citoesqueleto (BONCORAGLIO; MINOIA, CARRA, 2012).

A HSP27 foi diferencialmente expressa apenas nas amostras de 14 dias e teve seu volume diferenciado pelo SNP em MR (*spots* 47 e 51) e pela interação dos SNPs de MR com GR (*spot* 46). JIA et al. (2006) realizando um estudo sobre as enzimas envolvidas no metabolismo energético do músculo bovino *post-mortem* através de comparações de amostras *in-* e *ex- vivo* encontrou a HSP27 mais expressas em amostras coletadas 30 min após o abate, juntamente com a *Crystallin* e *alpha polypeptide 2*.

As análises de regressão linear múltipla das amostras de 14 dias *post-mortem* demonstraram que a HSP27 é uma proteína importante para predizer o conteúdo de

glicogênio muscular, sendo que os *spots* 46 e 51 explicam 51% da variação. Um aspecto interessante é que o *spot* 46 é inversamente proporcional ao conteúdo de glicogênio e o *spot* 51 diretamente proporcional. Um coeficiente de regressão positivo em um *spot* específico significa que, maior a intensidade de volume do *spot*, maior o conteúdo de glicogênio. Então, um coeficiente de regressão negativo demonstra o fenômeno oposto (ZAPATA, ZERBY, WICK, 2009).

Foram observados três *spots* de HSP27 o que foi provavelmente devido a modificações pós-traducionais. A fosforilação da HSP27 é uma importante etapa regulatória da sua função na proteção da fragmentação da actina (HUANG et al., 2011). Bouley, Chambon e Picard (2004) identificaram seis *spots* como HSP27 em amostra de músculo *Semitendinosus* bovino coletada imediatamente após o abate e Bjarnadóttir et al. (2010) identificaram em músculo *Longissimus thoracis* bovino seis *spots* como HSP27 48h *post-mortem*.

As proteínas *heat shock* tem uma importante função no GR e MR em estados inativos (sem a ligação de hormônio), mais especificamente a HSP90 e HSP70. Os receptores no citoplasma interagem com essas e outras proteínas formando grandes heterocomplexos. As *heat shock* são essenciais para manutenção desses receptores na conformação apropriada para ligação do hormônio. Uma vez o hormônio ligado, as HSP se dissociam dos receptores e estes se translocam para o núcleo interagindo com sítios alvos no DNA (PRATT; TOFT, 1997; VIENGCHAREUN et al., 2007). Na literatura não foi encontrado nenhum envolvimento da HSP27 com esses receptores.

Outra proteína também interessante identificada nesse estudo foi a *Phosphorylase* ou glicogênio fosforilase. Ela é uma importante enzima alostérica no metabolismo de carboidrato. Ela catalisa a clivagem fosforolítica do glicogênio liberando glicose-1-fosfato, a qual, subsequentemente, é transformada em glicose-6-fosfato para entrar na via glicolítica (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2008). O glicogênio é a importante reserva de energia no músculo *post-mortem* e seu metabolismo, pela via da glicólise anaeróbica, é essencial na conversão do músculo em carne, resultando em acúmulo de ácido láctico e consequente declínio de pH. A queda do pH é um fator extremamente importante que pode levar a alterações significativas na qualidade da carne, como alta capacidade de retenção de água,

alteração de cor, variabilidade na maciez, e outros (APPLE et al., 1995; VILJOEN; DE KOCH; WEBB, 2002; WULF et al., 2002)..

A abundância da *Phosphorylase (spot 72)* foi regulada pelo MR em amostras de 14 dias, com maior intensidade em indivíduos homozigotos CC. Esse resultado confirma a associação do SNP NR3C2_1 g.115 T>C no MR encontrada anteriormente com glicogênio muscular. O aumento da expressão dessa enzima metabólica pode ser importante para taxas de glicólise *post-mortem* e declínio de pH.

A proteína *cytochrome b-c1 complex subunit 1*, componente da cadeia respiratória mitocondrial e envolvida no processo de transporte de elétrons e síntese de ATP (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2008), foi identificada nos *spots* 122 e 198 e teve sua intensidade de volume alterada nas amostras 24h *post-mortem* em função do SNP em MR e da interação entre os SNPs em MR x GR.

Proteínas com outras funções também foram alteradas pelos SNPs. Os *spots* 185 e 203 foram identificados como *serotransferrin*, uma proteína de transporte de íon ferro, com importante função de manter a homeostase celular do íon ferro. A *serotransferrin* encontrada em amostras de 14 dias é regulada pelo MR e em amostras de 24h pela interação dos marcadores. Essa proteína foi considerada, pelo modelo de regressão linear múltipla, como preditiva do conteúdo de glicogênio nas amostras coletadas 24h *post-mortem*, explicando até 53% da variação. Quanto maior a abundância dessa proteína, maior o conteúdo de glicogênio muscular. A *Eukariotic translation elongation factor 1 gamma* envolvida na fase de alongamento durante a tradução foi regulada pelo GR, com níveis maiores de intensidade em heterozigotos. A grande sensibilidade da tecnologia 2-DE implica que alguns *spots* que nós interpretamos como marcadores são devidos a outros fatores que não estão sob a investigação; eles devem, por exemplo, ser devido a variação genética individual, estado de saúde, idade, sexo ou condições alimentares (LAMETSCH; BENDIXEN, 2001)

Contudo, foi possível observar que apesar de não ter sido encontrado associações desses polimorfismos com maciez de carne no trabalho anterior, o estudo atual demonstra que eles têm implicações na expressão de proteínas extremamente importantes na contração muscular e altamente associadas em diversos estudos com maciez. Consequentemente, permiti-nos inferir a importância

da variabilidade genética nesses genes com as características de qualidade da carne.

