UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

BÁRBARA SILVA

**Expressão gênica dos receptores de cortisol no músculo de bovinos
Nelore e associação com características endócrinas, metabólicas e
qualidade da carne**

Pirassununga
2013

BÁRBARA SILVA

**Expressão gênica dos receptores de cortisol no músculo de bovinos
Nelore e associação com características endócrinas, metabólicas e
qualidade da carne**

VERSÃO CORRIGIDA

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

Área de Concentração: Zootecnia (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

S586e Silva, Bárbara
Expressão gênica dos receptores de cortisol no
músculo de bovinos Nelore e associação com
características endócrinas, metabólicas e qualidade da
carne / Bárbara Silva. -- Pirassununga, 2013.
78f.
Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Ciências Básicas.
Área de Concentração: Qualidade e Produtividade
Animal.
Orientador: Prof. Dr. Júlio César de Carvalho
Balieiro.

1. ACTH 2. Glicogênio 3. Lactato 4. Maciez da carne
5. Receptores glicocorticóides 6. Receptores
mineralocorticóides. I. Título.

À minha mãe, Angélica, pelo seu amor incondicional. Por todos os abraços, colos, conselhos e broncas, que me fizeram crescer e me tornar o que sou hoje.

À minha irmã, Deborah, pela amizade, cumplicidade e parceria.

Às maravilhosas, Vó Tuní e Vó Marla, pelo enorme carinho e dedicação.

Ao meu noivo, Renan, por sempre me fazer sorrir, me compreender e apoiar. Pelo amor e companheirismo.

Sem vocês eu não teria chegado até aqui!

Amo vocês!

E... à vocês, eu Dedico!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por me guiar na caminhada até aqui.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Júlio Cesar de Carvalho Balieiro, pelos ensinamentos, paciência e confiança.

Ao Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho, por ter aberto as portas de seu laboratório. E a todo o pessoal do Laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ, principalmente ao Dr. Gustavo Gasparin, por toda a ajuda.

Ao Prof. Dr. João Alberto Negrão, que me permitiu utilizar as dependências de seu laboratório. E, à técnica Sandra, que contribuiu com sua ajuda.

Ao Prof. Dr. Saulo Luz e Silva, por ter fornecido os animais usados nesse estudo, e por toda a parceria.

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Trindade, por dividir o espaço conosco.

À Mirele, por todos os ensinamentos transmitidos com paciência e bom-humor, por ter me ajudado muito além do laboratório, e principalmente pela amizade. Muito obrigada!

À Cris, que sempre ajudou muito, dentro e fora do laboratório, demonstrando grande parceria e amizade.

À Alessandra, Vanessa, Adalfredo, Davi, Valéria e Priscila, por toda contribuição e todas as risadas durante as coletas e as incontáveis horas assando bifes e cisalhando carnes.

Aos funcionários do Matadouro, Maurício, Elso, Sharlack, Dori e Dito, por terem ajudado nas coletas com muito bom-humor.

À Universidade de São Paulo, em especial à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, pelos dois anos de casa.

À Capes, pela bolsa concedida.

Aos amigos conquistados ao longo da caminhada, Thaysa, Hugo, Tiara, Lucas, Adja, Volnei. À Sissa, pessoa mais terna que eu conheço. Vocês tornaram muito mais agradáveis esses dois anos!

Aos grandes e eternos amigos, David e Dario. À Cindy (Kuia), pelos anos de faculdade, por me despertar o interesse nessa área, mas principalmente pelo companheirismo. Obrigada pela amizade de vocês!

Ao meu Tio César, por sempre ter uma piadinha pra me alegrar e, acima de tudo, pelo carinho. Às primas mais que especiais, Vitória e Sophia, com são bons os momentos em que estamos juntas!

À família Vignato, por todo o carinho, e por me permitirem me sentir em casa. Meus domingos se tornaram muito mais alegres! Não tenho palavras pra agradecer vocês!

E, à todos aqueles que contribuíram para realização deste trabalho.

Muito obrigada!

EPÍGRAFE

“Para cultivar a sabedoria, é preciso força interior.
Sem crescimento interno, é difícil conquistar a autoconfiança
e a coragem necessárias. Sem elas, nossa vida se complica.
O impossível torna-se possível com a força de vontade.”

Dalai Lama

RESUMO

SILVA, B. **Expressão gênica dos receptores de cortisol no músculo de bovinos Nelore e associação com características endócrinas, metabólicas e qualidade da carne.** 2013. 78f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

O estresse provoca alterações significativas no metabolismo dos animais, provocando a liberação de hormônios glicocorticoides. Estas alterações do metabolismo têm efeito anabólico sobre o metabolismo proteico muscular, podendo afetar os processos bioquímicos de transformação do músculo em carne. O presente trabalho teve como objetivo geral (i) verificar as relações entre variáveis endócrinas e metabólicas associadas ao estresse e características indicadoras de qualidade da carne, em animais castrados e não-castrados; (ii) avaliar a expressão gênica dos receptores mineralocorticoide (MR) e glicocorticoide (GR) em variáveis endócrinas, metabólicas e relacionadas à qualidade da carne de bovinos Nelore castrados e não-castrados. Para tal, 130 animais foram abatidos entre os anos de 2009 e 2011. Amostras de sangue foram coletadas antes e depois do abate para mensuração das concentrações de ACTH e cortisol. Amostras do músculo *Longissimus dorsi* foram coletadas durante os abates para mensuração do glicogênio e lactato, bem como, para análises de expressão gênica (RT-qPCR). Para as análises de maciez, foram coletadas amostras maturadas por um, sete e 14 dias. Para expressão gênica foram determinados os genótipos dos animais para três marcadores relacionados ao MR (MR1_1, MR1_2 e MR1_3) e dois ao GR (GR2_1 e GR2_2), por meio de PCR em tempo real. Foi verificado que animais castrados apresentam pH 24 horas menores e carnes mais macias ao sétimo e 14º dias de maturação, bem como, concentrações de cortisol (*in vivo* e *post mortem*) e lactato significativamente superiores aos animais não-castrados. O marcador MR1_3 apresenta expressão gênica significativamente diferenciada. Os animais com genótipo GA apresentaram 57,27% mais transcritos quando comparados aos animais GG. A expressão gênica do MR e GR foi significativamente relacionada às concentrações de cortisol *in vivo* e *post mortem*, porém não influenciou as concentrações de ACTH (*in vivo* e *post mortem*), glicogênio e lactato. A expressão gênica do MR e GR não foi relacionada às características indicadoras da qualidade da carne.

Palavras-chave: ACTH; glicogênio; lactato; maciez da carne; receptores glicocorticóides; receptores mineralocorticóides

ABSTRACT

SILVA, B. **Gene expression of cortisol receptors in muscle of Nellore cattle and association with endocrine and metabolic characteristics and meat quality.** 2013. 78f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

The stress causes significant changes in the metabolism of the animals causing the release of glucocorticoid hormones. These metabolic changes have anabolic effect on muscle protein metabolism, affecting the biochemical processes of transformation of muscle on meat. This study aimed to (i) examine relationships between endocrine and metabolic variables associated with stress and meat quality characteristics in castrated and non-castrated animals, (ii) evaluate mineralocorticoid receptor (MR) and glucocorticoid receptor (GR) gene expression in endocrine and metabolic characteristics and related this to meat quality of Nellore castrated and non-castrated animals. To this end, 130 animals were slaughtered between the years 2009 and 2011. Blood samples were collected before and after slaughter to measure concentrations of ACTH and cortisol. *Longissimus dorsi* muscle samples were collected during slaughter for measurement of glycogen and lactate, as well for gene expression analyzes (RT-qPCR). For the shear force analyzes, samples were aged for one, seven and 14 days. For gene expression analysis, genotypes of three markers related to MR (MR1_1, MR1_2 and MR1_3), and the two related to GR (GR2_1 and GR2_2) were determined via real-time PCR. It was observed that castrated have lower pH value at 24 hours than non-castrated animals, and tender meat on the seventh and 14th day of aging, such as cortisol (*in vivo* and *post mortem*) and lactate concentrations significantly superior to non-castrated animals. Gene expression of MR1_3 was significantly different. Animals with GA genotype had 57.27% more transcripts than GG genotype. The gene expression of MR and GR was significantly related to cortisol concentrations *in vivo* and *post mortem*, but did not influence the concentrations of ACTH (*in vivo* and *post mortem*), glycogen and lactate. The MR and GR gene expression was not related to the meat quality characteristics.

Keywords: ACTH; beef tenderness; glucocorticoid receptor; glycogen; lactate; mineralocorticoid receptor

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Número de observações (N), média, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimo e máximo para as características de qualidade de carne no músculo <i>Longissimus dorsi</i> de bovinos Nelore.....	36
Tabela 3.2. Número de observações (N), média, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimo e máximo para as variáveis endócrinas: cortisol <i>in vivo</i> e <i>post mortem</i> (IV e PM) e, ACTH <i>in vivo</i> e <i>post mortem</i> (IV e PM)	37
Tabela 3.3. Número de observações (N), média, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimo e máximo para as concentrações de glicogênio e lactato de amostras de músculo de bovinos Nelore	38
Tabela 3.4. Efeito da condição sexual sobre as características de qualidade de carne avaliadas	40
Tabela 3.5. Efeito da condição sexual sobre os parâmetros endócrinos e metabólicos avaliados	41
Tabela 3.6. Estimativas dos coeficientes de correlação entre as variáveis endócrinas (cortisol e ACTH <i>in vivo</i> e <i>post mortem</i>), metabólicas (glicogênio e lactato) e as características de qualidade de carne dos machos castrados	44
Tabela 3.7. Estimativas dos coeficientes de correlação entre as variáveis endócrinas (cortisol e ACTH <i>in vivo</i> e <i>post mortem</i>), metabólicas (glicogênio e lactato) e as características de qualidade de carne dos machos não-castrados	45
Tabela 4.1. Sequência dos <i>primers</i> desenhados para quantificação relativa da expressão gênica	59
Tabela 4.2. Média, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimo e máximo para as características de qualidade de carne, variáveis endócrinas e metabólicas dos animais	64
Tabela 4.3. Frequências genótípicas e alélicas dos marcadores MR1_1, MR1_2, MR1_3, GR2_1 e GR2_2	65
Tabela 4.4. Estatísticas descritivas dos resultados das amplificações dos genes alvo e constitutivos.....	66

Tabela 4.5. Estimativas das expressões gênicas relativas (EG), considerando os diferentes genótipos para os marcadores dos genes MR e GR	67
Tabela 4.6. Resumos das análises de variância (ANOVA) para expressão gênica do MR e GR	68
Tabela 4.7. Estimativas dos coeficientes de regressão, erros padrão e probabilidades dos efeitos das expressões gênicas do MR para as variáveis endócrinas e metabólicas, considerando o genótipo de cada marcador	71
Tabela 4.8. Estimativas dos coeficientes de regressão, erros padrão e probabilidades dos efeitos das expressões gênicas do GR para as variáveis endócrinas e metabólicas, considerando o genótipo de cada marcador	71
Tabela 4.9. Estimativas dos coeficientes de regressão, erros padrão e probabilidades das expressões gênicas considerando diferentes marcadores relacionados ao MR, em relação às características físico-químicas de qualidade da carne	72
Tabela 4.10. Estimativas dos coeficientes de regressão, erros padrão e probabilidade das expressões gênicas considerando diferentes marcadores relacionados ao GR, em relação às características físico-químicas de qualidade da carne	73

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE BIBLIOGRAFIA.....	15
2.1 O estresse e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal	15
2.2 Receptores mineralocorticoides e glicocorticoides.....	17
2.3 O estresse na qualidade da carne	19
Referências	22
3 AVALIAÇÃO DE VARIÁVEIS ENDÓCRINAS, METABÓLICAS E INDICADORAS DA QUALIDADE DA CARNE EM BOVINOS NELORE CASTRADOS E NÃO- CASTRADOS.....	25
Resumo	25
Abstract	26
3.1 Introdução	27
3.2 Material e Métodos.....	29
3.2.1 Animais	29
3.2.2 Amostras.....	29
3.2.3 Análises físico-químicas	30
3.2.3.1 pH e Temperatura.....	30
3.2.3.2 Cor	31
3.2.3.3 Perdas Por Cocção (PPC) e Força de Cisalhamento (FC)	31
3.2.4 Mensuração dos metabólitos	32
3.2.5 Mensurações endócrinas.....	33
3.2.6 Análises estatísticas	34
3.3 Resultados e Discussão.....	35
3.3.1 Análises físico-químicas	35
3.3.2 Mensurações endócrinas.....	37

3.3.3	Análise dos metabólitos	38
3.3.4	Efeito da condição sexual sobre as variáveis endócrinas e metabólicas e as características de qualidade de carne dos animais	39
3.3.5	Estimativas de correlações entre as variáveis endócrinas, metabólicas e as características de qualidade de carne de animais castrados e não-castrados...	43
3.4	Conclusões	46
	Referências	47
4	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE RECEPTORES MINERALOCORTICOIDES E GLICOCORTICOIDES EM RELAÇÃO A CARACTERÍSTICAS ENDÓCRINAS E METABÓLICAS E INDICADORAS DE QUALIDADE DE CARNE	51
	Resumo	51
	Abstract	52
4.1	Introdução	53
4.2	Material e Métodos.....	54
4.2.1	Animais.....	54
4.2.2	Amostras.....	55
4.2.3	Análises físico-químicas	56
4.2.3.1	pH e Temperatura.....	56
4.2.3.2	Cor	56
4.2.3.3	Perdas Por Cocção (PPC) e Força de Cisalhamento (FC)	56
4.2.4	Mensuração dos metabólitos	57
4.2.5	Mensurações endócrinas.....	57
4.2.6	Expressão gênica	57
4.2.6.1	Extração do RNA e Transcrição reversa.....	57
4.2.6.2	Desenho dos <i>primers</i>	59
4.2.6.3	PCR em tempo real	59
4.2.6.4	Determinação da expressão gênica e Eficiência da amplificação.....	61

4.2.7 Análises estatísticas	62
4.3 Resultados e Discussão	63
4.3.1 Análises físico-químicas, endócrinas e metabólicas	63
4.3.2 Genótipos para os marcadores dos genes MR e GR	65
4.3.3 Quantificação da expressão gênica	66
4.3.4 Expressão gênica considerando os diferentes genótipos para os marcadores dos genes MR e GR	67
4.3.5 Avaliação das características endócrinas, metabólicas e indicadoras de qualidade de carne em relação às expressões gênicas	68
4.4 Conclusões	74
Referências	75

1 INTRODUÇÃO

Com um rebanho de aproximadamente 213 milhões de cabeças (IBGE, 2012), o Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo e contribui com aproximadamente 17% da produção mundial de carnes, correspondente a 9.771 mil toneladas por equivalente de carcaça, ficando atrás somente dos Estados Unidos, que contribuem com 11.946 mil toneladas de equivalente de carcaça. Além disso, o Brasil é o maior exportador mundial de carne bovina, com um total de 1.097.310 toneladas exportadas em 2011 (ABIEC, 2012).

No entanto, o Brasil ainda enfrenta problemas e preconceitos quanto à qualidade da carne proveniente de seu rebanho, que é basicamente composto por animais Nelore. Os animais *Bos taurus indicus* são conhecidos pela ótima adaptabilidade ao clima tropical, rusticidade, habilidade materna, resistência a ectoparasitas e por produzirem uma carne mais magra. Apesar disso, quando comparados a animais *Bos taurus taurus*, são raças que apresentam menor maciez de carne.

Entretanto, animais *Bos taurus indicus* podem produzir carne de boa qualidade se os fatores relacionados às variações na maciez forem conhecidos e controlados. Segundo Koohmaraie (2003), avaliando diferentes raças, aproximadamente 46% das variações na maciez da carne bovina são devido às características genéticas do animal enquanto 54% das variações são explicadas pelo efeito do ambiente. Quando a análise é feita dentro de uma mesma raça as características genéticas do animal explicam 30% das variações na maciez, enquanto 70% são dependentes do efeito de ambiente.

Dentre os efeitos do ambiente, fatores considerados estressantes, como mudanças no manejo, na ambiência e nutrição, potencialmente inibem o bem-estar dos animais favorecendo respostas endócrinas negativas e imunossupressão. O estresse provoca a liberação de hormônios glicocorticoides, principalmente o cortisol, resultando em alterações significativas no metabolismo dos animais, os quais podem influenciar nos processos bioquímicos de transformação do músculo em carne.

A resposta fisiológica dos animais a fatores estressantes está relacionada à ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), que estimula a secreção do cortisol pelo córtex adrenal. O cortisol pode também agir através de mecanismos

genômicos, se ligando a receptores intracelulares, os receptores mineralocorticoides (MR) e glicocorticoides (GR) que vão em direção ao núcleo da célula, modificando a expressão gênica.

Os objetivos deste trabalho são: (i) Avaliar variáveis endócrinas, metabólicas e indicadoras de qualidade da carne em bovinos Nelore castrados e não-castrados; (ii) Avaliar a expressão gênica do MR e do GR em variáveis endócrinas, metabólicas e relacionadas à qualidade da carne de bovinos Nelore.

2 REVISÃO DE BIBLIOGRAFIA

2.1 O estresse e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal

O termo estresse é definido como a soma de todas as reações biológicas a estímulos físicos, emocionais, mentais ou que perturbem a homeostase de um indivíduo (PACAK; PALKOVITS, 2001). Estes estímulos, conhecidos como estressores, ocasionam em respostas fisiológicas coordenadas dentro do corpo visando reestabelecer a homeostase. Essas respostas fisiológicas, por sua vez dependem da ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e do sistema nervoso simpático (ELENKOV et al., 2000).

