



X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal  
Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

## **Avaliação da expressão gênica dos receptores mineralocorticoide e glicocorticoide em relação a características endócrinas associadas ao estresse em bovinos Nelore**

**Bárbara Silva<sup>1</sup>, Mirele Daiana Poleti<sup>2</sup>, Alessandra Fernandes Rosa<sup>2</sup>, Gustavo Gasparin<sup>2</sup>, Luiz Lehmann Coutinho<sup>3</sup>, Júlio César de Carvalho Balieiro<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da FZEA/USP, Pirassununga. e-mail: [barbarasilva@usp.br](mailto:barbarasilva@usp.br)

<sup>2</sup>Pós-Doutorandos da USP

<sup>3</sup>Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP, Piracicaba.

<sup>4</sup>Departamento de Ciências Básicas da FZEA/USP, Pirassununga.

**Resumo:** O cortisol é o principal hormônio glicocorticoide em bovinos, e, em situações de estresse tem suas concentrações aumentadas. Sua ação é mediada por receptores mineralocorticoides (MR) e glicocorticoides (GR). O objetivo deste estudo foi avaliar características endócrinas associadas à resposta ao estresse (cortisol e ACTH), em relação às expressões gênicas do MR e do GR no músculo *Longissimus dorsi* de animais da raça Nelore. Foram abatidos 130 animais entre os anos de 2009 e 2011. Para as análises endócrinas, o sangue dos animais foi coletado *in vivo* e *post mortem*. Para extração de RNA amostras do músculo foram retiradas no momento do abate e as análises de expressão gênica, foram determinados entre os genótipos dos animais para três marcadores relacionados ao MR e dois ao GR. 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*).

**Palavras-chave:** ACTH, cortisol, eixo HPA, zebrinos

### **Gene expression evaluation of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in relation to endocrine characteristics associated with stress in Nelore**

**Abstract:** Cortisol is the main glucocorticoid hormone in cattle, and stressful situations increase its concentration. Its action is mediated by mineralocorticoid (MR) and glucocorticoid receptors (GR). The aim of this study was to evaluate some traits associated with endocrine stress response (cortisol and ACTH levels), in relation to gene expression of MR and GR in *Longissimus dorsi* muscle of Nelore cattle. Were slaughtered 130 animals between 2009 and 2011. For endocrine analyzes, blood was collected *in vivo* and *post mortem*. For RNA extraction, muscle samples were removed at slaughter and gene expression analyzes, were performed between genotypes of the animals for three markers related to MR and two to GR. 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*).

**Keywords:** ACTH, cortisol, HPA axis, zebu

### **Introdução**

O eixo HPA (Hipotálamo-pituitária-adrenal) 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). Derijk (2009) e Muráni et al. (2010) encontraram associação de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) encontrados no gene GR (NR3C1) e no MR (NR3C2), com cortisol na resposta ao estresse.

Deste modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar características endócrinas associadas à resposta ao estresse (cortisol e ACTH), em relação às expressões gênicas do MR e do GR no músculo *Longissimus dorsi* de animais da raça Nelore.



### Material e Métodos

Foram utilizados 130 animais criados a pasto e terminados em confinamento, pelo período de 2009 a 2011, abatidos com 24 meses e 508 kg, em média. Para as dosagens endócrinas – cortisol e ACTH – foram realizadas duas coletas, *in vivo* e *post mortem*, onde o sangue dos animais foi coletado para obtenção do plasma. As análises se deram através dos kits imunoenzimáticos da Biomerica (ACTH) e Monobind (cortisol), conforme as instruções dos fabricantes.

Para extração de RNA, no momento do abate foram coletadas amostras de 1g de músculo, estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A transcrição reversa se deu através do *kit ImProm-IITM Reverse Transcription System* (Promega). Os genes alvo avaliados foram NR3C1, para o GR, e NR3C2, para o MR. Os genes constitutivos avaliados foram o EEF1 e o RPL19. Para detecção dos níveis de expressão gênica utilizou-se o *kit Lightcycler® 480 SYBR Green I Master* (Roche) e o equipamento *Lightcycler® 480* (Roche). 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). As expressões relativas dos produtos de PCR foram determinadas de acordo com (Pffaf, 2003). Para avaliação das características endócrinas em relação aos resultados associados à técnica de expressão gênica foi utilizado o procedimento PROC MIXED do programa *Statistical Analysis System* (SAS), versão 9.1.3.