Além disso, nada consta na literatura sobre polimorfismos nesses receptores e diferenças de expressão proteica o que dificulta maiores explicações a respeito de aumento ou diminuição da expressão de determinada proteína frente a um genótipo ou combinação genotípica. Entretanto, estudos anteriores demonstraram que diversos genes respondem a ação de corticosteroides (DATSON et al., 2001, 2008; SATO et al. 2008). Datson et al. (2001) por meio de análises de SAGE (*serial analysis of gene expression*) identificaram 203 genes em hipocampo de rato que alteram sua expressão em resposta a aplicação de corticosterona. Esses genes estavam envolvidos em diversos processos celulares, e os autores demonstraram ainda, que a maioria dos genes foi regulada pela atividade de MR e não de GR e, que poucos genes respondem para a ativação simultânea de ambos os receptores. Os resultados de Datson et al. (2001) corroboram com os encontrados nesse trabalho.

4.5 Conclusão

A proteômica foi uma boa ferramenta para avaliar a expressão gênica e suas relações com características fenotípicas. Os dados demonstraram que mais proteínas são alteradas em função do SNP presente no gene do receptor mineralocorticoide (NR3C2_1 g.115 T>C; ss528103346) em relação ao SNP presente no gene do receptor glicocorticoide (NR3C1_1 g.3.293A>G; ss528103353).

A maioria das proteínas alteradas por esses marcadores mostraram estar envolvidas em processos de contração muscular e metabolismo energético, indicando que esses genes são candidatos potenciais em estudos de qualidade da carne bovina.

Referências

ANDERSON, M.J.; LONERGAN, S.M.; HUFF-LONERGAN, E. Myosin light chain 1 release from myofibrillar fraction during postmortem aging is a potential indicator of proteolysis and tenderness of beef. **Meat Science**, v.90, p.345-351, 2012.

APPLE, J.K. et al. Effects of restraint and isolation stress and epidural blockade on endocrine and blood metabolite status, muscle glycogen metabolism, and incidence of dark-cutting longissimus muscle of sheep. **Journal of Animal Science**, v.73, p.2295-2307, 1995.

BENDIXEN, E. The use of proteomics in meat science. **Meat Science**, v.71, p.138-149, 2005.

BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. **Bioquímica**. Tradução de Antonio José Magalhães da Silva Moreira, João Paulo de Campos, Paulo A. Motta. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

BJARNADÓTTIR, S.G. et al. Proteome Changes in Bovine Longissimus Thoracis Muscle during the First 48 h Postmortem: Shifts in Energy Status and Myofibrillar Stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.7408-7414, 2010.

BONCORAGLIO, A.; MINOIA, M.; CARRA, S. The family of mammalian small heat shock proteins (HSPBs): Implication in protein deposit diseases and motor neuropathies. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.44, p.1657-1669, 2012.

BOTTINELI, R.; REGGIANI, C. Human skeletal muscle fibers: molecular and functional diversity. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**, v.73, p.195-262, 2000.

BOTTINELI, R. Functional heterogeneity of mammalian single muscle fibres: do myosin isoforms tell the whole story. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v.443, p.6-17, 2001.

BOULEY, J.; CHAMBON, C.; PICARD, B. Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Proteomics**, v.4, p.1811-1824, 2004.

BRASIL (2000). Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, **Regulamento Técnico de Métodos de Insensibilização para o abate humanitário de animais de açougue**. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento.

CHOI, Y.M.; KIM, B.C. Muscle fiber characteristics, myofibrillar protein isoforms, and meat quality. **Livestock Science**, v.122, p.105-118, 2009.

DATSON, N.A. et al. Central corticosteroid actions: Search for gene targets. **European Journal of Pharmacology**, v.583, p.272-289, 2008.

DATSON, N.A. et al. Identification of corticosteroid-responsive genes in rat hippocampus using serial analysis of gene expression. **European Journal of Neuroscience**, v.14, p.675-689, 2001.

D'ALESSANDRO, A.; ZOLLA, L. Meat science: From proteomics to integrated omics towards system biology. **Journal of Proteomics**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2012.10.023>, 2012.

DE KLOET, E.R. Brain corticosteroid receptor balance and homeostatic control. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.12, p.95–164, 1991.

DE KLOET, E.R.; JOËLS, M.; HOLLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Neuroscience**, v.6, p.463-475, 2005.

DE RIJK, R.H. et al. A Common Polymorphism in the Mineralocorticoid Receptor Modulates Stress Responsiveness. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.91, p.5083-5089, 2006.

DE RIJK, R.H. Single Nucleotide Polymorphisms Related to HPA Axis Reactivity. **Neuroimmunomodulation**, v.16, p.340-352, 2009.

FERGUSON, D.M.; WARNER R.D. Have we underestimated the impact of pre-slaughter stress on meat quality in ruminants? **Meat Science**, v.80, p.12-19, 2008.

FERNANDES-ROSA, F.L. et al. Mineralocorticoid receptor p180V polymorphism: Association with body mass index and LDL-cholesterol levels. **Journal of Endocrinological Investigation**, v.33, p.472-477, 2010.

HUANG, H. et al. Gel-based phosphoproteomics analysis of sarcoplasmic proteins in postmortem porcine muscle with pH decline rate and time differences. **Proteomics**, v.11, p.4063-4076, 2011.

HUFF LONERGAN, E.; ZHANG, W.; LONERGAN, S.M. Biochemistry of postmortem muscle – Lessons on mechanisms of meat tenderization. **Meat Science**, v.86, p.184-195, 2010.

HWANG, I.H. et al. Assessment of postmortem proteolysis by gel-based proteome analysis and its relationship to meat quality traits in pig longissimus. **Meat Science**, v.69, p.79-91, 2005.

IMMONEN, K. et al. E. Bovine muscle glycogen concentration in relation to finishing diet, slaughter and ultimate pH. **Meat Science**, v.55, p.25-31, 2000.