O eixo HPA controla a síntese e a liberação dos corticosteroides. Estes são sintetizados a partir do colesterol da alimentação no córtex suprarrenal e incluem os mineralocorticoides, os glicocorticoides e os hormônios sexuais. A atividade do eixo HPA é governada pela secreção de hormônio liberador de corticotropina (CRH) e vasopressina (AVP) pelo hipotálamo, os quais ativam a secreção do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) pela pituitária, que finalmente, estimulam a secreção de glicocorticoides pelo córtex adrenal (JURUENA; CLEARE; PARIANTE, 2004).

Os glicocorticoides interagem com seus receptores em múltiplos tecidos-alvo, incluindo o eixo HPA, onde são responsáveis pela inibição da secreção do ACTH pela pituitária e do CRH pelo hipotálamo. Estes hormônios são importantes na manutenção da homeostase, tanto diretamente como pela interação com outros sistemas, como o sistema nervoso, ou mesmo, outros hormônios (KANITZ et al., 2009). Os glicocorticoides também podem alterar o fenótipo ou a função da célula-alvo em situações de estresse (PREISLER et al., 2000). Lee e Kehrl Jr. (1998), verificaram que a molécula de adesão CD62L sofre mudança fenotípica em neutrófilos sanguíneos, como resposta ao aumento dos glicocorticoides, em gado de leite e corte. Além disso, estes hormônios inibem a síntese e estimulam a degradação de proteína e RNA no fígado, músculos, pele, tecido adiposo, tecido linfóide e tecido conjuntivo. Glicocorticoides têm pequeno efeito no cérebro ou tecido cardíaco (DICKSON, 1996).

Os mineralocorticoides, por sua vez, desempenham um papel fisiológico importante no equilíbrio eletrolítico e na homeostasia da pressão arterial, agindo mais diretamente nos túbulos distais renais. A principal função dos mineralocorticoides é desempenhada pela aldosterona. A aldosterona age

principalmente nos rins, intensificando a reabsorção do sódio e excreção do potássio (REECE, 1996). Outro papel importante desses hormônios é a ativação de receptores mineralocorticoides (MR) no rim e células periféricas, sob o controle do ACTH e do sistema renina-angiotensina. Este sistema é composto por um conjunto de peptídeos, enzimas e receptores com envolvimento no controle do volume de líquido extracelular e na pressão arterial.

Vários hormônios adrenocorticais têm atividade glicocorticoide, incluindo cortisol, cortisona e corticosterona (RANDALL; BURGGREN; FRENCH, 2008). O cortisol é o principal hormônio glicocorticoide em bovinos, ovinos, suínos e peixes (MORMÈDE et al., 2007). Estes hormônios podem atravessar a membrana lipoproteica das células, se ligando a receptores citosólicos e exercendo ação a nível nuclear, interagindo com o DNA (ação genômica) ou com outras proteínas envolvidas no processo de transcrição (ação não-genômica).

Na ação genômica, os receptores que se ligam aos hormônios glicocorticoides são os receptores mineralocorticoides (MR) e receptores glicocorticoides (GR) que, depois da ativação por seu ligante, aumentam ou reduzem a expressão gênica no núcleo celular (PREISLER et al., 2000; NECELA; CIDLOWSKI, 2004).

De modo geral, o cortisol tem atividade catabólica, proteolítica e lipolítica, em tecidos periféricos e atividade anabólica no fígado, incluindo gliconeogênese e síntese de proteínas (McMAHON; GERICH; RIZZA, 1998). Além disso, o cortisol reduz a entrada de glicose nas células, aumentando a glicose no sangue. Consequentemente, aumenta a secreção de insulina, que por sua vez aumenta a ingestão de alimentos (TEMPEL; LEIBOWITZ, 1994).

A atividade deste hormônio é variável conforme a atividade do eixo HPA. O ritmo circadiano está relacionado com as atividades diárias do animal e, nas espécies diurnas, a liberação de ACTH começa a aumentar antes do despertar, estimulando liberação de cortisol, fazendo com que esses hormônios atinjam seu pico durante as primeiras horas da manhã. Estímulos estressantes podem facilmente alterar a variação destes hormônios ao longo do dia, provocando resposta imediata, aumentando a concentração do cortisol, comprometendo sua habilidade de se ajustar as demandas do organismo (DICKSON, 1996; YOUNG; ABELSON; LIGHTMAN, 2004).

Vários fatores são responsáveis pela variação do eixo HPA, como temperatura e umidade, tipo de alimentação e fatores genéticos. Agentes estressores causam secreção de ACTH que elevam as concentrações de glicocorticoides acima dos níveis normais. O nível de cortisol é aumentado em suínos, bovinos e ovinos quando são submetidos a procedimentos que possam causar dor, como castração, mas também quando são separados do rebanho, misturados com animais desconhecidos ou transportados (REECE, 1996).

Kanitz et al. (2009) mensuraram as concentrações plasmáticas de ACTH e cortisol em suínos isolados socialmente e em baias coletivas. Os autores encontraram valores mais altos desses hormônios nos animais estressados pelo isolamento. Estes achados corroboram De Kloet et al. (2009), os quais afirmaram que a desregulação da secreção de glicocorticoides, tanto na pulsabilidade basal, como em resposta a agentes estressores, tem profundas consequências para o animal e suas funções cerebrais.

2.2 Receptores mineralocorticoides e glicocorticoides

Os glicocorticoides medeiam suas ações, incluindo a regulação do *feedback* do eixo HPA, por meio de dois subtipos distintos de receptores corticosteroides intracelulares, o receptor mineralocorticoide (MR) e o receptor glicocorticoide (GR) (JURUENA; CLEARE; PARIANTE, 2004; BAES et al., 2012).

O MR tem alta afinidade pelos corticosteroides endógenos e desempenha papel na regulação das flutuações circadianas desses hormônios, principalmente na secreção de ACTH durante a queda progressiva diurna da secreção do cortisol. Já o GR possui uma menor afinidade pelos corticosteroides endógenos, sendo mais importante na regulação da resposta ao estresse quando os níveis endógenos de glicocorticoides estão altos (JURUENA; CLEARE; PARIANTE, 2004; BAES et al., 2012).

Estes dois receptores corticosteroides não só se diferem pela afinidade de ligação, mas também por sua distribuição no cérebro. O GR possui uma expressão generalizada em todo o cérebro. Já o MR é restrito às suas estruturas límbicas como o hipocampo, amígdala, núcleo septo-lateral e algumas áreas corticais (DE KLOET; JOELS; HOLLSBOER, 2005). O MR pode se ligar igualmente a aldosterona no

fígado, onde os glicocorticoides são metabolizados pela enzima intracelular 11 β -esteroide desidrogenase tipo II (DERIJK et al., 2006).

O GR em sua forma inativa reside essencialmente no citoplasma em associação a um complexo multiproteico de chaperonas moleculares, incluindo diversas proteínas HSP (*Heat Shock Proteins*). Após se ligar ao hormônio corticosteroide, o GR é dissociado do complexo alterando a conformação da molécula do receptor para uma estrutura quaternária na forma de dímero. O mecanismo de transativação gênica é a forma clássica de ação dos glicocorticoides e caracteriza-se pela interação direta de dímeros do receptor do GR com uma sequência palindrômica específica no DNA, os elementos de respostas aos glicocorticoides (GREs), presentes geralmente em regiões promotoras dos genes. A ligação do dímero de GR diretamente aos GREs estimula a transcrição dos genes responsivos aos glicocorticoides, com envolvimento de fatores de transcrição, como a RNA polimerase II e fatores coativadores e correpresores da transativação (JURUENA; CLEARE; PARIANTE, 2004). Os MR também são capazes de se ligar aos GREs através do mecanismo de transativação (DE KLOET et al., 2009).

Além de ativar a transcrição gênica, o GR pode também reprimir a transcrição através do mecanismo de transrepressão. A transrepressão pode ocorrer pela ligação do GR aos elementos responsivos negativos aos glicocorticoides, localizados na região promotora de genes específicos. Outra forma de repressão da transcrição é através de interações do GR com outros fatores de transcrição, por meio de antagonismo inibitório dependente de interação proteína-proteína. Neste caso, a proteína ativadora-1 (AP-1) e o NF κ B (*Nuclear Factor Kappa-B*) são os fatores mais extensivamente estudados e que interferem negativamente com a transativação mediada pelo GR (DE KLOET et al., 2009).

Na resposta ao estresse, os MR estão envolvidos na atividade inibitória tônica do eixo HPA, enquanto os GR “desligam” a produção de cortisol durante a ação do estressor (REUL; DE KLOET, 1985). Assim, os MR mantêm a atividade basal do eixo HPA enquanto os GR facilitam a ocorrência de um *feedback* negativo, sob concentrações crescentes de glicocorticoides, controlando coordenadamente o começo e o fim da resposta ao estresse (DERIJK et al., 2006).

DeRijk (2009), em trabalho com humanos, encontrou associação de dois SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), encontrados no gene do GR (receptor nuclear subfamília 3, grupo C, membro 1 [NR3C1]) e no gene do MR (receptor

nuclear subfamília 3, grupo C, membro 2 [NR3C2]), com cortisol e mudanças na frequência cardíaca como resposta ao estresse.

Kanitz et al. (2009) estudaram o efeito do estresse causado por um isolamento social em suínos e o relacionaram à modificação na expressão do RNA mensageiro do MR e do GR no hipotálamo, hipocampo e amígdala dos animais. O MR e GR foram significativamente mais expressos no hipotálamo de animais isolados, quando comparados a grupos controle.

2.3 O estresse na qualidade da carne

O estresse provoca alterações significativas no metabolismo dos animais. A liberação de hormônios glicocorticoides e catecolaminas resultam em lipólise, glicogenólise no músculo e gliconeogênese no fígado. Essas mudanças no metabolismo podem causar diminuição da degradação de proteínas, alterando o metabolismo proteico muscular (FERGUSON; WARNER, 2008). Portanto, fato este que pode afetar os processos bioquímicos de transformação do músculo em carne.

A transformação do músculo em carne se inicia com a morte do animal, quando o suprimento de oxigênio para as células é interrompido. Neste caso, o metabolismo celular continua até que as reservas de energia se esgotem. A principal fonte de energia para o metabolismo celular é o glicogênio armazenado no interior das células. Assim, a glicólise *post mortem* ocorre em um ambiente anaeróbico, onde o glicogênio é transformado em ácido pirúvico e, posteriormente, é convertido em ácido lático. O lactato formado fica acumulado dentro das células, causando a queda do pH. Pelo exposto, observa-se que a quantidade de glicogênio armazenada no músculo no momento do abate é decisiva no estabelecimento do pH alcançado na carne após à maturação sanitária (IMMONEN et al., 2000).

O pH, tal qual a concentração de glicogênio do músculo, é um evento bioquímico de fundamental importância para qualidade da carne. O efeito na qualidade decorre, principalmente, da velocidade da glicólise anaeróbia nos primeiros momentos *post mortem*, quando a temperatura do animal ainda está alta, aumentando a desnaturação das proteínas, com perda de cor e de capacidade de retenção de água (BARBOSA; OSÓRIO; SOARES, 2000). Normalmente, o valor de pH do músculo no momento do abate encontra-se em torno de 7,0 e se estabiliza

entre 5,5 e 5,8 (WULF et al., 2011) quando se esgotam as reservas de ATP e se estabelece o *rigor mortis*.

Animais estressados têm suas reservas de glicogênio muscular diminuídas, ocasionando em menor produção de ácido láctico, de maneira que o pH permanece acima de 5,8-6,0 após 24 horas do abate (MACH et al., 2008). Nestes casos, são grandes as chances de que a carne apresente a anomalia conhecida como DFD (*Dark, Firm and Dry*). Essa anomalia pode ocorrer em bovinos, suínos e aves, causando uma variação na maciez e na cor da carne, além de aumentar a capacidade de retenção de água permitindo o aparecimento de microrganismos e odores indesejáveis na carne.

Outra anomalia que pode ocorrer na carne é o aparecimento do PSE (*Pale, Soft and Exudative*). Em suínos, a velocidade de queda do pH é maior e, quando atinge níveis inferiores a 5,8 dentro de 45 minutos *post mortem*, caracterizando uma glicólise extremamente rápida, tem-se o indício da presença de carne PSE. Isso ocorre em animais que são mais susceptíveis ao estresse (aves e suínos), e, normalmente não é observado em bovinos (ALVES; MANCIO, 2007).

Zhang et al. (2009) estudaram o impacto do estresse no transporte de frangos de corte. Os autores verificaram que a liberação de glicocorticoides plasmáticos afeta a capacidade de contração de fibras musculares através de mudanças em sua densidade (tamanho) e área, o que também influencia nas taxas de glicólise e lipólise musculares. Além disso, os animais considerados estressados apresentaram diferenças significativas na cor de sua carne (L^* , a^* e b^*) em relação ao grupo controle, caracterizando perda na qualidade da carne.

Mach et al. (2008) verificaram que há impacto na qualidade da carne de bovinos quando o pH as 24 horas *post mortem* permanece acima de 5,8-6,0. Os autores encontraram problemas de qualidade da carne em relação ao sexo, quantidade de gordura e tempo de espera no abatedouro, tal como a interação entre esses fatores. Machos, animais com menor quantidade de gordura de cobertura (susceptíveis ao *cold shortening*) e com maior tempo de espera no abatedouro, foram os maiores índices de pH as 24 horas *post mortem* acima de 5,8. Os autores inferiram que estes animais são mais susceptíveis ao estresse e, conseqüentemente, produzem uma carne de qualidade ruim.

Barbosa, Osório e Soares (2000) trabalhando com bovinos de dois grupos genéticos (*Bos taurus taurus* e *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*) avaliaram o

nível de estresse pré-abate dos animais através da mensuração do lactato e determinação do pH em diferentes tempos (1, 12 e 24 horas *post mortem*). Para o pH, diferenças significativas foram encontradas na primeira hora *post mortem*, onde o grupo de animais cruzados apresentou menor média de pH em relação ao grupo *Bos taurus taurus*, indicando maior taxa de glicólise anaeróbica. Os autores concluíram que, o grupo cruzado apresenta maior suscetibilidade ao estresse decorrente de um temperamento mais nervoso. Além disso, o grupo cruzado apresentou maiores valores de lactato nos três tempos avaliados, confirmando modificações no metabolismo *post mortem*.

Referências

ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Produtoras de Carne. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br>>. Acesso em: 20 set. 2012.

ALVES, D.D.; MANCIO, A.B. Maciez da Carne Bovina – Uma revisão. **Revista da FZVA**, v.14, p.193-216, 2007.

BAES, C.V.W. et al. Assessment of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor function in depression with early life stress – a systematic review. **Acta Neuropsychiatrica**, v.24, p.4-15, 2012.

BARBOSA, I.D.; OSÓRIO, M.T.M.; SOARES, G.J.D. Influência da genética de bovinos na velocidade do metabolismo *post mortem*. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.6, p.243-347, 2000.

DE KLOET, E.R. et al. Glucocorticoid signaling and stress-related limbic susceptibility path way: About receptor, transcription machinery and microRNA. **Brain Research**, v.1293, p.129-141, out. 2009.

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

DERIJK, R.H. et al. A common polymorphism in the mineralocorticoid receptor modulates stress responsiveness. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.91, p.5083-5089, out. 2006.

DERIJK, R.H. Single nucleotide polymorphisms related to HPA axis activity. **Neuroimmunomodulation**, v.16, p.340-352, 2009.

DICKSON, W.M. Glândulas Endócrinas. In: SWENSON, M.J.; REECE, W.O. **Dukes/Fisiologia dos Animais Domésticos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1996. cap. 34, p.571-602.

ELENKOV, I.J. et al. The sympathetic nerves an integrative inter-face between two Supersystems: the Brain and the Immune System. **Pharmacological Reviews**, v.52, p.595–638, dez. 2000.

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.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/default.php>>. Acesso em: 26 dez. 2012.

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.

JURUENA, M.F.; CLEARE, A.J.; PARIANTE, C.M. O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, a função dos receptores de glicocorticoides e sua importância na depressão. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.3, p.189-201, 2004.

KANITZ, E. et al. A single exposure to social isolation in domestic piglets activates behavioural arousal, neuroendocrine stress hormones, and stress-related gene expression in the brain. **Physiology & Behavior**, v.98, p.176-185, mai. 2009.

KOOHMARAIE, M. et. al. Understanding and Managing Variation in Meat Tenderness. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., 2003, Santa Maria. **Anais...** Rio Grande do Sul: SBZ, 2003.

LEE, E.K.; KEHRLI JR, M.E. Expression of adhesion molecules on neutrophils of periparturient cows and neonatal calves. **American Journal of Veterinary Research**, v.59, p.37-43, 1998.

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

McMAHON, M.; GERICH, J.; RIZZA, R. Effects of glucocorticoids on carbohydrate metabolism, **Diabetes Metabolism Research and Reviews**, v.4, p.17-30, 1998.

MORMÈDE, P. et al. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. **Physiology & Behavior**, v.92, p.317-339, 2007.

NECELA, B.M.; CIDLOWSKI, J.A. Mechanisms of glucocorticoid receptor action in noninflammatory and inflammatory cells. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v.1, p.239-46, 2004.

PACAK, K.; PALKOVITS, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. **Endocrine Reviews**, v.22, p.502–548, 2001.

PREISLER, P.S.D. et al. Glucocorticoid Receptor Expression Profiles in Mononuclear Leukocytes of Periparturient Holstein Cows. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.38-47, 2000.

RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. **Fisiologia Animal: Mecanismos e Adaptações**. 4ª edição. Rio de Janeiro: Editora Koogan S.A., 2008.

REECE, W.O. Endocrinologia. In: REECE, W.O. **Fisiologia de animais domésticos**. São Paulo: Editora Roca LTDA, 1996. cap. 14, p.327-342.

REUL, J.M.; DE KLOET, E.R. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. **Endocrinology**, v.117, p.2505-2511, 1985.

TEMPEL, D.L.; LEIBOWITZ, S.F. Adrenal steroid receptors: interactions with brain neuropeptide systems in relation to nutrient intake and metabolism. **Journal of Neuroendocrinology**, v.6, p.479-501, 1994.

WULF, D. M. et al. Relationships among glycolytic potencial, dark cutting (dark, firm, and dry) beef, and cooked beef palatability. **Journal of Animal Science**, v.80, p.1895-1903, 2011.

YOUNG, E.A.; ABELSON, J.; LIGHTMAN, S.L. Cortisol pulsatility and its role in stress regulation and health. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.25, p.69–76, jul. 2004.

ZHANG, L. et al. Transport stress in broilers: I. Blood metabolism, glycolytic potencial, and meat quality. **Poultry Science**, v.88, p.2033-2041, 2009.

3 AVALIAÇÃO DE VARIÁVEIS ENDÓCRINAS, METABÓLICAS E INDICADORAS DA QUALIDADE DA CARNE EM BOVINOS NELORE CASTRADOS E NÃO-CASTRADOS

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar características endócrinas, metabólicas e indicadoras da qualidade da carne em bovinos Nelore castrados e não-castrados. Para tal, foram abatidos 130 animais (78 castrados e 52 não-castrados), entre os anos de 2009 e 2011. Para as mensurações endócrinas, cortisol e ACTH (*in vivo* e *post mortem*), amostras de sangue foram coletadas durante a pesagem e abate dos animais. Para determinação das características metabólicas, glicogênio e lactato muscular, foram coletadas amostras do músculo *Longissimus dorsi* (entre a 12ª e 13ª costelas). O pH e a temperatura das carcaças foram mensurados a uma e 24 horas *post mortem*. Após 24 horas de resfriamento, foram retiradas três amostras de bifes (2,5 cm de largura) do músculo *Longissimus dorsi*, na região entre a 10ª e 12ª costelas, para análises de maciez em três tempos de maturação (um, sete e 14 dias). As amostras foram identificadas e a cor objetiva (L^* , a^* , b^*) foi determinada com o auxílio de um colorímetro portátil. O modelo misto utilizado nas análises estatísticas contemplou os efeitos fixos de ano-período de abate e a condição sexual dos animais, além dos efeitos aleatórios de reprodutor e resíduo. Observou-se que as concentrações de cortisol (*in vivo* e *post mortem*) e lactato muscular foram significativamente ($P < 0,05$) superiores nos animais castrados em relação aos não-castrados. Animais castrados apresentam menores pH 24 horas e carnes mais macias ($P < 0,05$) ao sétimo e 14º dias de maturação quando comparados aos animais não-castrados.

Palavras-chave: ACTH; cortisol; glicogênio; lactato; zebuínos

Abstract

The aim of this study was to evaluate endocrine and metabolic characteristics, indicators of meat quality in castrated and non-castrated Nellore cattle. To this end, 130 animals were slaughtered (78 castrated and 52 non-castrated), between the years 2009 and 2011. For endocrine measurements, cortisol and ACTH (*in vivo* and *post mortem*), blood samples were collected during weighing and slaughter of the animals. To determine the metabolic characteristics, muscle glycogen and lactate, samples were collected from *Longissimus dorsi* muscle (between 12th and 13th ribs). The pH and temperature of the animals were measured at one and 24 hours *post mortem*. At the time of boning, three steaks were taken from *Longissimus dorsi* muscle (2,5 cm wide), in the region between the 10th and 12th ribs, for tenderness analysis, in three stages of aging (one, seven and 14 days). Samples were identified and objective color (L*, a*, b*) was determined with the aid of a portable colorimeter. The mixed model used in the statistical analyzes included the fixed effects of year-period of slaughter, sexual condition, and random effects of sire and residue. It was observed that concentrations of muscle cortisol (*in vivo* and *post mortem*) and lactate were significantly higher ($P < 0.05$) in the castrated when compared to the non-castrated animals. Castrated have lower pH 24 hours and tender meat ($P < 0.05$) in the seventh and 14th days of aging compared to the non-castrated.

Keywords: ACTH; cortisol; glycogen; lactate; zebu

3.1 Introdução

A preocupação da ciência na definição e quantificação do estresse, principalmente quando relacionado com a produção e o bem-estar animal tem recebido atenção especial nos últimos anos (MÖSTL; PALME, 2002; CARROLL; FORSBERG, 2007). Segundo Ferguson e Warner (2008), todos os animais com aptidão para carne passam por algum tipo de estresse que, por sua vez pode ter efeitos prejudiciais na qualidade da carne. Em resposta a mudança ou perturbação no meio, o organismo reage através de reações autônomas, endócrinas e comportamentais, a fim de restabelecer a homeostase. A magnitude do efeito negativo dependerá do tipo, duração e intensidade dos agentes estressores, bem como, da susceptibilidade individual de cada animal a estes estressores.

A resposta endócrina ao estresse é decorrente da ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). O eixo HPA controla a síntese e a liberação de glicocorticoides, mineralocorticoides e hormônios sexuais. Em situações estressantes, o eixo HPA estimula o aumento da secreção de ACTH, elevando as concentrações de cortisol circulante (REECE, 1996; JURUENA; CLEARE; PARIANTE, 2004).

O manejo pré-abate está entre as principais medidas para melhoria da qualidade da carne (BARBOSA; OSÓRIO; SOARES, 2000), pois, em condições inadequadas de manejo pré-abate, o estado fisiológico dos animais é modificado, podendo alterar seu metabolismo *post mortem*.

No momento do abate devido a interrupção do suprimento de oxigênio no músculo é iniciado o processo de glicólise anaeróbica, que consiste na quebra do glicogênio armazenado no tecido em glicose, estimulando a formação de ácido láctico e consequente queda do pH (KOÉWIN-PODSIADLA; KRZECIO; PRZYBYLSKI, 2006). A velocidade da queda do pH, assim como o pH final após 24 horas, é variável. Em bovinos, a glicólise se desenvolve lentamente, iniciando com pH inicial em torno de 7,0, caindo para 6,4-6,8 as 5 horas e 5,5-5,8 as 24 horas *post mortem* (WULF et al., 2011).

Entretanto, se ocorrer deficiência nas reservas de glicogênio muscular e, consequentemente não houver formação de ácido láctico, o pH final poderá permanecer alto, fazendo com que todo o processo de transformação do músculo em carne seja prejudicado. Segundo Wulf et al. (2011), o estresse pré-abate dos

animais é o maior causador da diminuição do glicogênio muscular acarretando em carnes classificadas como DFD (*Dark, Firm and Dry*).

Outro fator que influencia na qualidade da carne dos animais é a condição sexual. Animais não-castrados apresentam carcaça mais magra, carne mais escura, mais dura e de pior palatabilidade que os castrados (FIELD, 1971; MILLER, CROSS, BUICK, 1987). Os animais castrados, por sua vez, produzem carcaça de melhor qualidade e acabamento, e, com maior porcentagem de gordura intramuscular (RESTLE; GRASSI; FEIJÓ, 1994).

Vários trabalhos foram realizados visando encontrar indicadores para caracterizar o estresse dos animais. Em revisão, Grandin (1997) cita o cortisol como indicador de estresse de curto período – causado pelo manejo ou outros procedimentos, como castração. Zavy et al. (1992) usaram o cortisol como indicador de estresse em bezerros *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, e maiores concentrações de cortisol foram encontradas nos animais submetidos a situações estressantes, tais como, desmame e transporte. Möstl e Palme (2002) também trabalharam com a concentração de glicocorticoides para determinação do estresse em fezes de animais. Kanitz et al. (2009) mensuraram a concentração plasmática de ACTH e cortisol em suínos para determinação do nível de estresse causado pelo isolamento social dos animais.

Com respeito à associação do estresse a qualidade da carne, Mach et al. (2008) verificaram que há impacto na qualidade da carne de bovinos quando o pH permanece acima de 5,8, principalmente pelo aparecimento de cortes escuros (DFD). Voisinet et al. (1997) relacionaram o temperamento dos animais com a incidência de cortes DFD. Foram verificados maiores proporções de cortes no limite entre DFD e normal, e maiores valores de força de cisalhamento aos 14 dias em animais com temperamento agressivo e mais susceptíveis ao estresse.

Em relação à condição sexual, Morgan et al. (1993) trabalhando com bovinos em diferentes condições sexuais, verificaram que a carne dos animais não-castrados apresentou valores de força de cisalhamento de 4,9 kg, superior aos 4,2 kg dos animais castrados. Os autores concluíram que as diferenças encontradas são devido a maior atividade da enzima calpastatina em animais não-castrados às 24 horas *post mortem*. Huff-Lonergan, Parrish Jr. e Robson (1995), encontraram carne mais macia nos bovinos castrados (força de cisalhamento 1,9-3,9 kg) em comparação aos não-castrados (força de cisalhamento 2,7-5,0 kg). Além desses, Rodrigues e

Andrade (2004) e Zilio et al. (2009) também encontraram carne mais macia nos animais castrados em relação aos não-castrados.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar características endócrinas, por meio da mensuração do ACTH e cortisol plasmáticos, bem como, as fontes energéticas, por meio da quantificação do glicogênio e lactato no músculo e correlaciona-los com características indicadoras de qualidade da carne em bovinos Nelore castrados e não-castrados.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Animais

O experimento foi conduzido na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP), onde 130 animais da raça Nelore (78 castrados e 52 não-castrados), provenientes projeto Jovem Pesquisador apoiado pela FAPESP (Proc. Nº 07/04445-6), foram recriados a pasto e terminados em confinamento (59, 79, 114 e 128 dias), pelo período de 2009 a 2011.

Em cada ano foram criados animais de diferentes safras, sendo 43 animais em 2009, 43 em 2010 e 44 em 2011. 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. E, bagaço de cana de açúcar (15%) como fonte de volumoso.

Ao final de cada período de confinamento, os animais foram abatidos com idade de aproximadamente 24 meses e peso médio de 508 kg.

3.2.2 Amostras

No presente estudo, houve dois períodos de coleta das amostras, sendo o primeiro realizado antes do abate dos animais (*in vivo*), e, o segundo logo após o abate (*post mortem*).

A coleta *in vivo* ocorreu após o período de adaptação dos animais ao confinamento (aproximadamente 21 dias). Durante a pesagem dos animais, o sangue foi coletado em microtubos contendo Heparina Sódica (Sufficient Sodium Heparin^N de 10mL; marca BD Vacutainer[®]), pela punção da veia jugular. Estas

amostras foram posteriormente utilizadas para obtenção de plasma e dosagens endócrinas.

Ao final dos períodos pré-determinados de confinamento os animais foram abatidos no Matadouro Escola do *Campus* de Pirassununga após jejum de sólidos de aproximadamente 12 horas. No dia do abate os animais foram transportados (aproximadamente 500m) em caminhão boiadeiro até o matadouro, onde foram abatidos de acordo com os procedimentos humanitários, conforme exige a legislação brasileira.

A coleta pós-abate do sangue para obtenção do plasma ocorreu durante a exanguinação dos animais. Após a morte do animal foi realizada a esola, evisceração, divisão e lavagem das carcaças, conforme procedimento padrão do matadouro.

Durante os abates, aproximadamente 15 minutos *post mortem*, foram coletadas amostras do músculo *Longissimus dorsi*, de cada carcaça, entre a 12ª e a 13ª costela na direção caudal. As amostras foram cortadas e embaladas individualmente em papel alumínio e armazenadas em nitrogênio líquido, para posterior mensuração do glicogênio e lactato muscular.

As carcaças, já seccionadas verticalmente, foram refrigeradas em câmara fria, com temperatura entre 0 e 2 °C por 24h. Posteriormente, foram retiradas três amostras de bifes (2,5 cm de largura) do músculo *Longissimus dorsi*, na região entre a 10ª e 12ª costelas, para maturação e análises de maciez. As amostras foram identificadas e a cor objetiva (L^* , a^* , b^*) foi determinada após 20 minutos de espera com o auxílio de um colorímetro portátil (CM-2500d, marca Konica Minolta). Na sequência as amostras foram embaladas individualmente a vácuo em filme plástico de alta barreira (mod. BB3; marca Cryovac) e colocadas em câmara fria à temperatura de 0 a 2 °C para maturação da carne.

3.2.3 Análises físico-químicas

3.2.3.1 pH e temperatura

O pH e a temperatura foram mensurados a uma hora e 24 horas *post mortem*, na altura da 12ª costela, com auxílio de um medidor digital portátil de pH e temperatura com sonda de penetração.

3.2.3.2 Cor

A determinação objetiva da cor foi realizada durante a desossa, nas primeiras amostras retiradas referentes à 12ª costela, e previamente às análises de maciez da carne maturada. Todas as leituras foram realizadas após 20 minutos de espera.

O aparelho utilizado para obtenção dos valores associados à cor foi um colorímetro portátil (CM-2500d, marca Konica Minolta), o aparelho permite a obtenção da escala L^* , a^* , b^* , do sistema CIE Lab, utilizando fonte de luz de D65, ângulo de observação de 10° e abertura da célula de medida 30mm. Nesta escala, o L^* indica a luminosidade e a^* e b^* são as coordenadas de cromaticidade, onde o eixo $-a^*$ até $+a^*$ indica a tonalidade do verde ao vermelho, e $-b^*$ até $+b^*$ tonalidade do azul ao amarelo. O aparelho foi previamente calibrado com um padrão branco ($L^* = 93,80$, $a^* = -0,89$, $b^* = 0,95$) e outro preto ($L^* = 1,19$, $a^* = 1,27$, $b^* = 1,92$). As medidas foram feitas em três lugares distintos na superfície da amostra, tomando-se a média como valor determinado para a amostra.

3.2.3.3 Perdas por Cocção (PPC) e Força de Cisalhamento (FC)

Os bifes foram transferidos da câmara fria para o Laboratório de carnes somente no momento da análise, onde aguardavam em geladeira (aproximadamente 5°C), distribuídos lado a lado. Ao final dos períodos de maturação (um, sete e 14 dias), as embalagens foram abertas, os bifes foram pesados e em seguida assados conforme metodologia proposta pela AMSA (1995).

Quando retirados da embalagem, imediatamente eram pesados (P_i) e colocados sobre grades sobrepostas à bandejas de alumínio já identificadas. Foi usado um forno elétrico (mod. Luxo Classic 2.4; marca Lary) à 170°C . A temperatura interna dos bifes foi monitorada com equipamento *Data Logger digital* (mod. 700-10s; marca Gulterm) com 10 termopares de perfuração. Ao atingirem 42°C os bifes foram virados, e, ao atingirem 71°C , foram retirados do forno. Por fim, os bifes foram pesados novamente (P_f), embalados com filme plástico e acondicionados em geladeira a 5°C até o dia seguinte.

As perdas por cocção (PPC) foram determinadas pela diferença de peso da amostra antes (P_i) e depois (P_f) do cozimento, ou seja, $[PPC = (P_i - P_f)/P_i]$, expressa em %.

Para a determinação da força de cisalhamento utilizou-se os bifes assados no dia anterior, dos quais foram retirados 6 cilindros de 13 mm de diâmetro com auxílio de um vazador elétrico. A maciez da carne foi determinada utilizando-se o aparelho *Warner Bratzler Shear Force*, com sonda *Warner Bratzler* deslocando-se com velocidade de 500 mm/min. A maciez (ou força de cisalhamento, em kg) foi calculada como a média das 6 medidas.

3.2.4 Mensuração dos metabólitos

Para mensuração do glicogênio e do lactato do músculo a metodologia usada foi proposta por Ramos e Gomide (2007). Brevemente, o procedimento envolve desproteinização ácida seguida de neutralização do extrato antes da mensuração dos metabólitos por espectrofotometria.

Na etapa de desproteinização, foram pesados 0,5g de tecido muscular e adicionados 2,5mL de solução de ácido perclórico 0,6M (gelado) para homogeneização por 1 minuto (Turratrec TE-102; marca Tecnal) a 14000 r.p.m. O homogenato foi centrifugado a 3000 r.p.m. (Centrífuga Allegra™ 64R; marca Beckman Coulter™) por 10 minutos à 4°C e o sobrenadante filtrado em papel de filtro *Whatman* n.54. Ao precipitado foi adicionado 1,0mL de solução de ácido perclórico 0,6M (gelado), homogeneizado, centrifugado (10 minutos à 3000 r.p.m.) e novamente filtrado.

A neutralização das amostras se deu por meio do gotejamento de uma solução de hidróxido de potássio (2M KOH, 0,4M Imidazol e 0,4M KCl) no sobrenadante filtrado, até que o mesmo atingisse o pH 7,0. Posteriormente, a mistura foi mantida em repouso por 10 minutos para a decantação do perclorato. Por fim, o sobrenadante foi transferido para microtubos de 1,5mL e armazenado a -80°C até a análise.

Para o glicogênio, o *kit* utilizado foi o *EnzyChrom™ Glycogen Assay Kit* (BioAssay Systems), conforme as instruções do fabricante. Este *kit* faz com que haja uma quebra enzimática do glicogênio contido na amostra com detecção da glicose. A intensidade da cor apresentada em leitura de 570nm é proporcional à concentração de glicogênio da amostra.

