

JULIANA CHAVES DA SILVA

**COLÁGENO INTRAMUSCULAR EM BOVINOS NELORE CASTRADOS E NÃO
CASTRADOS EM DIFERENTES IDADES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2019

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

S586c
2019

Silva, Juliana Chaves, 1977-

Colágeno intramuscular em bovinos Nelore castrados e não castrados em diferentes idades / Juliana Chaves Silva. – Viçosa, MG, 2019.

xi, 34 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Simone Eliza Facioni Guimarães.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Nelore (Bovino). 2. Metaloproteínas. 3. Carne de boi - Qualidade. 4. Corantes e coloração (Microscopia).

I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Medicina Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.20892822

JULIANA CHAVES DA SILVA

**COLÁGENO INTRAMUSCULAR EM BOVINOS NELORE CASTRADOS E NÃO
CASTRADOS EM DIFERENTES IDADES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 26 de fevereiro de 2019.



Luiz Henrique Pereira Silva



Marcelo de Souza Duarte



Mario Luiz Chizzotti
(Coorientador)



Simone Elisa Façioni Guimarães
(Orientadora)

DEDICATÓRIA

A Waldir Chaves (*in memorian*) e
Eny Gonçalves Chaves (*in memorian*)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser meu refúgio e ter me concedido força e perseverança para chegar até esse momento. Ao meu avô (*in memorian*) e minha querida mãe (*in memorian*) que sempre me incentivaram, apesar do breve período em que estivemos juntos. Ao meu pai (*in memorian*) que contribuiu, enquanto teve condições, para minha formação. Agradeço aos meus filhos Yasmin e Arthur, vocês foram toda a inspiração para a realização desse trabalho, sem vocês nada teria sentido! Um agradecimento especial para meu coorientador Mario Luiz Chizzotti pelos ensinamentos, incentivo, apoio e suporte durante grande parte da minha vida acadêmica. Muito obrigada, professor Mario! Não tenho palavras que possam expressar toda minha gratidão ao senhor!

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Medicina Veterinária - DVT, e ao Departamento de Zootecnia - DZO, por proporcionarem toda a estrutura necessária para o meu aprendizado e formação profissional.

A todos os professores do Departamento de Zootecnia - DZO e do Departamento de Medicina Veterinária - DVT que contribuíram com minha formação. Em especial aos professores Fabiano Fonseca, Marcio Duarte, Karina Busato, Mário Paulino, Abelardo Silva Jr, Emily Carlo Reis, Fabrício Valente, Marcia Rogéria, José Domingos e José Dantas.

À professora Maria Verônica por contribuído com a realização de minha pesquisa. À minha orientadora professora Simone, pelo apoio, compreensão, ensinamentos e orientação durante o mestrado.

À Polyana pela amizade, apoio e ensinamentos, sem você seria muito mais difícil. Ao Luiz (Janaúba) por todos os ensinamentos, amizade, compreensão, parceria e toda a ajuda que foram fundamentais para essa conquista, sem você esse trabalho não seria realizado.

Aos funcionários do DVT, em especial o Adão, Rosi e Claudio por todo o apoio durante a realização do experimento. Aos funcionários do DZO, em especial a Fernanda Vieira, Rosana, Alda, Edson, Monteiro, Mario Julião, Mario Sérgio, Raimundo, Venâncio, Mariana, Plínio e Mario Macarrão.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Ciência da Carne (LCC), a Debora Evelyn, Gutierrez e Mauricio (Mexicano). Muito obrigada a ajuda de vocês foi fundamental para este trabalho.

Agradeço aos colegas do Laboratório de biotecnologia animal (LABTEC), em especial ao Walmir e Danielle pela essencial ajuda nas análises de expressão gênica.

Agradeço ao CNPQ, Capes, Fapemig e INCT de Ciência Animal pelo financiamento dessa pesquisa.

A todos que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho, o meu muito OBRIGADA!

BIOGRAFIA

Juliana Chaves da Silva, filha de Olegário Mariano da Silva e Eny Gonçalves Chaves, nasceu em Belo Horizonte, Minas Gerais, em 10 de abril de 1977.

Durante a graduação foi monitora de Fisiologia Animal, Patologia Veterinária e bolsista de iniciação científica do CNPq (PIBIC/CNPq) sob orientação da professora Alessandra Pereira Simonini Gomes. Em 10 de maio de 2014, graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais.