JIA, X. et al. Proteome analysis of early post-mortem changes in two bovine muscle types: M. longissimus dorsi and M. semitendinosus. **Proteomics**, v.6, p.936-944, 2006.

JIA, X. et al. Proteome Changes in Bovine Longissimus Thoracis Muscle During the Early Postmortem Storage Period. **Journal of Proteome research**, v.6, p.2720-2731, 2007.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LAHUCKY, R. et al. Effect of preslaughter handling on muscle glycogen level and selected meat quality traits in beef. **Meat Science**, v.50, p.389-393, 1998.

LAMETSCH, R.; BENDIXEN, E. Proteome Analysis Applied to Meat Science: Characterization Post Mortem Changes in Porcine Muscle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.4531-4537, 2001.

LAMETSCH, R.; ROEPSTORFF, P.; BENDIXEN, E. Identification of Protein Degradation During Post-mortem Storage of Pig Meat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.5508-5512, 2002.

LAMETSCH, R. et al. Postmortem Proteome Changes of Porcine Muscle Related to Tenderness. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.6992-6997, 2003.

LAVILLE, E. et al. Comparison of Sarcoplasmic Proteomes between Two Groups of Pig Muscles Selected for Shear Force of Cooked Meat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.5834-5841, 2007.

MASCOT. Disponível em < http://www.matrixscience.com/help/scoring_help.html > Acesso em: 8 Jan de 2013.

MCEWEN, B.S.; DE KLOET, E.R.; ROSTENE, W. Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. **Physiological Reviews**, v.66, p.1121-1188, 1986.

MONCAU, C.T. **Perfil Proteômico muscular de bovinos inteiros da raça Nelore**. 2012. 84f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

MUROYA, S.; NAKAJIMA, I.; CHIKUNI, K. Amino acid sequences of multiple fast and slow troponin T isoforms expressed in adult bovine skeletal muscles. **Journal of Animal Science**, v.81, p.1185-1192, 2003.

PAREDI, G. et al. “Muscle to meat” molecular events and technological transformations: The proteomics insight. **Journal of Proteomics**, doi:10.1016/j.jprot.2012.04.011, 2012.

PERRY, S.V. Troponin T: genetics, properties and function. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v.19, p.575-602, 1998.

PRATT, W.B.; TOFT, D.O. Steroid Receptor Interactions with Heat Shock Protein and Immunophilin Chaperones. **Endocrine Reviews**, v.18, p.306-360, 1997.

RAMOS, E.M.; GOMIDE, L.A.M. **Avaliação da Qualidade de Carnes: Fundamentos e Metodologias**. Viçosa-MG: UFV, 2007.

SATO, H. et al. Large-scale analysis of glucocorticoid target genes in rat hypothalamus. **Journal of Neurochemistry**, v.106, p.805-814, 2008.

SHEVCHENKO, A. et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v.1, p.2856-2860, 2006.

SILVA, H.D.; VENCOVSKY, R. Poder de detecção de quantitative trait loci, da análise de marcas simples e da regressão linear múltipla. **Scientia Agricola**, v.59, n.4, p.755-762, 2002.

SILVA, V.A.M. **Estudo proteômico da carne de bovinos castrados da raça Nelore com genótipos contrastantes para CAPN e UOGCAST em diferentes períodos de maturação**. 2012. 115f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

TORNBERG, E. Biophysical Aspects of Meat Tenderness. **Meat Science**, v.43, p.175-191, 1996.

VAN ROSSUM, E.F.C. et al. A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene, which decreases sensitivity to glucocorticoids in vivo, is associated with low insulin and cholesterol levels. **Diabetes**, v.51, p.3128–3134, 2002.

VAN ROSSUM, E.F.C.; LAMBERTS, S.W.J. Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and their associations with metabolic parameters and body composition. **Recent Progress in Hormone Research**, v.59, p.333-357, 2004.

VIENGCHAREUN, S. et al. The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology. **Journal of the Nuclear Receptor Signaling Atlas**, v.5, p.1-6, 2007.

VILJOEN, H.F.; DE KOCH, H.L.; WEBB, E.C. Consumer acceptability of dark, firm and dry (DFD) and normal pH beef steaks. **Meat Science**, v.61, p.181-185, 2002.

ZAPATA, I.; ZERBY, H.N.; WICK, M. Functional Proteomic Analysis Predicts Beef Tenderness and the Tenderness Differential. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.4956-4963, 2009.

WULF, D.M. et al. Relationships among glycolytic potential, dark cutting (dark, firm, and dry) beef, and cooked beef palatability. **Journal of Animal Science**, v.80, p.1895-1903, 2002.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Estimativas de médias dos quadrados mínimos (erro padrão) e valores de P dos polimorfismos no gene do receptor glicocorticoide (GR) para as características endócrinas, metabólicas e físico-químicas relacionadas à qualidade da carne