Para mensuração do lactato, foi usado o *EnzyChrom™ L-Lactate Assay Kit* (BioAssay Systems), conforme as instruções do fabricante. O *kit* baseia-se na

catalização da lactato desidrogenase durante a oxidação do lactato, onde o NADH formado causa redução da reação de trabalho do *kit*. Tal como no glicogênio, a intensidade da cor medida a 565nm é proporcional à concentração de lactato na amostra.

3.2.5 Mensurações endócrinas

Para mensuração do ACTH e Cortisol, amostras de sangue foram coletadas antes do abate (*in vivo*), com o animal em seu ambiente adaptado, e imediatamente após o abate (*post mortem*), durante a sangria. Os tubos de coleta foram centrifugados, de modo que o plasma foi separado mecanicamente da porção vermelha do sangue. As alíquotas de plasma foram, então, mantidas a -20°C até o momento da análise.

As análises se deram através dos *kits* imunoenzimáticos da Biomerica (ACTH) e Monobind (Cortisol), conforme as instruções dos fabricantes.

Resumidamente, os procedimentos para determinação do ACTH são os seguintes, as amostras de plasma são colocadas em microplacas, adicionados os controles internos e calibradores, que são incubados simultaneamente com o anticorpo biotinilado e o anticorpo marcado com enzima *horseradish peroxidase*. Ao final da incubação, a microplaca é lavada para remover os componentes não ligados à enzima, e, a enzima ligada à fase sólida é novamente incubada com substrato tetrametilbenzidina (TMB). Uma solução de parada é adicionada para terminar a reação e convertê-la a cor amarela. A intensidade de amarelo é diretamente proporcional à concentração de ACTH da amostra.

Para a determinação do cortisol, as amostras de plasma são colocadas em microplacas, adicionados os controles, Reagente de Trabalho Enzima Cortisol e Reagente de Biotina Cortisol, presentes no *kit*. A microplaca é então incubada por uma hora à temperatura ambiente. Após a incubação, a microplaca é lavada com tampão de lavagem, e, adicionada a Solução Substrato de trabalho em todos os poços. Há nova incubação de 15 minutos e, uma solução de parada é adicionada. A intensidade da cor, a uma leitura de 450nm, representa a concentração de glicogênio da amostra.

3.2.6 Análises estatísticas

As análises das características endócrinas, metabólicas e indicadoras da qualidade da carne, em relação às condições sexuais avaliadas (castrados *versus* não-castrados), foram realizadas utilizando o 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:

$$Y_{ijkl} = \mu + R_i + SA_j + C_k + e_{ijkl}$$

em que,

Y_{ijkl} = é o valor para determinada variável endócrina ou relacionada ao potencial glicolítico ou variável indicadora da qualidade da carne observada no animal l , do animal de condição sexual k , de 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 $i=1, 2, \dots, 28$;

SA_j = efeito fixo do ano e ordem 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);

e_{ijkl} = é o erro aleatório associado à variável endócrina ou relacionada ao potencial glicolítico 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^2_e .

Para o modelo acima descrito, quando observado efeito significativo para a fonte de variação condição sexual, 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 condição sexual avaliada. Estas análises foram realizadas por meio do procedimento PROC CORR do programa anteriormente citado.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Análises físico-químicas

Na Tabela 3.1 estão descritos o número de observações (N), média, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimo e máximo para as características físico-químicas relacionadas à qualidade da carne dos animais.

A média de valores de pH, 6,63 uma hora *post mortem* decaindo para 5,52 às 24 horas *post mortem* é similar ao descrito na literatura para bovinos. Nos bovinos, a glicólise se desenvolve lentamente, com pH inicial em torno de 7,0, caindo para 6,4-6,8 as 5 horas e 5,5-5,8 as 24 horas *post mortem* (WULF et al., 2011). Porém, alguns animais apresentaram pH final acima de 6,0 (máximo 6,43), sugerindo potencial para carne DFD (ALVES et al., 2005; ALVES; MANCIO, 2007). Por outro lado, pH 24 horas abaixo de 5,5, segundo Immonen et al. (2000), pode ser indício de uma glicólise *post mortem* muito rápida, fato este que causa problemas de qualidade de sua carne, como liberação de água e perda de pigmentos, tornando-a pálida e pouco palatável para o consumidor.

Os valores de força de cisalhamento, em média, diminuíram conforme o tempo de maturação, como é esperado. Pflanzner e Felício (2009), utilizando o protocolo da AMSA (1995) em bifes de *Longissimus dorsi* maturados por 14 dias e, posteriormente congelados, relataram valores médios de força de cisalhamento próximos a 7,0 kg. Caine et al. (2003) utilizando o mesmo protocolo de determinação da maciez, verificaram valores próximos a 7,0 kg em bifes de contra-filé bovino.

Os valores médios de L*, a* e b* encontram-se similares aos achados de Pinto et al. (2008), trabalhando com animais da raça Nelore, onde as médias de L*, a* e b* foram 38,14, 16,40 e 13,88, respectivamente.

Tabela 3.1. Número de observações (N), média, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimo e máximo para as características de qualidade de carne no músculo *Longissimus dorsi* de bovinos Nelore.

Variável	N	Média	DP	CV	Mínimo	Máximo
L*1D	129	32,50	7,65	23,53	12,36	44,27
a*1D	129	18,88	4,09	21,65	10,37	29,10
b*1D	129	15,90	4,08	25,64	5,95	23,37
L*7D	130	35,12	5,59	15,93	11,80	44,78
a*7D	130	16,98	3,32	19,57	9,33	26,99
b*7D	130	15,41	3,05	19,79	7,07	24,46
L*14D	119	34,57	6,79	19,64	21,40	46,01
a*14D	119	18,33	3,74	20,43	9,17	28,38
b*14D	119	15,82	2,97	18,77	8,11	27,37
pH1H	130	6,63	2,86	41,58	5,50	7,41
pH24H	130	5,52	0,25	4,45	5,01	6,43
PPC1D	128	23,47	4,63	19,72	9,94	39,22
PPC7D	127	25,16	6,30	25,04	2,28	50,55
PPC14D	130	24,65	4,53	18,35	12,27	41,44
FC1D	130	9,04	2,20	24,30	2,97	15,30
FC7D	130	7,74	1,88	24,22	3,60	13,57
FC14D	130	6,32	1,61	25,50	3,50	10,75

L*, a* e b* foram mensurados no 1º, 7º e 14º dia *post mortem*; PPC =perdas por cocção, em %, mensurados no 1º, 7º e 14º dia *post mortem*; FC = valores de força de cisalhamento em quilogramas, determinados no 1º, 7º e 14º dia *post mortem*.

As médias dos valores de PPC (perdas por cocção) foram similares aos encontrados por Abularach, Rocha e Felício (1998) em touros jovens da raça Nelore (em média 27,00 de PPC), mas acima dos encontrados por Pinto et al. (2008) e Chambaz et al. (2003). A formação do ácido lático e a consequente queda do pH *post mortem* são responsáveis pela diminuição da capacidade de reter água da carne. Essas reações causam desnaturação e perda da solubilidade das proteínas musculares, e, conseqüentemente estes grupos não têm a capacidade de atrair água. Carnes com pH entre 5,2-5,3 perdem mais água, pois estão mais perto do ponto isoelétrico das proteínas musculares. Assim sendo, uma possível explicação para os valores de PPC encontrados em algumas amostras é seu pH final estar próximo ao ponto isoelétrico das proteínas musculares.

3.3.2 Mensurações endócrinas

Na Tabela 3.2 estão descritos o número de observações (N), média, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimo e máximo para as variáveis endócrinas avaliadas cortisol *in vivo* e *post mortem* e, ACTH *in vivo* e *post mortem*.

Os valores de cortisol mostraram-se mais baixos que os valores de ACTH *in vivo* e *post mortem*, devido ao modo de ação desses hormônios. Na ativação do eixo HPA primeiramente há aumento na secreção de ACTH pela pituitária, que finalmente irá estimular a secreção do cortisol pelo córtex da adrenal (REECE, 1996; JURUENA; CLEARE; PARIANTE, 2004). Este fato pode explicar a diminuição do ACTH *post mortem*, inversamente ao aumento do cortisol.

Tabela 3.2. Número de observações (N), média, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimo e máximo para as variáveis endócrinas: cortisol *in vivo* e *post mortem* (IV e PM) e, ACTH *in vivo* e *post mortem* (IV e PM).

Variável	N	Média ¹	DP	CV	Mínimo	Máximo
Cortisol_IV	130	4,64	2,27	48,83	1,46	13,21
Cortisol_PM	130	6,72	2,68	39,85	1,47	13,91
ACTH_IV	128	16,35	15,36	93,97	0,58	79,99
ACTH_PM	129	10,23	12,99	126,91	0,00	87,19

¹Os valores de cortisol são apresentados em µg/dL e os de ACTH em pg/mL

A ativação do eixo HPA e o consequente aumento do cortisol plasmático são as primeiras respostas dos animais às condições estressantes. Segundo Mormède et al. (2007) a resposta ao estresse é medida comparando-se as concentrações dos hormônios quando o animal é desafiado em relação ao seu nível basal. A concentração plasmática de cortisol oscila entre 0,2 e 2 µg/dL (MORMÈDE et al., 2007) em bovinos não submetidos a estresse. Para o ACTH, Redbo (1998) encontrou níveis basais de entre 10-15 pg/mL em bovinos com 4 a 7 meses de idade, e 5-10 pg/mL de ACTH em bovinos com 17 a 20 meses.

Quando comparadas ao nível basal as concentrações médias aqui encontradas, 4,64 e 6,72 µg/dL para o cortisol e, 16,35 e 10,23 pg/mL para o ACTH (*in vivo* e *post mortem*, respectivamente), demonstram que estes animais estavam submetidos a algum tipo de estresse quando das coletas sanguíneas.

3.3.3 Análise dos metabólitos

Segundo Koéwin-Podsiadla, Krzecio e Przybylski (2006), quantificar o glicogênio e o lactato é uma maneira de predizer os atributos de qualidade da carne. O glicogênio é o substrato metabólico que aumenta a produção de lactato *post mortem* e proporciona o correto declínio do pH.

Na Tabela 3.3 estão descritos o número de observações (N), média, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimo e máximo para as concentrações de glicogênio e lactato de amostras de carne coletadas 30 minutos após o abate dos animais.

Tabela 3.3. Número de observações (N), média, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimo e máximo para as concentrações de glicogênio e lactato de amostras de músculo de bovinos Nelore.

Variável	N	Média ¹	DP	CV	Mínimo	Máximo
Glicogênio	130	16,31	7,32	44,91	3,19	72,51
Lactato	130	15,61	8,22	52,67	1,54	49,53

¹Valores em $\mu\text{mol/g}$ de tecido.

Os valores encontrados para a concentração de glicogênio em $\mu\text{mol/g}$ de tecido foram bastante variados, com um mínimo de 3,19 $\mu\text{mol/g}$ e máximo de 72,51 $\mu\text{mol/g}$. Para glicogênio, Lahucky et al. (1998) encontraram valores com uma hora *post mortem* variando de 13,60 a 68,70 $\mu\text{mol/g}$ e Sanz et al. (1996) relataram valores oscilando entre 14,82 a 55,91 $\mu\text{mol/g}$ em amostras de músculos *Longissimus dorsi* bovino. Para a concentração de lactato, os valores encontrados foram bastante dispersos, no entanto, sua concentração média (15,61 $\mu\text{mol/g}$), encontra-se dentro da faixa de 6-16 $\mu\text{mol/g}$, conforme Ramos e Gomide (2007) ao mensurarem ácido láctico no músculo *Longissimus dorsi* bovino.

Nas análises físico-químicas (Tabela 3.1), observou-se que 13,08% (N=17) das amostras de carne, apresentaram o pH as 24 horas *post mortem* acima de 6,0 o que, segundo Livisay, Xiong e Moody (1996) e Alves e Mancio (2007), caracterizaria carnes tipo DFD. Entretanto, dentro dessas 17 amostras DFD concentrações de glicogênio muscular foram baixas em apenas quatro (23,53%) das amostras. Estes fatos sugerem que baixas concentrações de glicogênio muscular podem levar a

carnes DFD, mas que nem toda carne DFD é causada por baixas concentrações de glicogênio.

3.3.4 Efeito da condição sexual sobre as variáveis endócrinas e metabólicas e as características de qualidade de carne dos animais

Na Tabela 3.4 está apresentado o efeito da condição sexual dos animais frente às características de qualidade de carne.

Para maciez (FC) aos sete e 14 dias de maturação os animais castrados apresentaram carne mais macia que os animais não-castrados. Estes resultados corroboram Morgan et al. (1993) e Huff-Lonergan, Parrish Jr. e Robson (1995). Além destes, Rodrigues e Andrade (2004) em trabalho envolvendo animais castrados e não-castrados (bovinos e bubalinos), encontraram valores de força de cisalhamento de 5,2 kg para os não-castrados e 4,5 kg para os castrados. Os autores relacionaram os resultados ao fato dos animais castrados apresentarem maior proporção de gordura intramuscular, melhorando a maciez. Zilio et al. (2009) também encontraram carne mais macia em bovinos Maremmana castrados (força de cisalhamento 2,70 kg) em comparação com animais não-castrados (força de cisalhamento 3,58 kg).

Em relação à cor da carne, os valores de L^* , a^* e b^* foram significativamente superiores para os machos castrados em todos os tempos de maturação, com exceção dos valores de L^* , aos sete e 14 dias de maturação. Rodrigues e Andrade (2004) trabalhando com diferentes condições sexuais em bovinos e bubalinos, encontraram resultados similares. Para L^* , os animais castrados apresentaram valores maiores que os não-castrados (39,0 e 37,2, respectivamente), indicando que os animais castrados tiveram carne mais clara. Para a^* os autores não encontraram diferenças significativas, porém para b^* os castrados apresentaram valores médios de 1,82 frente a 0,87 dos não-castrados. Os autores justificaram as diferenças encontradas pelo fato dos animais castrados apresentarem maior teor de gordura intramuscular que os não-castrados. Neste caso, a gordura produz maior refletância aumentando o valor de L^* e esta correlacionada positivamente aos valores de b^* .

Vaz e Restle (2000), igualmente encontraram cor mais clara na carne dos animais castrados em relação aos não-castrados. Vaz et al. (2001) corroboram estes achados. Ao trabalhar com bovinos Charolês, Nelore e mestiços, estes autores

estabeleceram uma escala de pontos, variando de 1 a 5 (1= carne escura, 3= vermelha levemente escura, 5= vermelha viva), na qual um painel de avaliadores classificou a carne dos animais, atribuindo o valor médio de 3,78 para os castrados e 3,05 para os não-castrados.

Tabela 3.4. Efeito da condição sexual sobre as características de qualidade de carne avaliadas.

Variável	Castrados		Não-castrados	
	Média	Erro Padrão	Média	Erro Padrão
L*1D	33,55 ^A	0,512	32,01 ^B	0,599
a*1D	18,94 ^A	0,321	17,97 ^B	0,375
b*1D	15,95 ^A	0,227	14,97 ^B	0,275
L*7D	36,05 ^A	0,557	35,19 ^A	0,631
a*7D	17,15 ^A	0,294	15,67 ^B	0,348
b*7D	15,93 ^A	0,244	14,72 ^B	0,290
L*14D	35,42 ^A	0,482	34,26 ^A	0,593
a*14D	18,62 ^A	0,283	17,26 ^B	0,339
b*14D	16,40 ^A	0,203	15,24 ^B	0,248
pH1H	7,85 ^A	1,173	7,92 ^A	1,173
pH24H	5,51 ^B	0,026	5,62 ^A	0,031
PPC1D	23,63 ^A	0,463	24,12 ^A	0,554
PPC7D	25,19 ^A	0,724	25,70 ^A	0,877
PPC14D	24,91 ^A	0,579	24,44 ^A	0,668
FC1D	9,08 ^A	0,195	9,62 ^A	0,236
FC7D	7,33 ^B	0,196	8,64 ^A	0,236
FC14D	6,11 ^B	0,215	6,81 ^A	0,246

PPC =perdas por cocção, em %; FC = valores de força de cisalhamento, em kg.

Para os valores de pH, os machos castrados e não-castrados apresentaram valores dentro do considerado normal para bovinos (ALVES et al., 2005; ALVES; MANCIO, 2007; WULF et al., 2011). Porém, os não-castrados apresentaram valores significativamente mais altos as 24 horas *post mortem*. Os resultados estão de acordo com os achados de Crouse, Seideman e Cross (1983), em que os animais não-castrados apresentaram pH final (48 horas *post mortem*) mais altos que os castrados. Vaz e Restle (2000), encontraram pH final significativamente ($P<0,001$) mais alto (6,21) para os animais não-castrados em relação aos castrados (5,51). Abba, Feliciano e Vicente (2012) estudando diferentes métodos de castração,

encontraram menor valor de pH nos animais castrados em relação ao grupo não castrado.

As perdas por cocção não apresentaram diferenças significativas nos animais, porém como previamente descrito, os valores mais altos poderiam ser indícios de perda na qualidade da carne. Pinto et al. (2008), trabalhando com bovinos não-castrados da raça Nelore encontram média de 12,04 e 10,69 aos sete e 14 dias de maturação, com valores máximos de 26,13 e 22,66 respectivamente. Vaz e Restle (2000) verificaram maiores valores médios para PPC em animais castrados (28,74), em relação aos não-castrados (23,32).