### Resultados e Discussão

As variáveis endócrinas, cortisol e ACTH (*in vivo* e *post mortem*) encontram-se na Tabela 1. Foram observados valores médios superiores a suas concentrações basais em bovinos, 0,2-2  $\mu\text{g/dL}$  para o cortisol reportados por Mormède et al. (2007) e 5-10  $\text{pg/mL}$  para o ACTH relatados por 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.

Tabela 1. Estimativas de média, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimo e máximo para as variáveis cortisol *in vivo* (IV) e *post mortem* (PM) e ACTH *in vivo* (IV) e *post mortem* (PM).

Variável	N	Média	DP	CV	Mínimo	Máximo
Cortisol IV ( $\mu\text{g/dL}$ )	130	4,64	2,27	48,83	1,46	13,21
Cortisol PM ( $\mu\text{g/dL}$ )	130	6,72	2,68	39,85	1,47	13,91
ACTH IV ( $\text{pg/mL}$ )	128	16,35	15,36	93,97	0,58	79,99
ACTH PM ( $\text{pg/mL}$ )	129	10,23	12,99	126,91	0,00	87,19

Como pode ser observado nas Tabelas 2 e 3, os marcadores MR1\_1, MR1\_2 e MR1\_3 apresentaram estimativas negativas em relação ao cortisol *in vivo* ( $P < 0,01$ ) e *post mortem* ( $P < 0,10$ ). Da mesma forma, os marcadores GR2\_1 e o GR2\_2 apresentaram estimativas negativas em relação ao cortisol *in vivo* ( $P < 0,05$ ).

Segundo Kanitz et al. (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, 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. Também foram observados, aumentos das concentrações de cortisol em animais que sofreram estresse pela desmama precoce.

Quanto ao modo de ação destes receptores, o MR tem alta afinidade com o cortisol, desempenhando papel fundamental na regulação das flutuações circadianas deste 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 et al., 1998).

Conforme foi demonstrado na Tabela 1, os níveis de cortisol *in vivo* e *post mortem*, estavam aumentados em relação ao nível basal dos animais. Os achados deste trabalho, realizados no músculo



*Longissimus dorsi* de bovinos Nelore, sugerem comportamento similar aos verificados por Kanitz et al. (1998), em que a elevação na concentração do cortisol circulante resultou na diminuição da expressão dos genes dos receptores mineralocorticoide e glicocorticoide.

Tabela 2. Estimativas dos coeficientes de regressão (Estim.), erros padrão (EP) e probabilidades dos efeitos das expressões gênicas do MR para as variáveis endócrinas, considerando o genótipo de cada marcador.

Variável	MR1_1			MR1_2			MR1_3		
	Estim.	EP	Pr> t	Estim.	EP	Pr> t	Estim.	EP	Pr> t
Cortisol IV	-0,3214	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

Tabela 3. Estimativas dos coeficientes de regressão (Estim.), erros padrão (EP) e probabilidades dos efeitos das expressões gênicas do GR para as variáveis endócrinas, considerando o número de alelos favoráveis para cada marcador.

Variável	GR2_1			GR2_2		
	Estim.	EP	Pr> t	Estim.	EP	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

Para o MR, os marcadores avaliados 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 foram observados resultados significativos para as estimativas *in vivo*, de -0,1230 e -0,1359 em relação aos marcadores GR2\_1 e GR2\_2.

### Conclusões

As expressões gênicas dos marcadores relacionados aos receptores mineralocorticoide e glicocorticoide são significativamente relacionadas às concentrações de cortisol *in vivo* e *post mortem*, porém não influenciaram as concentrações de ACTH (*in vivo* e *post mortem*).

### Literatura citada

- DERIJK, R.H. Single nucleotide polymorphisms related to HPA axis activity. **Neuroimmunomodulation**, v.16, p.340-352, 2009.
- 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.
- MORMÈDE, P.; ANDANSON, S. AUPÉRIN, B. 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.; PONSUKSILI, S.; D'EATH, R.B. et al. Association of HPA axis-related genetic variation with stress reativity and aggressive behavior in pigs. **BMC Genetics**, v.11, p.74-84, 2010.
- PFFAFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acid Research**, v.339, p.62-66, 2003.
- 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.