	NR3C1_1			NR3C1_2			
	AA	AG	P	CC	TC	TT	P
PH1H	7,169 -0,51	7,034 -0,56	0,658	7,061 -0,51	7,039 -0,5	7,928 -0,58	0,041
PH24H	5,592 -0,02	5,631 -0,04	0,348	5,614 -0,03	5,594 -0,02	5,579 -0,05	0,757
L* 1d	32,445 -0,35	31,798 -0,63	0,328	32,476 -0,45	32,267 -0,4	31,952 -0,74	0,813
L* 7d	35,303 -0,34	34,795 -0,6	0,415	35,249 -0,44	35,293 -0,39	34,646 -0,72	0,681
L* 14d	34,269 -0,36	33,828 -0,67	0,523	34,111 -0,48	34,373 -0,41	33,619 -0,78	0,634
a* 1d	18,422 -0,22	17,856 -0,39	0,161	18,327 -0,29	18,208 -0,26	18,735 -0,46	0,546
a* 7d	16,383 -0,19	15,964 -0,38	0,314	16,247 -0,27	16,296 -0,23	16,53 -0,46	0,864
a* 14d	17,654 -0,23	17,107 -0,43	0,22	17,467 -0,31	17,536 -0,27	17,992 -0,51	0,63
b* 1d	15,332 -0,17	14,854 -0,32	0,167	15,447 -0,24	15,101 -0,21	15,167 -0,39	0,466
b* 7d	15,146 -0,15	14,792 -0,34	0,341	15,015 -0,23	15,113 -0,19	15,174 -0,4	0,925
b* 14d	14,921 -0,18	14,499 -0,35	0,238	14,782 -0,25	14,907 -0,22	14,849 -0,4	0,911
PC 1d	24,001 -0,46	22,56 -0,97	0,179	22,884 -0,68	24,45 -0,57	23,534 -1,16	0,204
PC 7d	25,263 -0,41	23,772 -0,81	0,094	24,107 -0,59	25,581 -0,5	25,233 -1	0,13
PC 14d	24,724 -0,44	24,622 -0,73	0,891	24,52 -0,57	25,037 -0,51	23,946 -0,88	0,393
FC 1d	9,222 -0,13	9,09 -0,28	0,671	9,19 -0,19	9,151 -0,16	9,427 -0,33	0,759
FC 7d	7,951 -0,13	7,563 -0,26	0,171	8,053 -0,18	7,759 -0,15	7,887 -0,31	0,445
FC 14d	6,504 -0,17	6,397 -0,26	0,67	6,428 -0,2	6,477 -0,19	6,69 -0,3	0,711
Glicogênio	15,817 -0,42	16,45 -0,93	0,54	15,204 -0,64	16,004 -0,53	17,732 -1,11	0,148
Lactato	15,813 -0,41	15,76 -0,91	0,958	15,963 -0,63	15,664 -0,52	15,913 -1,09	0,93
ACTH_AM	15,761 -1,03	16,554 -2,26	0,751	15,03 -1,59	16,819 -1,32	15,206 -2,76	0,65
ACTH_PM	10,848 -0,89	8,784 -1,73	0,273	9,627 -1,23	10,251 -1,07	14,181 -2,11	0,156
CORT_AM	4,461 -0,22	4,518 -0,39	0,888	4,415 -0,29	4,422 -0,26	4,967 -0,47	0,503
CORT_PM	6,058 -0,22	7,539 -0,41	0,001	6,836 -0,32	5,981 -0,28	6,423 -0,51	0,058

APÊNDICE B - Estimativas de médias dos quadrados mínimos (erro padrão) e valores de P dos polimorfismos no gene do receptor mineralocorticoide (MR) para as características endócrinas, metabólicas e físico-químicas relacionadas à qualidade da carne

	NR3C2_1				NR3C2_2				NR3C2_3			
	TT	TC	CC	P	CC	CT	TT	P	GG	GA	AA	P
PH1H	7,29 -0,69	7,42 -0,53	6,92 -0,52	0,17	6,92 -0,52	7,44 -0,53	7,33 -0,72	0,16	7,13 -0,51	7,22 -0,62	7,53 -1,83	0,960
PH24H	5,56 -0,07	5,6 -0,03	5,6 -0,02	0,81	5,61 -0,02	5,6 -0,03	5,53 -0,07	0,64	5,6 -0,02	5,61 -0,05	5,65 -0,24	0,960
L* 1d	31,73 -1,08	32,38 -0,44	32,31 -0,41	0,84	32,21 -0,4	32,46 -0,45	32,25 -1,15	0,9	32,2 -0,33	32,92 -0,76	35,87 -3,83	0,450
L* 7d	35,5 -1,03	35,16 -0,43	35,21 -0,4	0,95	35,15 -0,4	35,27 -0,44	35,26 -1,1	0,97	35,05 -0,32	36 -0,73	41,35 -3,62	0,120
L* 14d	33,44 -1,07	34,32 -0,46	34,17 -0,41	0,72	34,05 -0,4	34,48 -0,47	33,53 -1,14	0,59	34,03 -0,33	35,08 -0,75	38,06 -3,81	0,240
a* 1d	18,83 -0,66	18,52 -0,28	18,09 -0,26	0,34	18,04 -0,26	18,6 -0,29	18,96 -0,71	0,19	18,38 -0,21	18,07 -0,48	15,28 -2,35	0,370
a* 7d	16,53 -0,67	16,34 -0,26	16,26 -0,24	0,92	16,17 -0,23	16,43 -0,26	16,71 -0,72	0,65	16,41 -0,16	16,11 -0,44	10,25 -2,39	0,030
a* 14d	18,76 -0,69	17,57 -0,3	17,46 -0,27	0,19	17,43 -0,27	17,65 -0,31	18,7 -0,74	0,25	17,6 -0,22	17,58 -0,49	13,17 -2,47	0,200
b* 1d	15,03 -0,56	15,5 -0,23	15,04 -0,21	0,23	15 -0,21	15,57 -0,23	15,08 -0,6	0,12	15,25 -0,17	15,21 -0,4	14,18 -2,01	0,870
b* 7d	15,02 -0,59	15,18 -0,22	15,02 -0,2	0,86	14,97 -0,19	15,23 -0,22	15,25 -0,63	0,68	15,08 -0,15	15,21 -0,4	12,99 -2,17	0,600
b* 14d	15,37 -0,56	14,87 -0,23	14,8 -0,21	0,63	14,74 -0,21	14,98 -0,24	15,35 -0,59	0,52	14,81 -0,18	15,29 -0,4	12,47 -1,99	0,230
PC 1d	24,02 -1,72	23,88 -0,65	23,59 -0,59	0,94	23,58 -0,58	23,9 -0,67	24,15 -1,84	0,92	23,72 -0,45	23,75 -1,18	25,59 -6,28	0,960
PC 7d	26,501 -1,43	24,97 -0,55	24,811 -0,51	0,54	24,767 -0,5	25,058 -0,56	26,636 -1,53	0,51	24,846 -0,4	25,713 -1,01	28,278 -5,2	0,590
PC 14d	25,083 -1,24	24,75 -0,54	24,632 -0,51	0,94	24,444 -0,51	24,989 -0,55	25,325 -1,32	0,64	24,634 -0,44	25,28 -0,91	23,403 -4,33	0,730
FC 1d	9,525 -0,49	9,247 -0,18	9,126 -0,16	0,72	9,161 -0,16	9,206 -0,19	9,583 -0,53	0,75	9,153 -0,12	9,489 -0,33	10,41 -1,8	0,510
FC 7d	8,662 -0,45	7,855 -0,17	7,824 -0,16	0,21	7,879 -0,15	7,804 -0,18	8,621 -0,49	0,27	7,838 -0,13	8,188 -0,32	7,581 -1,66	0,570
FC 14d	6,035 -0,43	6,544 -0,2	6,469 -0,19	0,46	6,528 -0,19	6,477 -0,2	5,884 -0,45	0,37	6,516 -0,17	6,27 -0,32	5,36 -1,46	0,580
Glicogênio	20,41 -1,62	16,08 -0,59	15,33 -0,54	0,02	15,37 -0,52	15,98 -0,6	21,94 -1,71	0	15,81 -0,41	16,55 -1,11	22,74 -6,01	0,430
Lactato	17,51 -1,61	15,41 -0,59	15,94 -0,53	0,42	15,81 -0,52	15,55 -0,6	17,83 -1,72	0,45	16,01 -0,4	14,39 -1,09	14,52 -5,87	0,370
ACTH_AM	15,48 -3,99	16,65 -1,48	15,36 -1,32	0,81	15,32 -1,29	16,72 -1,53	16,15 -4,26	0,79	15,46 -0,99	19,8 -2,73	-2,56 -14,47	0,150
ACTH_PM	13,43 -3	12,32 -1,16	8,62 -1,06	0,04	8,78 -1,03	12,2 -1,19	14,8 -3,2	0,04	10,25 -0,85	12,07 -2,18	6,61 -10,99	0,680
CORT_AM	4,54 -0,66	4,58 -0,28	4,38 -0,27	0,84	4,3 -0,26	4,69 -0,29	4,83 -0,71	0,47	4,48 -0,22	4,48 -0,48	2,11 -2,36	0,600
CORT_PM	6,04 -0,73	6,32 -0,29	6,38 -0,28	0,9	6,38 -0,27	6,33 -0,3	5,92 -0,78	0,85	6,34 -0,23	6,4 -0,52	6,43 -2,6	0,990