Na Tabela 3.5 está apresentado o efeito da condição sexual dos animais sobre as concentrações de cortisol, ACTH, glicogênio e lactato. Das características endócrinas avaliadas, o cortisol (*in vivo* e *post mortem*) apresentou valores médios significativamente maiores para os animais castrados. Já para o ACTH não foram verificadas diferenças significativas entre sexos. Porém, era esperado que animais não-castrados, por serem mais reativos e suscetíveis ao estresse (FIELD, 1971; MILLER; CROSS; BUICK, 1987), apresentassem valores de cortisol e ACTH mais altos que os castrados. A hipótese sugerida para estes resultados ampara-se no colesterol como substrato principal para formação de esteroides. Na ausência das gônadas masculinas, as concentrações de testosterona são reduzidas, o que pode tornar disponível maiores concentrações do substrato colesterol para serem convertidas a cortisol, justificando as maiores concentrações de cortisol em animais castrados, sem que isso signifique maior susceptibilidade ao estresse.

Tabela 3.5. Efeito da condição sexual sobre os parâmetros endócrinos e metabólicos avaliados.

Variável	Castrados		Não-castrados	
	Média	Erro Padrão	Média	Erro Padrão
Cortisol_IV	5,28 ^A	0,269	3,67 ^B	0,315
Cortisol_PM	7,76 ^A	0,318	5,40 ^B	0,373
ACTH_IV	16,62 ^A	1,699	14,17 ^A	2,019
ACTH_PM	10,23 ^A	1,632	10,49 ^A	1,930
Glicogênio	17,13 ^A	0,833	15,71 ^A	1,005
Lactato	16,90 ^A	0,707	14,35 ^B	0,853

Cortisol *in vivo* e *post mortem* em µg/dL; ACTH *in vivo* e *post mortem* em pg/mL; glicogênio e lactato em µmol/g de tecido.

Para as concentrações de glicogênio não foram evidenciadas diferenças significativas entre animais castrados e não-castrados. Porém, a condição sexual influenciou significativamente as concentrações de lactato, com animais castrados apresentando concentrações maiores que os não-castrados.

Segundo Santos (2011), um dos fatores que interfere na maciez da carne de animais não-castrados é a quantidade de glicogênio no momento pré-abate. Esses animais apresentam comportamento mais agressivo e, esta condição resulta em gasto de glicogênio muscular e consequentemente depleção das reservas energéticas, prejudicando a queda do pH e, levando ao aparecimento de cortes DFD. Voisinet et al. (1997) trabalhando com fêmeas e machos castrados verificaram que os machos castrados possuem temperamento mais dócil, ou seja, menos suscetível ao estresse e a cortes DFD. Os autores associaram a incidência de cortes mais escuros nas fêmeas às baixas reservas de glicogênio, devido a maior susceptibilidade destes animais ao estresse pré-abate.

Kuss et al. (2010) trabalhando com animais castrados e não-castrados, verificou que os animais não-castrados mostraram-se mais agitados (brigas e tentativas de cobertura) que os castrados. Esses autores verificaram que o pH final dos animais não-castrados apresentou valor médio de 5,90, enquanto o dos castrados foi 5,44. Consequentemente, a carne dos animais castrados foi classificada como mais clara e mais macia, através de painel sensorial. Os autores associaram essas características com o fato dos animais não-castrados serem mais suscetíveis ao estresse e, por consequência, sofrerem maior depleção da concentração de glicogênio muscular no momento do abate.

Corroborando os trabalhos citados, os achados do presente estudo sugerem que animais castrados têm maior reserva de glicogênio antes do abate proporcionando produção de ácido láctico e correto declínio do pH, consequentemente, carne mais macia.

3.3.5 Estimativas de correlações entre as variáveis endócrinas, metabólicas e as características de qualidade de carne de animais castrados e não-castrados

As correlações entre as variáveis endócrinas e metabólicas, relacionadas ao estresse, e as características de qualidade de carne para os animais castrados estão apresentadas na Tabela 3.6. Para o cortisol foram observadas correlações positivas (0,3284 e 0,3046, cortisol *in vivo*) com a^* no sétimo e 14º dias *post mortem*, bem como, correlação de -0,3231 (cortisol *post mortem*) com L^* aos 14 dias. O ACTH *in vivo*, mostrou correlações negativas com L^* no primeiro, sétimo e 14º dia de maturação (-0,4904, -0,3812 e -0,4465, respectivamente), tal como correlações positivas para a^* nos três tempos de maturação (0,4453, 0,3489 e 0,3935). Assim, é possível observar que aumentos nas concentrações de cortisol e ACTH tendem a aumentar a tonalidade de vermelho na carne (a^*) e diminuir a luminosidade (L^*). Neste caso, o impacto é a possibilidade da carne ser mais escura e mais opaca, características essas, indesejáveis sob o ponto de vista do consumidor. Estes achados corroboram Livisay, Xiong e Moody (1996), que encontraram baixos valores de L^* e altos valores de a^* em carnes DFD, quando comparadas às normais.

O ACTH *in vivo* apresentou correlações negativas com PPC e FC no primeiro dia de maturação de -0,3341 e -0,3267, respectivamente. Neste caso, quanto maior a concentração de ACTH plasmático, menor seria a força de cisalhamento e perda por cocção dos bifes. Segundo Tornberg (1996), os bifes DFD, quando cozidos, podem se apresentar macios. Viljoen, Kock e Webb (2002) ao estudarem a aceitabilidade de cortes normais e DFD pelo consumidor, constataram que, quanto à maciez, depois de cozidos os bifes considerados DFD podem ser tão macios quanto os normais, apesar de não apresentarem o mesmo sabor. Este fato poderia auxiliar a explicação do porque animais com maiores concentrações de ACTH poderiam apresentar carnes com força de cisalhamento menores e, portanto, mais macias.

Tabela 3.6. Estimativas dos coeficientes de correlação entre as variáveis endócrinas (cortisol e ACTH *in vivo* e *post mortem*), metabólicas (glicogênio e lactato) e as características de qualidade de carne dos machos castrados.

Variável	CORT_IV	CORT_PM	ACTH_IV	ACTH_PM	GLICO	LACT
L*1D	-0,1541	-0,2629	-0,4904	-0,1020	-0,1517	0,3197
a*1D	0,2147	0,0333	0,4453	0,1544	0,2638	-0,2055
b*1D	0,2229	-0,1115	0,1980	0,0602	0,0814	-0,2002
L*7D	-0,2026	-0,1888	-0,3812	-0,1092	-0,0419	0,3073
a*7D	0,3284	-0,2921	0,3489	0,1739	0,1920	0,2410
b*7D	-0,0181	-0,0456	-0,1884	0,0150	0,1190	-0,0824
L*14D	-0,2665	-0,3231	-0,4465	-0,1396	-0,1806	0,2998
a*14D	0,3046	0,1165	0,3935	0,1027	0,2338	-0,0740
b*14D	-0,1908	0,0935	-0,0781	-0,0678	0,1175	-0,0917
pH1H	0,0191	0,0015	-0,2479	-0,1142	-0,1005	-0,1561
pH24H	-0,2069	0,2049	-0,0948	-0,1381	-0,2087	-0,2495
PPC1D	-0,1632	-0,1920	-0,3341	-0,0286	-0,0151	0,1702
PPC7D	-0,0102	0,0312	-0,1380	-0,1316	-0,1380	-0,0411
PPC14D	-0,0949	0,0116	-0,0762	-0,0508	-0,0549	-0,0156
FC1D	-0,1700	-0,0856	-0,3267	-0,1014	-0,1024	0,1596
FC7D	-0,1615	0,1773	-0,2246	-0,1943	-0,2415	-0,0094
FC14D	-0,0830	0,0941	-0,1983	-0,1489	-0,2644	0,0808

CORT_IV = cortisol *in vivo*; CORT_PM = cortisol *post mortem*; GLICO = glicogênio; LACT = lactato.

Para os animais não-castrados, as correlações entre as variáveis endócrinas e metabólicas e as características de qualidade de carne estão apresentadas na Tabela 3.7.

O cortisol *in vivo* apresenta uma correlação média/alta de 0,6038 com pH 1 hora após a morte. Esta tendência foi mantida com cortisol *post mortem* apresentando correlação de 0,4456 com a mesma característica. Além disso, o cortisol *post mortem* apresentou correlação negativa com força de cisalhamento aos sete dias (-0,3548). O ACTH mostrou comportamento similar ao cortisol, apresentando correlação de 0,3056 (ACTH *in vivo*) e 0,3085 (ACTH *post mortem*) com pH 1 hora, e, correlação negativa (-0,3060, ACTH *in vivo*) com força de cisalhamento aos 7 dias. O aumento tanto do cortisol, como do ACTH, em situações de estresse parece ter influência no aumento do pH 1 hora após a morte dos animais. A tendência de diminuição da força de cisalhamento aos 7 dias relacionada

com aumento do estresse foi também observada em animais castrados e, como discutido anteriormente, pode ser sugestivo de carnes DFD.

Tabela 3.7. Estimativas dos coeficientes de correlação entre as variáveis endócrinas (cortisol e ACTH *in vivo* e *post mortem*), metabólicas (glicogênio e lactato) e as características de qualidade de carne dos machos não-castrados.

Variável	CORT_IV	CORT_PM	ACTH_IV	ACTH_PM	GLICO	LACT
L*1D	-0,0744	-0,0665	-0,1549	0,2763	0,1251	0,3674
a*1D	0,1953	0,2859	0,2867	-0,0511	0,1718	-0,3886
b*1D	0,0633	0,2180	0,1441	0,2992	0,3344	-0,2014
L*7D	-0,0761	-0,1112	-0,1221	0,2871	0,2905	0,3409
a*7D	0,1498	0,0536	0,0721	-0,2278	-0,1161	-0,2379
b*7D	-0,0324	0,0491	0,0241	0,0406	0,3358	-0,3197
L*14D	-0,2477	-0,1466	-0,1562	0,2911	0,1958	0,4878
a*14D	0,3424	0,2338	0,2587	-0,1639	0,0930	-0,4375
b*14D	0,0053	0,1373	0,2804	0,0998	0,4388	-0,2075
pH1H	0,6038	0,4456	0,3056	0,3085	-0,0227	-0,2336
pH24H	-0,1712	-0,0819	-0,0544	-0,0641	-0,2702	0,2783
PPC1D	-0,1318	-0,0433	-0,0518	0,1296	0,2336	0,0333
PPC7D	-0,0542	0,0567	-0,1885	-0,2038	0,1900	-0,1490
PPC14D	0,1796	0,1215	0,0997	0,0858	-0,0398	-0,1710
FC1D	-0,1425	-0,2339	-0,2474	-0,1856	-0,1686	0,0998
FC7D	-0,1313	-0,3548	-0,3060	-0,2870	-0,4188	0,1711
FC14D	0,1451	-0,2773	0,0195	-0,0349	-0,2416	0,0153

CORT_IV = cortisol *in vivo*; CORT_PM = cortisol *post mortem*; GLICO = glicogênio; LACT = lactato.

Para os metabólitos, houve correlação positiva do glicogênio com b* aos um, sete e 14 dias *post mortem* (0,3344, 0,3358 e 0,4388, respectivamente) e do lactato com L* igualmente nos três dias de maturação (0,3674 0,3409 e 0,4878). Os achados sugerem que maiores concentrações de glicogênio no músculo e, conseqüentemente lactato, proporcionam coloração mais clara a carne. Foi verificada também, correlação negativa do lactato com a* no primeiro dia (-0,3886) e b* no sétimo dia (-0,3197), de maneira que maiores concentrações de lactato acarretariam modificações nas tonalidades de vermelho e amarelo da carne. Além dessas, o glicogênio apresentou correlação de -0,4188 com força de cisalhamento aos 7 dias, assim como o lactato apresentou correlação de -0,4375 com a* aos 14 dias. Ou seja, quanto maior a concentração do glicogênio no músculo mais macia é a carne, e, quanto maior a concentração de lactato mais clara é a carne.

3.4 Conclusões

- (i) Animais castrados apresentam pH 24 horas menores e carnes mais macias ao sétimo e 14º dias de maturação;
- (ii) Animais castrados apresentam concentrações de cortisol (*in vivo* e *post mortem*) e lactato significativamente superiores aos não-castrados;
- (iii) Maiores estudos são necessários avaliando as relações entre hormônios da esfera reprodutiva de machos com os níveis de cortisol, em animais castrados e não-castrados.

Referências

ABBA, M.G.; FELICIANO, M.A.R.; VICENTE, W.R.R. Características da carcaça e Qualidade da carne de bezerros submetidos à Orquietomia por método de Castração Russa e com Burdizzo. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.18, p.1-12, 2012.

ABULARACH, M.L.S.; ROCHA, C.E.; FELÍCIO, P.E. Características de qualidade do contrafilé (m. *L. dorsí*) de touros jovens da raça Nelore. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.18, p.205-210, 1998.

ALVES, D.D. et al. Maciez da carne bovina. **Ciência Animal Brasileira**, v.6, p.135-149, jul./set. 2005.

ALVES, D.D.; MANCIO, A.B. Maciez da Carne Bovina – Uma revisão. **Revista da FZVA**, v.14, p.193-216, 2007.

AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION – AMSA. **American Meat Science Association and National Live Stock and Meat Board**, Chicago, 1995.

BARBOSA, I.D.; OSÓRIO, M.T.M.; SOARES, G.J.D. Influência da genética de bovinos na velocidade do metabolismo *post mortem*. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.6, p.243-347, 2000.

CAINE, W.R. et al. Relationship of texture profile analysis and Warner-Bratzler shear force with sensory characteristics of beef rib steaks. **Meat Science**, v. 64, p. 333-339, 2003.

CARROLL, J.A.; FORSBERG, N.E. Influence of Stress and Nutrition on Cattle Immunity. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.23, p.105-149, 2007.

CHAMBAZ, A. et al. Meat Quality of Angus, Simmental, Charolais and Limousin steers compared at the same intramuscular fat content. **Meat Science**, v.63, p.491-500, 2003.

CROUSE, J.D.; SEIDEMAN, S.C.; CROSS, H.R. The effects of carcass electrical stimulation and cooler temperature on the quality and palatability of bull and steer beef. **Journal of Animal Science**, v.56, p.81-90; 1983.

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.

FIELD, R.A. Effect of castration on meat quality and quantity. **Journal of Animal Science**, v.32, p.849-858, 1971.

GRANDIN, T. Assessment of Stress during handling and transport. **Journal of Animal Science**, v.75, p.249-257, 1997.

HUFF-LONERGAN, E.; PARRISH JR, F.C.; ROBSON, R.M. Effects of *post mortem* aging time, animal age, and sex on degradation of titin and nebulin in bovine *longissimus* muscle. **Journal of Animal Science**, v.73, p.1064-1073, 1995.

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.

JURUENA, M.F.; CLEARE, A.J.; PARIANTE, C.M. O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, a função dos receptores de glicocorticoides e sua importância na depressão. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.3, p.189-201, 2004.

KANITZ, E. et al. A single exposure to social isolation in domestic piglets activates behavioural arousal, neuroendocrine stress hormones, and stress-related gene expression in the brain. **Physiology & Behavior**, v.98, p.176-185, mai. 2009.

KOÉWIN-PODSIADLA, M.; KRZECIO, E.; PRZYBYLSKI, W. Pork quality and methods of its evaluation – a review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v.3, p.241-248, 2006.

KUSS, F. et al. Qualidade da carne de novilhos terminados em confinamento e abatidos aos 16 ou 26 meses de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.924-931, 2010.

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.

LIVISAY, S.A.; XIONG, Y.L.; MOODY, W.G. Proteolytic Activity and Calcium effect in Dark-firm-dry and Pale-soft-exudative Meat. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v.29, p.123-128, 1996.

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

MILLER, M.F.; CROSS, H.R.; BUICK, M.J. Bovine *Longissimus dorsi* Muscle Glycogen and Color Response as Affected by Dietary Regimen and *post mortem* Electrical Stimulation in Yong Bulls. **Meat Science**, v.19, p.253-263, 1987.

MORGAN, J.B. et al. Meat tenderness and the calpain proteolytic system in *Longissimus* muscle of young bulls and steers. **Journal of Animal Science**, v.71, p.1471-1476, 1993.

MORMÈDE, P. et al. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. **Physiology & Behavior**, v.92, p.317-339, 2007.

MÖSTL E.; PALME, R. Hormones as indicators of stress. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.67-74, 2002.

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.

PINTO, L.F.B. et al. Qualidade de carne e de carcaça em bovinos da raça Nelore. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO ANIMAL, 7., 2008, São Carlos. **Anais...** São Paulo: SBMA, 2008.

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

REDBO, I. Relations between oral stereotypes, open-field behavior, and pituitary-adrenal system in growing dairy cattle. **Physiology & Behavior**, v. 64, p.273-278, jun. 1998.

REECE, W.O. Endocrinologia. In: REECE, W.O. **Fisiologia de animais domésticos**. São Paulo: Editora Roca LTDA, 1996. Cap. 14, p.327-342.

RESTLE, J.; GRASSI, C.; FEIJÓ, G.L.D. Características de carcaça de bovinos de corte não-castrados ou castrados em diferentes idades. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.29, p.1603-1607, out. 1994.

RODRIGUES, V.C.; ANDRADE, I.F. Características Físico-Químicas de Bubalinos e de Bovinos Castrados e Não-castrados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, p.1839-1849, 2004.

SANTOS, C.C. **Impacto em características qualitativas de carne bovina *in natura* decorrente do manejo nutricional e de tecnologias pós-abate, e sua relação com o grupo genético**. 2011. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

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.