APÊNDICE C - Estimativas dos efeitos aditivos (α), desvios da aditividade (δ) e dos efeitos médios de substituições gênicas (b_{1i}) para as características endócrinas, metabólicas e físico-químicas relacionadas à qualidade da carne, segundo o marcador **NR3C1_1**

Variável	Efeito Aditivo					Desvio de Aditividade					Efeito Médio de Substituição				
	Estimativa	EP	gl	Valor de t	Pr > t	Estimativa	EP	gl	Valor de t	Pr > t	Estimativa	EP	gl	Valor de t	Pr > t
PH1H											-0,1346	0,304	198	-0,44	0,6584
PH24H											0,039	0,0414	198	0,94	0,3479
L* 1d											-0,6468	0,659	197	-0,98	0,3275
L* 7d											-0,5076	0,6219	198	-0,82	0,4154
L* 14d											-0,4412	0,6887	180	-0,64	0,5226
a* 1d											-0,5663	0,4022	197	-1,41	0,1607
a* 7d											-0,4183	0,4142	198	-1,01	0,3138
a* 14d											-0,5467	0,444	180	-1,23	0,2197
b* 1d											-0,4785	0,3448	197	-1,39	0,1668
b* 7d											-0,3536	0,3704	198	-0,95	0,3408
b* 14d											-0,4226	0,3571	180	-1,18	0,2382
PC 1d											-1,4402	1,0683	192	-1,35	0,1792
PC 7d											-1,4907	0,8849	192	-1,68	0,0937
PC 14d											-0,1018	0,7395	198	-0,14	0,8906
FC 1d											-0,1312	0,3085	198	-0,43	0,6711
FC 7d											-0,3876	0,2819	198	-1,37	0,1707
FC 14d											-0,1067	0,2496	198	-0,43	0,6696
Glicogênio											0,6326	1,0292	198	0,61	0,5395
Lactato											-0,0527	1,0068	198	-0,05	0,9583
ACTH_AM											0,7929	2,4936	195	0,32	0,7508
ACTH_PM											-2,0641	1,8759	196	-1,1	0,2725
CORT_AM											0,0568	0,4029	198	0,14	0,8880
CORT_PM											1,4815	0,4322	198	3,43	0,0007

APÊNDICE D - Estimativas dos efeitos aditivos (α), desvios da aditividade (δ) e dos efeitos médios de substituições gênicas (b_{1i}) para as características endócrinas, metabólicas e físico-químicas relacionadas à qualidade da carne, segundo o marcador **NR3C1_2**

Variável	Efeito Aditivo					Desvio de Aditividade					Efeito Médio de Substituição				
	Estimativa	EP	gl	Valor de t	Pr > t	Estimativa	EP	gl	Valor de t	Pr > t	Estimativa	EP	gl	Valor de t	Pr > t
PH1H	0,8675	0,387	197	2,24	0,0261	-0,4555	0,2373	197	-1,92	0,0564	0,303	0,1822	198	1,66	0,0978
PH24H	-0,0352	0,0528	197	-0,67	0,5061	-0,002	0,0335	197	-0,06	0,9515	-0,0182	0,0244	198	-0,75	0,4570
L* 1d	-0,5246	0,8351	196	-0,63	0,5307	0,053	0,5287	196	0,1	0,9202	-0,2462	0,3863	197	-0,64	0,5246
L* 7d	-0,6025	0,7935	197	-0,76	0,4486	0,3452	0,4999	197	0,69	0,4907	-0,1997	0,3676	198	-0,54	0,5876
L* 14d	-0,4924	0,8642	179	-0,57	0,5696	0,5085	0,55	179	0,92	0,3564	-0,0965	0,4005	180	-0,24	0,8100
a* 1d	0,4077	0,5108	196	0,8	0,4257	-0,3225	0,322	196	-1	0,3177	0,1099	0,237	197	0,46	0,6435
a* 7d	0,2825	0,5274	197	0,54	0,5928	-0,093	0,3356	197	-0,28	0,782	0,1136	0,2435	198	0,47	0,6415
a* 14d	0,5255	0,5596	179	0,94	0,349	-0,1936	0,355	179	-0,55	0,5862	0,2057	0,2591	180	0,79	0,4284
b* 1d	-0,28	0,4367	196	-0,64	0,5221	-0,2052	0,2764	196	-0,74	0,4587	-0,1997	0,2022	197	-0,99	0,3245
b* 7d	0,1587	0,4702	197	0,34	0,7361	0,018	0,3014	197	0,06	0,9524	0,0847	0,2167	198	0,39	0,6962
b* 14d	0,0672	0,4501	179	0,15	0,8814	0,0914	0,2864	179	0,32	0,7499	0,0613	0,2082	180	0,29	0,7689
PC 1d	0,65	1,3524	191	0,48	0,6313	1,2408	0,8702	191	1,43	0,1555	0,6808	0,6299	192	1,08	0,2811
PC 7d	1,1259	1,1352	191	0,99	0,3225	0,9112	0,7221	191	1,26	0,2086	0,83	0,5257	192	1,58	0,1160
PC 14d	-0,5738	0,9406	197	-0,61	0,5426	0,804	0,5888	197	1,37	0,1737	-0,0623	0,4378	198	-0,14	0,8869
FC 1d	0,2366	0,3907	197	0,61	0,5455	-0,1576	0,2504	197	-0,63	0,5298	0,0712	0,1802	198	0,4	0,6931
FC 7d	-0,1654	0,358	197	-0,46	0,6446	-0,211	0,2285	197	-0,92	0,3569	-0,1458	0,1658	198	-0,88	0,3802
FC 14d	0,2612	0,3193	197	0,82	0,4143	-0,0815	0,1992	197	-0,41	0,6827	0,1064	0,1482	198	0,72	0,4736
Glicogênio	2,5275	1,2946	197	1,95	0,0523	-0,4642	0,8299	197	-0,56	0,5765	1,1251	0,597	198	1,88	0,0610
Lactato	-0,0506	1,2757	197	-0,04	0,9684	-0,2735	0,8178	197	-0,33	0,7384	-0,107	0,5881	198	-0,18	0,8558
ACTH_AM	0,1758	3,2002	194	0,05	0,9562	1,701	2,0409	194	0,83	0,4056	0,5948	1,4727	195	0,4	0,6867
ACTH_PM	4,5541	2,3951	195	1,9	0,0587	-1,6528	1,522	195	-1,09	0,2789	1,7691	1,1027	196	1,6	0,1103
CORT_AM	0,5526	0,5126	197	1,08	0,2823	-0,2691	0,3224	197	-0,83	0,405	0,1959	0,2376	198	0,82	0,4107
CORT_PM	-0,413	0,5585	197	-0,74	0,4605	-0,6479	0,3513	197	-1,84	0,0667	-0,392	0,2604	198	-1,51	0,1338

APÊNDICE E - Estimativas dos efeitos aditivos (α), desvios da aditividade (δ) e dos efeitos médios de substituições gênicas (b_{1i}) para as características endócrinas, metabólicas e físico-químicas relacionadas à qualidade da carne, segundo o marcador **NR3C2_1**