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

VAZ, F.N. et al. Qualidade e Composição Química da Carne de Bovinos de Corte Não-castrados ou Castrados de Diferentes Grupos Genéticos Charolês x Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, p.518-525, 2001.

VAZ, F.N.; RESTLE, J. Aspectos qualitativos da carcaça e da carne de machos Hereford, não-castrados ou castrados, abatidos aos quatorze meses. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.1894-1901, 2000.

VILJOEN, H.F.; KOCK, 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.

VOISINET, B.D. et al. *Bos Indicus*-Cross Feedlot Cattle with Excitable Temperaments have Tougher Meat and a Higher Incidence of Borderline Dark Cutters. **Meat Science**, v.46, p.367-377, 1997.

WULF, D. M. et al. Relationships among glycolytic potencial, dark cutting (dark, firm, and dry) beef, and cooked beef palatability. **Journal of Animal Science**, v.80, p.1895-1903, 2011.

ZAVY, M.T. et al. Effect of initial restraint, weaning, and transport stress on baseline and ACTH-stimulated cortisol responses in beef calves of different genotypes. **American Journal of Veterinary Research**, v.53, p.551–557, 1992.

ZILIO, D.M. et al. Effect of castration and crossbreeding on meat quality traits of Maremmana beef cattle. **Italian Journal of Animal Science**, v.8, p.516-518, 2009.

4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE RECEPTORES MINERALOCORTICOIDES E GLICOCORTICOIDES EM RELAÇÃO A CARACTERÍSTICAS ENDÓCRINAS E METABÓLICAS E INDICADORAS DE QUALIDADE DE CARNE

Resumo

O cortisol tem sua ação mediada por receptores corticosteroides intracelulares, o receptor mineralocorticoide (MR) e o receptor glicocorticoide (GR). O MR age na regulação da secreção de ACTH durante a queda gradual da secreção de cortisol. Já o GR é mais importante na regulação da resposta ao estresse, quando os níveis de glicocorticoides são aumentados. Os objetivos do presente estudo foram: (i) avaliar as expressões gênicas dos receptores MR/NR3C2 e GR/NR3C1 entre animais com diferentes genótipos para SNPs em MR e GR; (ii) avaliar a relação de características endócrinas e metabólicas indicadoras da qualidade da carne com as expressões gênicas do MR e GR, e, suas possíveis implicações em bovinos Nelore. Para tal, 130 animais foram abatidos entre os anos de 2009 e 2011. Para as análises endócrinas, o sangue dos animais foi coletado *in vivo* e *post mortem*. Para a quantificação do glicogênio e lactato, extração de RNA, e análises físico-químicas as amostras foram retiradas do músculo *Longissimus dorsi* (entre a 10^a e 13^a costelas). Para as análises de expressão gênica, foram determinados os genótipos dos animais para três marcadores relacionados ao MR (MR1_1, MR1_2 e MR1_3) e dois ao GR (GR2_1 e GR2_2). Foi verificado que o marcador MR1_3 apresenta expressão gênica diferenciada. Os animais com genótipo GA apresentam 57,27% mais transcritos quando comparados aos animais GG. A expressão gênica do MR e GR foi significativamente relacionada às concentrações de cortisol *in vivo* e *post mortem*, porém não influenciou as concentrações de ACTH (*in vivo* e *post mortem*), glicogênio e lactato, bem como, não foi relacionada às características indicadoras da qualidade da carne.

Palavras-chave: cortisol; estresse; maciez; zebuínos

Abstract

Cortisol has an effect mediated by intracellular corticosteroids receptors, the mineralocorticoid receptor (MR) and glucocorticoid receptor (GR). The MR acts in the regulation of ACTH secretion during gradual decrease in cortisol secretion. Since, GR is more important in regulating the stress response, when glucocorticoid levels are increased. The objectives of this study were: (i) assess the gene expression of MR/NR3C2 and GR/NR3C1 receptors between animals with different genotypes for SNPs in MR and GR, (ii) evaluate the relationship of endocrine and metabolic characteristics indicative of meat quality with the gene expressions of MR and GR, and its possible implications in Nellore cattle. To this end, 130 animals were slaughtered between 2009 and 2011. For endocrine analyzes, blood was collected *in vivo* and *post mortem*. For quantification of glycogen and lactate, RNA extraction, and physicochemical analyzes the samples were from *Longissimus dorsi* muscle (between the 10th and 13th ribs). For the gene expression analyzes, genotypes of the animals were determined for three markers related to MR (MR1_1, and MR1_2 MR1_3) and two to GR (GR2_1 and GR2_2). Gene expression of MR1_3 was significantly different. Animals with GA genotype had 57.27% more transcripts than GG genotype. The gene expression of MR and GR was significantly related to cortisol concentrations *in vivo* and *post mortem*, but did not influence the concentrations of ACTH (*in vivo* and *post mortem*), glycogen and lactate, as it was not related to the characteristics of meat quality.

Keywords: cortisol; stress; tenderness; zebu

4.1 Introdução

O Brasil possui um rebanho de aproximadamente 213 milhões de cabeças (IBGE, 2012), composto majoritariamente por animais *Bos taurus indicus* (zebuínos) e por produtos de seu cruzamento com animais *Bos taurus taurus*. Os animais zebuínos apresentam grande rusticidade, caracterizada pela adaptação às condições climáticas das regiões tropicais e pela resistência a parasitas, bem como algumas doenças infectocontagiosas. Porém, em relação à maciez da carne, quanto maior a porcentagem de zebuíno no cruzamento, mais dura é a carne (JOHNSON et al., 1990; RESTLE et al., 1999).

As exigências pela qualidade da carne estão cada vez maiores tanto no mercado internacional como no nacional. O termo qualidade abrange um conceito bastante amplo, envolvendo aspectos que englobam todas as etapas da cadeia agroindustrial, desde o nascimento do animal até a obtenção do produto final. A carne deve atender as exigências do consumidor em termos de preço, cuidados sanitários e nutritivos, além de qualidades organolépticas, relacionadas à cor, sabor, maciez, suculência e aspecto visual (FELÍCIO, 1999).

Segundo Ferguson e Warner (2008) o estresse tem efeito direto na qualidade da carne dos animais. O estresse desencadeia uma série de respostas fisiológicas no corpo dos animais, principalmente pela ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e o sistema nervoso simpático (ELENKOV et al., 2000).

O eixo HPA controla a síntese e liberação de hormônios glicocorticoides. Estes hormônios interagem com seus receptores em vários tecidos-alvo, incluindo o eixo HPA, onde são responsáveis pela inibição negativa da secreção do ACTH (hormônio adrenocorticotrópico) pela pituitária e do CRH (hormônio liberador de corticotropina) a partir do hipotálamo. O cortisol é o principal hormônio glicocorticoide em bovinos (MORMÈDE et al., 2007), e, em situações de estresse sua concentração é aumentada acima dos níveis normais.

O cortisol tem sua ação mediada por receptores corticosteroides intracelulares, o receptor mineralocorticoide (MR) e o receptor glicocorticoide (GR). O MR tem alta afinidade pelos corticosteroides endógenos, desempenhando um papel na regulação das flutuações circadianas desses hormônios, especialmente na secreção de ACTH durante a queda gradual da secreção de cortisol. Já o GR possui menor afinidade pelos corticosteroides endógenos, sendo mais importante na

regulação da resposta ao estresse, quando os níveis de glicocorticoides são aumentados (JURUENA; CLEARE; PARIANTE, 2004; BAES et al., 2012).

Alguns trabalhos (DERIJK, 2009; MURÁNI et al., 2010) encontraram a associação de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) encontrados no gene GR (NR3C1) e no MR (NR3C2), com cortisol na resposta ao estresse. Muráni et al. (2010) encontraram uma associação entre o SNP NR3C1 com a concentração do cortisol ao estudarem comportamento agressivo em suínos.

Poletto et al. (2006) associaram a expressão gênica do MR e GR no córtex frontal e hipocampo de suínos encontrando diferenças na expressão dos genes em animais expostos ao estresse da desmama precoce. Sloboda et al. (2008) utilizou a expressão do MR e GR ao estudar o efeito do cortisol em ovinos em fase gestacional e pós-natal. Kanitz et al. (2009) estudaram o efeito do estresse por isolamento em suínos através da expressão gênica do MR e GR no hipotálamo, hipocampo e amígdala dos animais, encontrando diferenças significativas na expressão desses genes em animais estressados em relação ao grupo controle.

Deste modo, os objetivos deste trabalho foram: (i) avaliar as expressões gênicas dos receptores MR/NR3C2 e GR/NR3C1 entre animais com diferentes genótipos para SNPs em MR e GR; (ii) avaliar características endócrinas (cortisol e ACTH), metabólicas (glicogênio e lactato) e indicadoras da qualidade da carne em relação às expressões gênicas do MR e GR, em bovinos da raça Nelore.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Animais

Cento e trinta animais da raça Nelore, castrados e não-castrados, foram recriados a pasto e terminados em confinamento na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP) pelo período de 2009 a 2011. Os animais faziam parte do projeto Jovem Pesquisador apoiado pela FAPESP (Proc. Nº 07/04445-6).

Todos 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. E, bagaço de cana de açúcar (15%) como fonte de volumoso.

Nos três anos do experimento foram criados animais de diferentes safras, sendo 43 animais em 2009, 43 em 2010 e 44 em 2011. Ao final do período de confinamento (59, 79, 114 e 128 dias), os animais foram abatidos com idade de aproximadamente 24 meses e peso médio de 508 kg.

4.2.2 Amostras

As amostras foram coletadas em dois períodos, sendo o primeiro realizado antes do abate dos animais (*in vivo*), e, o segundo logo após o abate (*post mortem*). A coleta *in vivo* ocorreu durante a pesagem dos animais, onde, por punção na veia jugular, foi coletado sangue em microtubos contendo Heparina Sódica (Sufficient Sodium Heparin^N de 10mL; marca BD Vacutainer[®]), para posterior obtenção de plasma para as dosagens endócrinas.

Os animais foram transportados em caminhão boiadeiro até o Matadouro Escola do Campus de Pirassununga (aproximadamente 500m), onde foram abatidos de acordo com os procedimentos humanitários, conforme exige a legislação brasileira. A coleta *post mortem* ocorreu durante a exanguinação dos animais. Em seguida, os animais foram esfolados, eviscerados, e as carcaças foram divididas e lavadas, conforme procedimento padrão do matadouro.

Durante os abates, aproximadamente 15 minutos *post mortem*, foram coletadas amostras do músculo *Longissimus dorsi*, de cada carcaça, entre a 12^a e a 13^a costela na direção caudal. As amostras foram cortadas e embaladas individualmente em papel alumínio e, armazenadas em Nitrogênio líquido, para posterior mensuração do glicogênio e lactato muscular, tal como, para expressão gênica através da extração de RNA do músculo.

As carcaças, já seccionadas verticalmente, foram refrigeradas em câmara fria, com temperatura entre 0 e 2 °C, por 24h. No momento da desossa, foram retiradas três amostras de bifes (2,5 cm de largura) do músculo *Longissimus dorsi*, na região entre a 10^a e 12^a costelas, para maturação e análises de maciez. As amostras foram identificadas e a cor objetiva (L*, a*, b*) foi determinada utilizando um colorímetro portátil (CM-2500d, marca Konica Minolta). Na sequência as amostras foram embaladas individualmente a vácuo em filme plástico de alta barreira (mod. BB3; marca Cryovac) e colocadas em câmara fria à temperatura de 0 a 2 °C, para maturação da carne.

4.2.3 Análises físico-químicas

4.2.3.1 pH e temperatura

O pH e a temperatura foram mensurados a 1 hora e 24 horas *post mortem*, na altura da 12ª costela, com auxílio de um medidor digital portátil de pH e temperatura com sonda de penetração (mod. NT-PHP; marca Tecnal).

4.2.3.2 Cor

A determinação objetiva da cor foi realizada na desossa e nas análises de maciez. O aparelho utilizado para tal foi um colorímetro portátil (CM-2500d, Konica Minolta), através da escala L^* , a^* , b^* , do sistema CIE Lab, com fonte de luz de D65, ângulo de observação de 10° e abertura da célula de medida 30mm.

4.2.3.3 Perdas por Cocção (PPC) e Força de Cisalhamento (FC)

Ao final dos períodos de maturação (um, sete e 14 dias), os bifes foram pesados e assados, conforme metodologia proposta pela AMSA (1995).

Ao serem retirados da embalagem foram pesados (P_i) e colocados sobre grades em bandejas de alumínio previamente identificadas. Os bifes foram assados, e, ao atingirem a temperatura de 71°C foram retirados do forno até atingirem a temperatura ambiente. Por fim, os bifes foram pesados novamente (P_f), embalados com filme plástico e acondicionados em geladeira a 5°C até o dia seguinte.

As perdas por cocção (PPC) foram determinadas pela diferença de peso da amostra antes (P_i) e depois (P_f) do cozimento, ou seja $[PPC = (P_i - P_f)/P_i]$, expressa em %.

Para a determinação da força de cisalhamento (ou maciez, em Kg) utilizou-se os bifes assados no dia anterior, dos quais foram retirados 6 cilindros de 13mm de diâmetro, com auxílio de um vazador elétrico. A maciez da carne foi determinada utilizando-se o aparelho *Warner Bratzler Shear Force*, (com sonda *Warner Bratzler* deslocando-se com velocidade de 500 mm/min), como média de 6 medidas.

4.2.4 Mensuração dos metabólitos

Para mensuração do glicogênio e do lactato muscular a metodologia usada foi proposta por Ramos e Gomide (2007). Brevemente, o procedimento envolve uma desproteinização ácida seguida de neutralização do extrato antes da mensuração dos metabólitos por espectrofotometria.

Após a desproteinização ácida, a espectrofotometria foi realizada através da utilização do *kit EnzyChrom™ Glycogen Assay* (BioAssay Systems) para o glicogênio, e, do *kit EnzyChrom™ L-Lactate Assay* (BioAssay Systems), para o lactato. Ambos foram utilizados conforme as instruções do fabricante.

4.2.5 Mensurações endócrinas

Para mensuração do ACTH e cortisol, amostras de sangue foram coletadas *in vivo* e *post mortem*. Os tubos de coleta foram centrifugados para separação do plasma, e, os mesmos foram mantidos a -20°C até o momento da análise. As análises se deram através dos *kits* imunoenzimáticos da Biomerica (ACTH) e Monobind (cortisol), conforme as instruções dos fabricantes.

4.2.6 Expressão gênica

4.2.6.1 Extração do RNA e Transcrição reversa

No momento do abate foram coletadas amostras para extração do RNA no Laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ/USP. As mesmas foram estocadas em ultrafreezer a -80°C até o momento da extração com solução de Trizol (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante.

Brevemente, o processo iniciava-se com a maceração da carne com Nitrogênio líquido em almofarizes, tomando o devido cuidado para que a amostra não descongelasse até que o reagente Trizol (Invitrogen) fosse adicionado. Em seguida, 200µL de clorofórmio eram adicionados, e, era possível visualizar três fases da reação, superior aquosa (RNA), interfase (clorofórmio, DNA e proteínas desnaturadas) e inferior orgânica (fenol). A fase aquosa era colocada em microtubo limpo onde era adicionado isopropanol para obtenção do *pellet*. O *pellet* era lavado com etanol 75%, e, por fim seco à temperatura ambiente até ficar completamente transparente.

Ao final do processo, a concentração do RNA total recuperado foi mensurada por espectrofotometria (*Biophotometer*, marca Eppendorf). Para avaliação da qualidade do RNA, a relação 260/280, que caracteriza o nível de contaminação de proteínas, deveria apresentar valores próximos a 2,0.

Para avaliar a integridade do RNA extraído a técnica utilizada foi a de eletroforese em gel de Agarose a 1%, como apresentado na Figura 4.1.

Figura 4.1 – Gel de agarose com amostras de RNA extraídas do músculo *Longissimus dorsi* de 11 animais da safra de 2011, demonstrando que o RNA não está fragmentado.

Para a transcrição reversa ou síntese do cDNA (DNA complementar), todas as amostras de RNA quantificadas foram diluídas para 500 ng/μL. Após a diluição, o RNA foi tratado com enzima DNase (*DNase I*, *RNase-free*; marca Thermo Scientific), para degradar qualquer DNA genômico presente na amostra decorrente de possível contaminação durante o processo de extração.

Depois do tratamento com a DNase, a síntese do cDNA foi feita através do *kit ImProm-IITM Reverse Transcription System* (Promega), com algumas modificações do protocolo recomendado pelo fabricante. Como o tratamento com enzima DNase pode causar diminuição da concentração de RNA, foram utilizados 2 μg para garantir uma concentração do RNA em 500 ng/μL. Desta forma, 2 μg foram transcritos reversamente em reações específicas realizadas a 25°C durante 5 minutos, seguido de 42°C por 1 hora e 70°C durante 15 minutos, totalizando 20 μL de cDNA.

4.2.6.2 Desenho dos *primers*

O desenho e a construção dos *primers* para expressão gênica foi baseado no estudo dos genes de interesse receptor glicocorticoide (*NR3C1*) e receptor mineralocorticoide (*NR3C2*). Além destes, dois genes controle, o *EEF1* (Fator de Elongação Eucariótico) e o *RPL 19* (Proteína Ribossomal L19), foram utilizados como referência para quantificação.

A sequência dos genes, para *Bos taurus taurus*, foi encontrada no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e o desenho dos *primers* foi feito através do programa *Primer 3 Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). A avaliação da qualidade dos *primers* foi obtida através do *website* <http://yellow.nist.gov:8444/dnaAnalysis/primerToolsPage.do> do *National Institute of Standards and Technology*. Na Tabela 1 estão reunidas as sequências dos *primers* e seu número de acesso no *GenBank*.