Variável	Efeito Aditivo					Desvio de Aditividade					Efeito Médio de Substituição				
	Estimativa	EP	gl	Valor de t	Pr > t	Estimativa	EP	gl	Valor de t	Pr > t	Estimativa	EP	gl	Valor de t	Pr > t
PH1H	-0,3735	0,5317	197	-0,7	0,4832	0,315	0,291	197	1,08	0,2803	0,3458	0,2217	198	1,56	0,1204
PH24H	0,0401	0,0717	197	0,56	0,5765	0,0245	0,0411	197	0,6	0,5522	-0,0069	0,0283	198	-0,24	0,8073
L* 1d	0,5797	1,1362	196	0,51	0,6105	0,3572	0,6497	196	0,55	0,5831	-0,1008	0,4508	197	-0,22	0,8234
L* 7d	-0,2962	1,0808	197	-0,27	0,7844	-0,1946	0,6143	197	-0,32	0,7518	0,0449	0,4304	198	0,1	0,9170
L* 14d	0,7304	1,1277	179	0,65	0,518	0,5132	0,6586	179	0,78	0,4368	-0,1056	0,4513	180	-0,23	0,8153
a* 1d	-0,7434	0,6946	196	-1,07	0,2858	0,061	0,3948	196	0,15	0,8774	0,4039	0,2769	197	1,46	0,1463
a* 7d	-0,2708	0,7149	197	-0,38	0,7052	-0,0483	0,4121	197	-0,12	0,9069	0,1094	0,2804	198	0,39	0,6967
a* 14d	-1,3075	0,7248	179	-1,8	0,0729	-0,5378	0,4228	179	-1,27	0,205	0,3761	0,2916	180	1,29	0,1988
b* 1d	0,0111	0,5918	196	0,02	0,985	0,4645	0,3388	196	1,37	0,1719	0,2432	0,2345	197	1,04	0,3009
b* 7d	0,0019	0,6362	197	0	0,9976	0,1583	0,3698	197	0,43	0,669	0,0846	0,247	198	0,34	0,7322
b* 14d	-0,5665	0,584	179	-0,97	0,3334	-0,2117	0,3425	179	-0,62	0,5373	0,1714	0,2326	180	0,74	0,4622
PC 1d	-0,4342	1,8433	191	-0,24	0,814	0,0802	1,0742	191	0,07	0,9406	0,2592	0,7242	192	0,36	0,7208
PC 7d	-1,69	1,5297	191	-1,1	0,2706	-0,6857	0,8834	191	-0,78	0,4386	0,4832	0,6038	192	0,8	0,4246
PC 14d	-0,451	1,2877	197	-0,35	0,7265	-0,1074	0,7267	197	-0,15	0,8827	0,1695	0,5167	198	0,33	0,7432
FC 1d	-0,3985	0,5286	197	-0,75	0,4519	-0,0784	0,3072	197	-0,26	0,7989	0,1569	0,2052	198	0,76	0,4454
FC 7d	-0,8384	0,4836	197	-1,73	0,0846	-0,3883	0,2794	197	-1,39	0,1662	0,211	0,1904	198	1,11	0,2691
FC 14d	0,4339	0,4351	197	1	0,3199	0,2918	0,2435	197	1,2	0,2321	-0,0656	0,1767	198	-0,37	0,7107
Glicogênio	-5,0751	1,7343	197	-2,93	0,0038	-1,7899	1,008	197	-1,78	0,0773	1,5698	0,6777	198	2,32	0,0216
Lactato	-1,5672	1,7205	197	-0,91	0,3635	-1,3131	1	197	-1,31	0,1907	0,0737	0,6702	198	0,11	0,9126
ACTH_AM	-0,1179	4,2747	194	-0,03	0,978	1,2242	2,4972	194	0,49	0,6245	0,7102	1,6708	195	0,43	0,6712
ACTH_PM	-4,8103	3,1894	195	-1,51	0,1331	1,2919	1,8476	195	0,7	0,4852	3,0904	1,2569	196	2,46	0,0148
CORT_AM	-0,1594	0,6991	197	-0,23	0,8199	0,116	0,3967	197	0,29	0,7704	0,141	0,2789	198	0,51	0,6136
CORT_PM	0,3435	0,7673	197	0,45	0,6549	0,1137	0,438	197	0,26	0,7954	-0,1135	0,304	198	-0,37	0,7092

APÊNDICE F - Estimativas dos efeitos aditivos (α), desvios da aditividade (δ) e dos efeitos médios de substituições gênicas (b_{1i}) para as características endócrinas, metabólicas e físico-químicas relacionadas à qualidade da carne, segundo o marcador **NR3C2_2**

Variável	Efeito Aditivo					Desvio de Aditividade					Efeito Médio de Substituição				
	Estimativa	EP	gl	Valor de t	Pr > t	Estimativa	EP	gl	Valor de t	Pr > t	Estimativa	EP	gl	Valor de t	Pr > t
PH1H	0,4091	0,5653	197	0,72	0,4701	0,3208	0,3069	197	1,05	0,2973	0,376	0,2302	198	1,63	0,1040
PH24H	-0,0717	0,0756	197	-0,95	0,3442	0,0281	0,0434	197	0,65	0,5184	-0,02	0,0288	198	-0,69	0,4880
L* 1d	0,0354	1,2004	196	0,03	0,9765	0,2258	0,6858	196	0,33	0,7423	0,1443	0,4607	197	0,31	0,7545
L* 7d	0,1155	1,1431	197	0,1	0,9196	0,0601	0,6493	197	0,09	0,9264	0,0911	0,4403	198	0,21	0,8362
L* 14d	-0,5181	1,1864	179	-0,44	0,6628	0,6921	0,6956	179	0,99	0,3211	0,113	0,4584	180	0,25	0,8055
a* 1d	0,9221	0,7325	196	1,26	0,2096	0,0971	0,4151	196	0,23	0,8152	0,5146	0,2832	197	1,82	0,0707
a* 7d	0,5371	0,754	197	0,71	0,4771	-0,0041	0,4348	197	-0,01	0,9924	0,2663	0,2854	198	0,93	0,3518
a* 14d	1,2691	0,7657	179	1,66	0,0992	-0,4122	0,4473	179	-0,92	0,3579	0,411	0,2969	180	1,38	0,1681
b* 1d	0,0739	0,6233	196	0,12	0,9057	0,5329	0,3565	196	1,49	0,1366	0,3356	0,2391	197	1,4	0,1619
b* 7d	0,2789	0,6699	197	0,42	0,6776	0,1199	0,3905	197	0,31	0,7591	0,2077	0,2502	198	0,83	0,4076
b* 14d	0,6033	0,6145	179	0,98	0,3276	-0,0679	0,3617	179	-0,19	0,8513	0,2639	0,2354	180	1,12	0,2637
PC 1d	0,5741	1,9442	191	0,3	0,7681	0,0317	1,1333	191	0,03	0,9778	0,3047	0,7349	192	0,41	0,6790
PC 7d	1,8693	1,6135	191	1,16	0,2481	-0,6433	0,9334	191	-0,69	0,4915	0,5788	0,614	192	0,94	0,3470
PC 14d	0,8802	1,3608	197	0,65	0,5185	0,105	0,7663	197	0,14	0,8911	0,4985	0,5291	198	0,94	0,3473
FC 1d	0,4227	0,5573	197	0,76	0,449	-0,1662	0,3249	197	-0,51	0,6095	0,1168	0,2082	198	0,56	0,5753
FC 7d	0,7423	0,5107	197	1,45	0,1477	-0,4464	0,2957	197	-1,51	0,1328	0,1196	0,1943	198	0,62	0,5389
FC 14d	-0,6445	0,4608	197	-1,4	0,1635	0,2707	0,2571	197	1,05	0,2936	-0,175	0,1814	198	-0,97	0,3356
Glicogênio	6,5782	1,8101	197	3,63	0,0004	-2,675	1,0552	197	-2,54	0,012	1,7674	0,6855	198	2,58	0,0107
Lactato	2,0141	1,814	197	1,11	0,2682	-1,27	1,0574	197	-1,2	0,2312	0,2846	0,6795	198	0,42	0,6758
ACTH_AM	0,8243	4,5055	194	0,18	0,855	0,9853	2,6409	194	0,37	0,7095	0,9631	1,6975	195	0,57	0,5711
ACTH_PM	6,0219	3,3664	195	1,79	0,0752	0,4138	1,9577	195	0,21	0,8328	3,2408	1,2818	196	2,53	0,0122
CORT_AM	0,5315	0,7379	197	0,72	0,4722	0,133	0,4178	197	0,32	0,7505	0,3398	0,2852	198	1,19	0,2349
CORT_PM	-0,4595	0,8107	197	-0,57	0,5716	0,184	0,4628	197	0,4	0,6913	-0,1316	0,3102	198	-0,42	0,6718