Tabela 4.1. Sequência dos *primers* desenhados para quantificação relativa da expressão gênica.

Gene	Gene ID	Sequência dos <i>Primers</i>
<i>NR3C1</i>	281946	F: CTCCTCCATCCAGTTCCTCA R: GCTGTCCTTCCACTGCTCTT
<i>NR3C2</i>	537614	F: CATCGAGCCCGAGATTGTAT R: GCCCACTTCACAACTTGGAT
<i>EEF1</i>	520875	F: TGCCCTCCGTTGGTATAATC R: TGCCCAAAGCTTTCTTCACT
<i>RPL19</i>	510615	F: GACCGCCACATGTATCACAG R: TTGTCTGCCTTCAGCTTGTG

Gene ID= número de acesso no *GenBank*; F= *primer forward*; R= *primer reverse*.

4.2.6.3 PCR em tempo real

As análises de PCR em tempo real ocorreram no Laboratório de Biotecnologia Animal (ESALQ/USP). Primeiramente, os *primers* foram diluídos para 10 μ M e avaliada sua funcionalidade através de PCR comum com posterior eletroforese em gel de agarose a 1%.

Um *pool* com todas as amostras de cDNA serviu como base para realização de diluição seriada, 2, 4, 8, 16 vezes. Foi observado que a diluição 1/8 (8 vezes) foi

a que demonstrou melhor perfil de amplificação para todos os *primers*. Além disso, foi feito um gradiente de temperatura dos *primers* (58,2°, 60,1°, 62,2° e 64°C), em que a melhor temperatura de anelamento para todos os *primers* foi 60,1-62,2°C, conforme a Figura 4.2.

Figura 4.2 – Gradiente de temperatura com *ladder* e *primers*. Da esquerda para direita (acima): *ladder*, NR3C1 (58,2°, 60,1°, 62,2° e 64°C); NR3C2 (58,2°, 60,1°, 62,2° e 64°C); (abaixo): *ladder*; EEF1 (58,2°, 60,1°, 62,2° e 64°C); RPL19 58,2°, 60,1°, 62,2° e 64°C).

O aparelho utilizado para detecção do nível de expressão gênica foi o *Lightcycler*® 480 (Roche). Todas as reações foram preparadas com volume total de 10µL – microplacas de 96 poços (*LightCycler*® 480 Multiwell Plate 96, white; marca Roche) –, contendo 2µL de cDNA diluído 1/8 vezes, 5µL de *Lightcycler*® 480 SYBR Green I Master (Roche), 0,4µL *primer forward*, 0,4µL *primer reverse* e 2,2µL de água (H_2O , PCR-grade presente no kit *Lightcycler*® 480 SYBR Green I Master – Roche).

4.2.6.4 Determinação da expressão gênica e Eficiência da amplificação

A expressão relativa dos produtos de PCR foi determinada pela equação descrita por Pfaffl (2003):

$$Razão = \frac{(E_{alvo})^{\Delta Ct_{alvo} (controle - amostra)}}{(E_{referência})^{\Delta Ct_{referência} (controle - amostra)}}$$

em que,

Razão = é a expressão relativa entre o gene alvo e o gene referência;

E_{alvo} = é a eficiência da reação de PCR em tempo real do gene alvo;

$E_{referência}$ = é a eficiência da reação de PCR em tempo real do gene referência;

ΔCt_{alvo} = é o desvio (Ct do controle – amostra do gene alvo transcrito);

$\Delta Ct_{referência}$ = é o desvio de (Ct do controle – amostra do gene referência transcrito).

A média de Ct das amostras dos genótipos desfavoráveis foi utilizada como grupo controle para as comparações entre os diferentes grupos avaliados.

Para calcular a eficiência individual das amostras, os dados de fluorescência obtidos no equipamento *Lightcycler*[®] 480 (Roche) foram exportados para o programa *LinRegPCR*. O programa utiliza uma análise de regressão linear dos dados de fluorescência da fase exponencial da PCR para determinar a quantidade de mRNA e a eficiência da amplificação (Equações 2, 3 e 4). Assim, a eficiência das amostras foi ajustada para valores muito próximos ou iguais a 2,0.

$$\log R = \log (E+1) \times n + \log R_0, \text{ slope} = \log [E+1] \quad (2)$$

$$R_0 = 10^{\text{Intercept}} \quad (3)$$

$$E = 10^{\text{Slope} - 1} \quad (4)$$

Através das eficiências individuais das amostras ajustadas pelo programa *LinRegPCR*, foi adotada uma correção para o Ct de cada amostra, corrigido para eficiência 2,0, considerada ideal (Equação 5).

$$Ct_{ij} = \log_2 (E_{\text{gene}_{ij}}^{/ct/-\text{gene}(ij)}) \quad (5)$$

em que,

Ct_{ij} = Ct da amostra corrigido para eficiência 2,0;

$E_{\text{gene}_{ij}}^{/ct/-\text{gene}(ij)}$ = eficiência ajustada pelo *LinRegPCR* elevado o Ct da amostra para o gene.

4.2.7 Análises estatísticas

Para avaliação das expressões gênicas frente aos genótipos de cada marcador utilizado neste trabalho, adotou-se um modelo reduzido que contemplou apenas o efeito fixo de genótipo para o marcador em questão.

Para avaliar as características endócrinas, metabólicas e indicadoras da qualidade da carne, em relação aos resultados associados à técnica de expressão gênica, foi adotado o modelo completo abaixo especificado:

Modelo completo:
$$Y_{ijkl} = \mu + R_i + SA_j + C_k + \beta_1(EG_{ijkl} - EG) + e_{ijkl}$$

em que,

Y_{ijkl} = é o valor para determinada variável endócrina ou relacionada ao potencial glicolítico ou variável indicadora da qualidade da carne observada na amostra do animal i , de condição sexual k , de 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 $i=1, 2, \dots, 28$;

SA_j = efeito fixo do ano e ordem 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);

β_1 = coeficientes de regressão linear da característica Y_{ij-k} em relação à expressão gênica na amostra;

EG_{ijkl} = é a expressão gênica na amostra animal i , de condição sexual k , de ano e ordem de abate j e filho do reprodutor i ;

EG = é a média das expressões gênicas dos animais;

e_{ijkl} = é o erro aleatório associado à variável endócrina ou relacionada ao potencial glicolítico ou variável indicadora da qualidade da carne observada na amostra do animal i , de condição sexual k , de ano e ordem de abate j e filho do reprodutor i , suposto normal e independentemente distribuído, 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 *Statistical Analysis System* (SAS), versão 9.1.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Análises físico-químicas, endócrinas e metabólicas

A Tabela 4.2 apresenta a média dos valores de L^* , a^* e b^* , perdas por cocção e força de cisalhamento ao longo dos três dias de maturação, bem como, as características endócrinas e metabólicas analisadas. Os valores de cortisol e ACTH (*in vivo* e *post mortem*) foram maiores que as concentrações basais destes hormônios em bovinos, 0,2-2 $\mu\text{g/dL}$ para o cortisol (MORMÈDE et al., 2007) e 5-10 pg/mL para o ACTH (REDBO, 1998). Segundo Mormède et al. (2007), o nível de estresse dos animais é medido em comparação com seus níveis basais, de tal maneira que os valores encontrados demonstram que os animais apresentavam algum nível de estresse.

A concentração do glicogênio e lactato esta relacionada com a glicólise *post mortem*, proporcionando o declínio correto do pH no processo de transformação do músculo em carne (KOÉWIN-PODSIADLA; KRZECIO; PRZYBYLSKI, 2006). Os valores médios encontrados para concentração de glicogênio foram ligeiramente mais dispersos aos relatados para bovinos. Para glicogênio, Lahucky et al. (1998) encontraram valores com uma hora *post mortem* variando de 13,6 a 68,7 $\mu\text{mol/g}$ e Sanz et al. (1996) relataram valores entre 14,82 a 55,91 $\mu\text{mol/g}$ em amostras de músculos *Longissimus dorsi* bovino. Para o lactato, a concentração de ácido láctico no músculo *Longissimus dorsi* logo após o abate é de 6-16 $\mu\text{mol/g}$ (RAMOS; GOMIDE, 2007), a variação dos valores encontrados pode estar relacionada com a variação no pH final. Segundo Tornberg (1996) o estresse *ante mortem* é o maior motivo da depleção de glicogênio e lactato no músculo, resultando em altos valores de pH as 24 horas.

Tabela 4.2. Média, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimo e máximo para as características de qualidade de carne, variáveis endócrinas e metabólicas dos animais.

Variável	N	Média	DP	CV	Mínimo	Máximo
Cortisol_IV	130	4,64	2,27	48,83	1,46	13,21
Cortisol_PM	130	6,72	2,68	39,85	1,47	13,91
ACTH_IV	128	16,35	15,36	93,97	0,58	79,99
ACTH_PM	129	10,23	12,99	126,91	0,00	87,19
Glicogênio	130	16,31	7,32	44,91	3,19	72,51
Lactato	130	15,61	8,22	52,67	1,54	49,53
L*1D	129	32,50	7,65	23,53	12,36	44,27
A*1D	129	18,88	4,09	21,65	10,37	29,10
B*1D	129	15,90	4,08	25,64	5,95	23,37
L*7D	130	35,12	5,59	15,93	11,80	44,78
A*7D	130	16,98	3,32	19,57	9,33	26,99
B*7D	130	15,41	3,05	19,79	7,07	24,46
L*14D	119	34,57	6,79	19,64	21,40	46,01
A*14D	119	18,33	3,74	20,43	9,17	28,38
B*14D	119	15,82	2,97	18,77	8,11	27,37
PH1H	129	6,63	0,25	3,72	5,50	7,41
PH24H	130	5,52	0,25	4,45	5,01	6,43
PPC1D	128	23,47	4,63	19,72	9,94	39,22
PPC7D	125	25,19	5,33	21,15	2,28	43,84
PPC14D	130	24,65	4,53	18,35	12,27	41,44
FC1D	130	9,04	2,20	24,30	2,97	15,30
FC7D	130	7,74	1,88	24,22	3,60	13,57
FC14D	130	6,32	1,61	25,50	3,50	10,75

L*, a* e b* foram mensurados após 15 min de exposição da carne ao ambiente, no 1º, 7º e 14º dia *post mortem*; PPC =perda por cocção em %, mensurados no 1º, 7º e 14º dia *post mortem*; FC = valores de força de cisalhamento em quilogramas determinados no 1º, 7º e 14º dia *post mortem*; Cortisol *in vivo* e *post mortem* em µg/dL; ACTH *in vivo* e *post mortem* em pg/mL; Glicogênio e lactato em µmol/g de tecido.

As análises físico-químicas corroboram com as avaliações endócrinas e metabólicas, demonstrando que as alterações nas concentrações de cortisol, ACTH, glicogênio e lactato tiveram efeito sobre a qualidade. O pH as 24 horas *post mortem* apresentou alguns valores acima de 6,0 (máximo 6,43), que, segundo Livisay, Xiong e Moody (1996); Alves e Mancio (2007) já é considerada uma carne DFD. Além disso, valores abaixo de 5,5 (mínimo 5,01) também são indícios de perda na qualidade (IMMONEN et al., 2000). Os valores médios de L*, a* e b* corroboram o

trabalho de Pinto et al. (2008), porém valores altos (máximo 45,02, 28,16 e 25,07 para L*, a* e b*, respectivamente), podem ser indícios de perda de qualidade. Assim como para perdas por cocção (PPC), altos valores também são condizentes com carnes de qualidade ruim.

4.3.2 Genótipos para os marcadores dos genes MR e GR

Os genótipos para cada marcador, bem como, as frequências estão apresentados na Tabela 4.3. A determinação dos genótipos dos animais para três marcadores relacionados ao MR (MR1_1, MR1_2 e MR1_3) e dois ao GR (GR2_1 e GR2_2) foram realizadas por meio de PCR em Tempo Real, utilizando o equipamento *ABI Prism® 7500* (Applied Biosystems) (POLETI et al., 2012a, 2012b). Além disso, por apresentar somente um indivíduo, o genótipo AA do marcador MR1_3 foi excluído das análises.

Tabela 4.3. Frequências genotípicas e alélicas dos marcadores MR1_1, MR1_2, MR1_3, GR2_1 e GR2_2.

Marcadores	Genótipos	N	Freq. Genot. %	Freq. Alélica %
MR1_1	CC	60	46,15	f(C) = 67,70 f(T) = 32,30
	TC	56	43,08	
	TT	14	10,77	
MR1_2	CC	62	47,69	f(C) = 69,24 f(T) = 30,76
	TC	56	43,08	
	TT	12	9,23	
MR1_3	AA	1	0,77	f(A) = 11,92 f(G) = 88,08
	GA	29	22,31	
	GG	100	76,92	
GR2_1	AA	98	75,38	f(A) = 87,69 f(G) = 12,31
	GA	32	24,62	
GR2_2	CC	58	44,62	f(C) = 61,92 f(T) = 38,08
	TC	45	34,62	
	TT	27	20,77	

4.3.3 Quantificação da expressão gênica

As estatísticas descritivas associadas aos resultados das amplificações (*Ct*) dos genes alvo e constitutivos são apresentadas na Tabela 4.4. As eficiências de amplificação dos genes foram corrigidas para 2.0, conforme previamente citado.

Tabela 4.4. Estatísticas descritivas dos resultados das amplificações dos genes alvo e constitutivos.

Gene	N	Ct Médio	DP	CV	Mínimo	Máximo
GR	130	23,62	2,94	12,46	19,19	32,16
MR	123	25,69	2,06	8,01	21,71	32,80
EEF1	123	22,05	2,33	10,56	18,62	29,69
RPL19	123	19,71	1,71	8,70	16,37	25,79

N= número de amostras; *Ct* Médio= *Cycle threshold*; DP= Desvio Padrão; CV= Coeficiente de Variação.

Segundo Giulietti et al. (2001), na quantificação relativa da expressão gênica, a escolha correta dos genes constitutivos para normalizar a expressão do gene alvo na PCR em tempo real é de extrema importância para garantir a credibilidade dos resultados. Perez, Tupac-Yupanqui e Dunner (2008) testaram dez genes candidatos à referência em tecido muscular bovino (músculo *Longissimus dorsi*): 18S, GAPDH, ACTB, B2M, RP11, UBC, HMBS, SF3A1, EEF1A2 e CASC3. Estes autores propuseram que, para expressão de genes em músculo através da técnica de qRT-PCR em tempo real, o SF3A1, EEF1A2 e HBMS são mais apropriados como gene referência.

Do mesmo modo, Carvalho (2012), trabalhando com a expressão gênica em músculo *Longissimus dorsi* de bovinos Nelore, testou a estabilidade de três genes referência, o EEF1, RPL19 e GAPDH. O autor concluiu que, entre os genes referência, o EEF1 teve a menor variação para o estudo do tecido muscular esquelético, podendo ser mais indicado que os genes GAPDH e RPL19. Mesmo com desvio padrão ligeiramente superior em relação ao RPL19, o EEF1 foi escolhido como gene referência para as análises de expressão gênica.

4.3.4 Expressão gênica considerando os diferentes genótipos para os marcadores dos genes MR e GR

Na Tabela 4.5 estão descritas as estimativas das expressões gênicas relativas, considerando os diferentes genótipos para os marcadores dos genes MR e GR. Somente o marcador MR1_3 apresentou diferença significativa na expressão gênica entre os genótipos. Verifica-se que, os animais com genótipo GA apresentaram 57,27% mais transcritos quando comparados aos animais GG.

Tabela 4.5. Estimativas das expressões gênicas relativas (EG), considerando os diferentes genótipos para os marcadores dos genes MR e GR.

Marcador	Genótipo	EG	Erro Padrão
MR1_1	CC	1,295 ^A	0,274
	TC	1,851 ^A	0,290
	TT	2,503 ^A	0,579
MR1_2	CC	1,502 ^A	0,251
	TC	1,385 ^A	0,270
	TT	2,393 ^A	0,586
MR1_3	GA	2,444 ^A	0,430
	GG	1,554 ^B	0,223
GR2_1	AA	7,340 ^A	1,439
	GA	10,324 ^A	2,450
GR2_2	CC	2,073 ^A	0,389
	TC	1,672 ^A	0,463
	TT	0,986 ^A	0,586

Os resumos das análises de variância das expressões gênicas considerando cada marcador avaliado são apresentados na Tabela 4.6. Verifica-se que, na avaliação com o modelo reduzido, o marcador MR1_3 apresentou efeito significativo ($P < 0,07$) para expressão gênica. No modelo reduzido somente foi considerada a expressão gênica frente aos genótipos avaliados.

Tabela 4.6. Resumos das análises de variância (ANOVA) para expressão gênica do MR e GR.

Gene	Efeito	GLNum	GLDen	Pr > F
MR	MR1_1	2	93	0,1208
	MR1_2	2	93	0,2952
	MR1_3	1	94	0,0694
GR	GR2_1	1	93	0,2949
	GR2_2	2	92	0,2972

4.3.5 Avaliação das características endócrinas, metabólicas e indicadoras de qualidade de carne em relação às expressões gênicas

Na Tabela 4.7 estão apresentadas as estimativas dos coeficientes de regressão, erros padrão e probabilidades dos efeitos das expressões gênicas do MR para as características endócrinas e metabólicas, considerando o genótipo de cada marcador. Como pode ser observado, o MR1_1, MR1_2 e MR1_3 apresentaram estimativas negativas em relação ao cortisol *in vivo* ($P < 0,01$) e *post mortem* ($P < 0,10$).