APÊNDICE G - Estimativas dos efeitos aditivos (α), desvios da aditividade (δ) e dos efeitos médios de substituições gênicas (b_{1i}) para as características endócrinas, metabólicas e físico-químicas relacionadas à qualidade da carne, segundo o marcador **NR3C2_3**

Variável	Efeito Aditivo					Desvio de Aditividade					Efeito Médio de Substituição				
	Estimativa	EP	gl	Valor de t	Pr > t	Estimativa	EP	gl	Valor de t	Pr > t	Estimativa	EP	gl	Valor de t	Pr > t
PH1H	0,4026	1,7733	197	0,23	0,8206	-0,1107	0,8997	197	-0,12	0,9022	0,1031	0,3842	198	0,27	0,7888
PH24H	0,0516	0,2442	197	0,21	0,8329	-0,0161	0,1287	197	-0,13	0,9003	0,0118	0,0472	198	0,25	0,8036
L* 1d	3,6607	3,8446	196	0,95	0,3422	-1,1145	2,0185	196	-0,55	0,5815	0,8532	0,7526	197	1,13	0,2583
L* 7d	6,2978	3,6321	197	1,73	0,0845	-2,1961	1,9039	197	-1,15	0,2501	1,224	0,7144	198	1,71	0,0882
L* 14d	4,0239	3,8129	179	1,06	0,2927	-0,9645	2,0406	179	-0,47	0,637	1,1773	0,7172	180	1,64	0,1024
a* 1d	-3,0949	2,3517	196	-1,32	0,1897	1,2387	1,2303	196	1,01	0,3153	-0,454	0,467	197	-0,97	0,3322
a* 7d	-6,1572	2,3981	197	-2,57	0,011	2,7816	1,2794	197	2,17	0,0309	-0,6336	0,4535	198	-1,4	0,1639
a* 14d	-4,428	2,4673	179	-1,79	0,0744	2,1956	1,315	179	1,67	0,0967	-0,2869	0,4754	180	-0,6	0,5470
b* 1d	-1,07	2,0208	196	-0,53	0,597	0,49	1,0629	196	0,46	0,6453	-0,1042	0,3933	197	-0,27	0,7912
b* 7d	-2,0873	2,174	197	-0,96	0,3382	1,1747	1,1606	197	1,01	0,3127	-0,0216	0,4026	198	-0,05	0,9572
b* 14d	-2,3359	1,9867	179	-1,18	0,2412	1,6547	1,0577	179	1,56	0,1195	0,2863	0,3847	180	0,74	0,4577
PC 1d	1,8626	6,2931	191	0,3	0,7676	-0,9008	3,3536	191	-0,27	0,7885	0,1501	1,1814	192	0,13	0,8990
PC 7d	3,4322	5,2125	191	0,66	0,511	-0,849	2,7694	191	-0,31	0,7595	0,9793	1,0006	192	0,98	0,3290
PC 14d	-1,2305	4,3428	197	-0,28	0,7772	1,2617	2,2574	197	0,56	0,5769	0,5066	0,8776	198	0,58	0,5644
FC 1d	1,2573	1,8064	197	0,7	0,4872	-0,2925	0,9643	197	-0,3	0,762	0,3742	0,3338	198	1,12	0,2637
FC 7d	-0,2568	1,6609	197	-0,15	0,8773	0,4787	0,8787	197	0,54	0,5865	0,2889	0,3163	198	0,91	0,3621
FC 14d	-1,1562	1,4644	197	-0,79	0,4308	0,3319	0,7565	197	0,44	0,6614	-0,2851	0,3011	198	-0,95	0,3449
Glicogênio	6,9321	6,0253	197	1,15	0,2513	-2,7264	3,2166	197	-0,85	0,3977	1,0941	1,1151	198	0,98	0,3277
Lactato	-1,4819	5,8853	197	-0,25	0,8015	-0,8753	3,1419	197	-0,28	0,7808	-1,5025	1,0876	198	-1,38	0,1687
ACTH_AM	-18,0209	14,5062	194	-1,24	0,2156	13,352	7,7572	194	1,72	0,0868	2,5637	2,7305	195	0,94	0,3489
ACTH_PM	-3,6381	11,0238	195	-0,33	0,7417	3,6419	5,8552	195	0,62	0,5347	1,3288	2,1598	196	0,62	0,5391
CORT_AM	-2,3757	2,3648	197	-1	0,3163	1,182	1,2361	197	0,96	0,3401	-0,1497	0,47	198	-0,32	0,7504
CORT_PM	0,0976	2,6075	197	0,04	0,9702	0,0175	1,3662	197	0,01	0,9898	0,0658	0,5127	198	0,13	0,8979