Na Tabela 4.8 encontram-se as estimativas dos coeficientes de regressão, erros padrão e probabilidades dos efeitos das expressões gênicas do GR para as características endócrinas e metabólicas, considerando o genótipo de cada marcador. Tanto o GR2_1 como o GR2_2 apresentaram estimativas negativas em relação ao cortisol *in vivo* ($P < 0,05$).

Quanto ao modo de ação destes receptores, o MR tem alta afinidade com o cortisol, desempenhando um papel fundamental na regulação das flutuações circadianas desse hormônio. Já o GR possui menor afinidade pelo cortisol, sendo mais importante na regulação da resposta ao estresse quando os níveis deste hormônio estão altos (KANITZ; MANTEUFFEL; OTTEN, 1998; JURUENA; CLEARE; PARIANTE, 2004; BAES et al., 2012).

Além disso, o número e a atividade dos receptores influenciam a magnitude da resposta das células-alvo. Frequentemente, aumentos na concentração dos hormônios circulantes resultam em diminuição de receptores nas células-alvo (DICKSON, 1996).

Segundo Kanitz, Manteuffel e Otten (1998), no hipocampo, os MR e GR parecem ser particularmente sensíveis à supressão causada por elevados níveis de

cortisol. O mecanismo de *down-regulation* destes receptores está relacionado com a redução da sensibilidade do eixo HPA, causada pela exposição do organismo a níveis crescentes de cortisol. Estes autores estudaram o efeito do estresse em suínos (leitões e animais adultos), mensurando a concentração de GR no cérebro dos animais, bem como, a concentração de cortisol plasmático dos leitões. Os autores encontraram decréscimo na expressão do GR, em leitões após quatro dias de desmame (hipocampo e amígdala). Também foram observados, aumentos das concentrações de cortisol dois dias após desmame. Nos animais adultos, houve decréscimo na expressão do GR no hipocampo, mensurado após contínuas capturas e contenções.

Preisler et al. (2000), trabalhando com vacas da raça Holandesa, encontraram correlação negativa entre a expressão de receptores glicocorticoides e mineralocorticoides em monócitos e linfócitos, e, concentrações séricas de cortisol. Os autores sugerem que estes receptores sofrem uma regulação negativa nos leucócitos mononucleares de bovinos em associação ao aumento da secreção adrenal de cortisol no parto.

Em trabalhos com leitões, Kanitz et al. (2004) demonstraram que o desmame precoce causa estresse nos animais, aumentando as concentrações de cortisol circulante. Baseando-se neste trabalho, Poletto et al. (2006) estudaram o impacto de três tipos de desmame (desmama precoce aos 10 dias, desmama aos 21 dias e não desmamados) em leitões e implicações na expressão de receptores mineralocorticoides e glicocorticoides. Os autores verificaram que os animais desmamados precocemente, aos 10 dias, tinham menor abundância de mRNA para GR e MR no hipocampo em 48 horas pós-desmame (12 dias), em comparação com os animais não desmamados, sugerindo que o estresse da desmama precoce exerceu influência na expressão do GR e MR. Este trabalho corrobora com os achados de Vazquez et al. (1996) que também encontraram menores expressões de MR e GR no cérebro de roedores desmamados precocemente.

Conforme foi demonstrado na Tabela 4.2, os níveis de cortisol *in vivo* e *post mortem*, estavam aumentados em relação ao nível basal dos animais (0,2-2 µg/dL, segundo MORMÈDE et al., 2007). Os trabalhos citados relataram que, a elevação na concentração do cortisol circulante resultou na diminuição da expressão dos genes dos receptores mineralocorticoide e glicocorticoide. Os achados deste trabalho, realizados no músculo *Longissimus dorsi* de bovinos Nelore, sugerem

comportamento similar aos verificados por Vazquez et al. (1996) em roedores, Preisler et al. (2000) em bovinos, Poletto et al. (2006) em suínos e Sloboda et al. (2008) em ovinos. Para o MR os marcadores apresentam resultados significativos, com estimativas de -0,3213, -0,3477 e -0,3058, para o MR1_1, MR1_2 e MR1_3 respectivamente, em relação ao cortisol *in vivo*. Para cortisol *post mortem*, as estimativas foram -0,1873, -0,2027 e -0,1783, para o MR1_1, MR1_2 e MR1_3, respectivamente. Este decréscimo na expressão do MR tanto *in vivo* como *post mortem*, provavelmente é devido à alta afinidade deste receptor com o cortisol.

O GR, de menor afinidade com o cortisol somente apresentou resultados significativos para as estimativas *in vivo*, -0,1230 e -0,1359 em relação aos marcadores GR2_1 e GR2_2.

Nas Tabelas 4.9 e 4.10 estão apresentadas as estimativas dos coeficientes de regressão, erros padrão e probabilidades das expressões gênicas considerando diferentes marcadores relacionados ao MR e ao GR, em relação às características físico-químicas de qualidade da carne.

Observa-se que, para ambos os genes dos receptores avaliados, não foram verificados resultados significativos das expressões gênicas para com as variáveis indicadoras de qualidade da carne.

Tabela 4.7. Estimativas dos coeficientes de regressão, erros padrão e probabilidades dos efeitos das expressões gênicas do MR para as variáveis endócrinas e metabólicas, considerando o genótipo de cada marcador.

	MR1_1			MR1_2			MR1_3		
Característica	Estimativa	Erro Padrão	Pr > t	Estimativa	Erro Padrão	Pr > t	Estimativa	Erro Padrão	Pr > t
Cortisol_IV	-0,3213	0,0903	0,0006	-0,3477	0,0977	0,0006	-0,3058	0,0860	0,0006
Cortisol_PM	-0,1873	0,1124	0,0992	-0,2027	0,1216	0,0992	-0,1783	0,1069	0,0992
ACTH_IV	-0,3740	0,6432	0,5625	-0,4047	0,6959	0,5625	-0,3559	0,6120	0,5625
ACTH_PM	-0,3803	0,6100	0,5347	-0,4115	0,6600	0,5347	-0,3619	0,5805	0,5347
Glicogênio	0,0509	0,3252	0,8761	0,0550	0,3519	0,8761	0,0484	0,3095	0,8761
Lactato	-0,0915	0,2728	0,7381	-0,0990	0,2952	0,7381	-0,0871	0,2596	0,7381

Tabela 4.8. Estimativas dos coeficientes de regressão, erros padrão e probabilidades dos efeitos das expressões gênicas do GR para as variáveis endócrinas e metabólicas, considerando o genótipo de cada marcador.

	GR2_1			GR2_2		
Característica	Estimativa	Erro Padrão	Pr > t	Estimativa	Erro Padrão	Pr > t
Cortisol_IV	-0,1230	0,0616	0,0490	-0,1359	0,0680	0,0490
Cortisol_PM	-0,0377	0,0756	0,6194	-0,0416	0,0835	0,6194
ACTH_IV	0,1891	0,4232	0,6562	0,2090	0,4677	0,6562
ACTH_PM	-0,0576	0,4061	0,8875	-0,0637	0,4488	0,8875
Glicogênio	-0,0669	0,2144	0,7556	-0,0740	0,2369	0,7556
Lactato	-0,0446	0,1807	0,8057	-0,04928	0,1997	0,8057

Tabela 4.9. Estimativas dos coeficientes de regressão, erros padrão e probabilidades das expressões gênicas considerando diferentes marcadores relacionados ao MR, em relação às características físico-químicas de qualidade da carne.

	MR1_1			MR1_2			MR1_3		
Característica	Estimativa	Erro Padrão	Pr > t	Estimativa	Erro Padrão	Pr > t	Estimativa	Erro Padrão	Pr > t
L*1D	-0,2544	0,1721	0,1433	-0,2752	0,1863	0,1433	-0,2421	0,1638	0,1433
a*1D	-0,0130	0,1091	0,9057	-0,0140	0,1180	0,9057	-0,0123	0,1038	0,9057
b*1D	0,0178	0,0887	0,8414	0,0193	0,0959	0,8414	0,0169	0,0844	0,8414
L*7D	0,1234	0,1685	0,4660	0,1335	0,1823	0,4660	0,1174	0,1603	0,4660
a*7D	-0,0864	0,1055	0,4149	-0,0935	0,1141	0,4149	-0,0823	0,1004	0,4149
b*7D	-0,0204	0,0912	0,8236	-0,0221	0,0987	0,8236	-0,0194	0,0868	0,8236
L*14D	0,0588	0,1904	0,7584	0,0636	0,2060	0,7584	0,0559	0,1812	0,7584
a*14D	-0,0808	0,1005	0,4242	-0,0874	0,1088	0,4242	-0,0769	0,0957	0,4242
b*14D	-0,0220	0,0807	0,7856	-0,0238	0,0873	0,7856	-0,0210	0,0768	0,7856
PH1H	0,0022	0,0101	0,8251	0,0024	0,0109	0,8251	0,0021	0,0096	0,8251
PH24H	0,0034	0,0097	0,7250	0,0037	0,0105	0,7250	0,0032	0,0092	0,7250
PPC1D	-0,0049	0,1788	0,9784	-0,0053	0,1935	0,9784	-0,0046	0,1702	0,9784
PPC7D	-0,0474	0,2389	0,8432	-0,0513	0,2585	0,8432	-0,0451	0,2274	0,8432
PPC14D	-0,1365	0,1862	0,4656	-0,1477	0,2015	0,4656	-0,1299	0,1772	0,4656
FC1D	0,0658	0,0772	0,3970	0,0711	0,0836	0,3970	0,0626	0,0735	0,3970
FC7D	0,1130	0,0764	0,1427	0,1223	0,0826	0,1427	0,1075	0,0727	0,1427
FC14D	-0,0573	0,0689	0,4081	-0,0619	0,0745	0,4081	-0,0545	0,0655	0,4081

Tabela 4.10. Estimativas dos coeficientes de regressão, erros padrão e probabilidades das expressões gênicas considerando diferentes marcadores relacionados ao GR, em relação às características físico-químicas de qualidade da carne.

Característica	GR2_1			GR2_2		
	Estimativa	Erro Padrão	Pr > t 	Estimativa	Erro Padrão	Pr > t
L*1D	-0,0466	0,1140	0,6839	-0,0515	0,1260	0,6839
a*1D	0,0074	0,0729	0,9189	0,0082	0,0805	0,9189
b*1D	0,0137	0,0585	0,8159	0,0151	0,0646	0,8159
L*7D	-0,0206	0,1133	0,8559	-0,0228	0,1252	0,8559
a*7D	0,0796	0,0698	0,2570	0,0880	0,0771	0,2570
b*7D	0,0520	0,0605	0,3926	0,0574	0,0668	0,3926
L*14D	-0,0848	0,1538	0,5830	-0,0937	0,1699	0,5830
a*14D	0,0976	0,0823	0,2393	0,1078	0,0909	0,2393
b*14D	0,0276	0,0658	0,6755	0,0305	0,0727	0,6755
pH 1H	-0,0015	0,0068	0,8251	-0,0017	0,0075	0,8251
pH 24H	-0,0011	0,0064	0,8674	-0,0012	0,0071	0,8674
PPC1D	0,0471	0,1177	0,6900	0,0521	0,1300	0,6900
PPC7D	0,0978	0,1575	0,5364	0,1081	0,1740	0,5364
PPC14D	0,0428	0,1241	0,7314	0,0473	0,1372	0,7314
FC1D	0,0394	0,0511	0,4427	0,0436	0,0565	0,4427
FC7D	0,0551	0,0508	0,2816	0,0609	0,0562	0,2816
FC14D	-0,0221	0,0459	0,6320	-0,0244	0,0507	0,6320

4.4 Conclusões

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que:

- (i) O marcador MR1_3 apresenta expressão gênica significativamente diferenciada. Os animais com genótipo GA apresentaram 57,27% mais transcritos quando comparados aos animais GG;
- (ii) As variações nas expressões gênicas são significativamente relacionadas às concentrações de cortisol *in vivo* e *post mortem*;
- (iii) As variações nas expressões gênicas não influenciam as concentrações de ACTH (*in vivo* e *post mortem*), glicogênio e lactato;
- (iv) As variações nas expressões gênicas não estão relacionadas às características indicadoras da qualidade da carne.

Referências

ALVES, D.D.; MANCIO, A.B. Maciez da Carne Bovina – Uma revisão. **Revista da FZVA**, v.14, p.193-216, 2007.

AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION – AMSA. **American Meat Science Association and National Live Stock and Meat Board**, Chicago, 1995.

BAES, C.V.W. et al. Assessment of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor function in depression with early life stress – a systematic review. **Acta Neuropsychiatrica**, v.24, p.4-15, 2012.

CARVALHO, M.E. **Estudo de genes associados com a maciez da carne em bovinos da raça Nelore**. 2012. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

DERIJK, R.H. Single nucleotide polymorphisms related to HPA axis activity. **Neuroimmunomodulation**, v.16, p.340-352, 2009.

DICKSON, W.M. Glândulas Endócrinas. In: SWENSON, M.J.; REECE, W.O. **Dukes/Fisiologia dos Animais Domésticos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1996. cap. 34, p.571-602.

ELENKOV, I.J. et al. The sympathetic nerves an integrative inter-face between two Supersystems: the Brain and the Immune System. **Pharmacological Reviews**, v.52, p.595–638, dez. 2000.

FELÍCIO, P.E. Qualidade da carne bovina: Características físicas e organolépticas. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37., 1999, Porto Alegre. **Anais...** Rio Grande do Sul: SBZ, 1999.

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.

GIULIETTI, A. et al. Na Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. **Methods**, v.25, p.386-401, 2001.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/default.php>>. Acesso em: 26 dez. 2012.

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.

JOHNSON, D.D. et al. Effects of percentage Brahman and Angus breeding, age-season of feeding and slaughter end point on meat palatability and muscle characteristics. **Journal of Animal Science**, v.68, p.1980-1986, 1990.

JURUENA, M.F.; CLEARE, A.J.; PARIANTE, C.M. O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, a função dos receptores de glicocorticoides e sua importância na depressão. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.3, p.189-201, 2004.

KANITZ, E. et al. A single exposure to social isolation in domestic piglets activates behavioural arousal, neuroendocrine stress hormones, and stress-related gene expression in the brain. **Physiology & Behavior**, v.98, p.176-185, mai. 2009.

KANITZ, E. et al. Consequences of repeated early isolation in domestic piglets (*Sus scrofa*) on their behavioural, neuroendocrine, and immunological responses. **Brain, Behavior, and Immunity**, v.18, p.34-45, 2004.

KANITZ, E.; MANTEUFFEL, G.; OTTEN, W. Effects of weaning and restraint stress on glucocorticoid receptor binding capacity in limbic areas of domestic pigs. **Brain Research**, v.804, p.311-315, 1998.

KOÉWIN-PODSIADLA, M.; KRZECIO, E.; PRZYBYLSKI, W. Pork quality and methods of its evaluation – a review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v.3, p.241-248, 2006.

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.

LIVISAY, S.A.; XIONG, Y.L.; MOODY, W.G. Proteolytic Activity and Calcium effect in Dark-firm-dry and Pale-soft-exudative Meat. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v.29, p.123-128, 1996.

MORMÈDE, P. et al. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. **Physiology & Behavior**, v.92, p.317-339, 2007.

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.

PEREZ, R.; TUPAC-YUPANQUI, I.; DUNNER, S. Evaluation of suitable reference genes for gene expression studies in bovine muscular tissue. **BMC Molecular Biology**, v.9, p.79-85, set. 2008.

PFFAFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acid Research**, v.339, p.62-66, 2003.

PINTO, L.F.B. et al. Qualidade de carne e de carcaça em bovinos da raça Nelore. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO ANIMAL, 7., 2008, São Carlos. **Anais...** São Paulo: SBMA, 2008.

POLETI, M.D et al. Effects of single nucleotide polymorphisms in mineralocorticoid and glucocorticoid receptors genes as molecular marker in beef cattle. In: RECIPROCAL MEAT CONFERENCE, 65.. 2012a, Fargo. **Anais...** Estados Unidos: RMC, 2012a.

POLETI, M.D et al. Evaluation of single nucleotide polymorphisms in glucocorticoid and mineralocorticoid receptors on meat quality, neuroendocrine and metabolic traits. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY, 58.. 2012b, Montreal. **Anais...** Canada: ICoMST, 2012b.

POLETTI, R. et al. Effects of early weaning and social isolation on the expression of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor and 11 β -hydrogenase 1 and 2 mRNAs in the frontal cortex and hippocampus of piglets. **Brain Research**, v.1067, p.36-42, 2006.

PREISLER, P.S.D. et al. Glucocorticoid Receptor Expression Profiles in Mononuclear Leukocytes of Periparturient Holstein Cows. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.38-47, 2000.

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

REDBO, I. Relations between oral stereotypes, open-field behavior, and pituitary-adrenal system in growing dairy cattle. **Physiology & Behavior**, v. 64, p.273-278, jun. 1998.

RESTLE, J. et al. Características de Carcaça e de Carne de Novilhos de Diferentes Genótipos de Hereford x Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.28, p.1245-1251, 1999.

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.

SLOBODA, D.M. et al. Expression of glucocorticoid receptor, mineralocorticoid receptor, and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 and 2 in the fetal and postnatal ovine hippocampus: ontogeny and effects of prenatal glucocorticoid exposure. **Journal of Endocrinology**, v.197, p.213-220, 2008.

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

VAZQUEZ, D.M. et al. Regulation of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNAs in the hippocampus of maternally deprived infant rat. **Brain Research**, v.731, p.79-90, 1996.