Em março de 2017, iniciou-se o Mestrado em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Viçosa, onde desenvolveu estudos na área de Fisiologia do Crescimento Animal e Qualidade de Carne, submetendo-se à defesa da dissertação em 26 de fevereiro de 2019.

“Qual o valor de viver, se não for para lutar por causas nobres e tornar esse mundo um lugar melhor para que aqueles que viverão nele depois de termos partido? De que outra forma podemos nos colocar em relação harmoniosa com as grandes verdades e consolações do infinito e do eterno? E eu confesso minha fé de que estamos caminhando em direção a dias melhores. A humanidade não será abatida! Estamos prosseguindo, oscilando bravamente para frente, ao longo da grande estrada, e já atrás das montanhas distantes está a promessa do sol.”

Winston Churchill

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL	1
Referências	4
Avaliação dos colágenos presentes na matriz extracelular de bovinos Nelore inteiros e castrados com diferentes idades.	8
RESUMO	9
1. Introdução.....	11
2. Material e métodos	12
3. Resultados.....	17
4- Discussão.....	19
5. Conclusões.....	23
Agradecimentos	24
Referências	24

RESUMO

SILVA, Juliana Chaves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Colágeno Intramuscular em bovinos Nelore castrados e não castrados em diferentes idades.** Orientadora: Simone Eliza Facioni Guimarães. Coorientadores: Mario Luiz Chizzotti. Polyana Coelho Galvão e Laercio dos Anjos Benjamim.

O objetivo neste estudo foi quantificar e verificar o percentual de solubilidade do colágeno intramuscular (IMC), que possa modificar a qualidade da carne de bovinos Nelore castrados e não castrados abatidos aos 9, 13 e 16 meses. Além de investigar se possíveis diferenças na expressão dos genes fibrogênicos e dos marcadores da remodelação do colágeno estariam associadas a diferenças no conteúdo, na solubilidade e nos tipos de IMC. Foram utilizados trinta e seis bezerros Nelore (*Bos taurus indicus*), sendo a metade aleatoriamente selecionada para a castração cirúrgica uma semana antes do desmame. Os bovinos foram confinados e submetidos às mesmas condições experimentais, e seis animais de cada classe sexual foram distribuídos aleatoriamente para serem abatidos quando a média da idade atingisse $9,3 \pm 0,09$, $12,6 \pm 0,05$ e $15,7 \pm 0,07$ meses. Este estudo foi realizado seguindo delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial com 2 condições sexuais (castrado vs. não castrado) e 3 idades de abate (9, 13 e 16 meses). O conteúdo de colágeno total não diferiu entre os tratamentos e também não foram encontradas interações ($P > 0,201$). Os bovinos não castrados apresentaram maior porcentagem de colágeno solúvel ($P = 0,034$) que os castrados, porém não foram encontradas diferenças entre as idades ($P = 0,187$), e também não foram encontradas interações ($P = 0,640$). O percentual de área do colágeno tipo 1 (COL 1) não diferiu entre os tratamentos e também não foram encontradas interações ($P > 0,239$). Foram encontradas interações ($P = 0,023$) entre idade e sexo, onde novilhos abatidos aos 16 meses apresentaram menor percentual de área de colágeno tipo 3 (COL 3) e não foram encontrados efeitos nas classes sexuais ($P = 0,400$) e nas idades ($P = 0,107$). Foram encontradas interações ($P = 0,049$) entre idade e sexo, onde novilhos abatidos aos 16 meses apresentaram menor proporção de área de COL 3 e não foram encontrados efeitos nas classes sexuais ($P = 0,400$) e nas idades ($P = 0,180$). Não foram encontradas diferenças entre os genes fibrogênicos e dos genes marcadores da remodelação do colágeno, e também não foram encontradas interações ($P > 0,220$). Os resultados indicam que a expressão foi constante não interferindo as classes sexuais de animais castrados e não castrados nas idades avaliadas. Conclui-se que como os animais não castrados apresentaram

maior percentual de colágeno solúvel, possivelmente devido ao maior remodelamento da matriz extracelular estimulado pela hipertrofia das fibras musculares, implicando na continuidade do crescimento muscular nessa condição sexual. A redução do percentual e da proporção de área do COL 3 pode estar associada ao menor *turnover* do perimísio em novilhos castrados Nelore aos 15 meses indicando estabilização do crescimento muscular.

ABSTRACT

SILVA, Juliana Chaves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019.
Intramuscular Collagen in castrated and uncastrated Nelore cattle at different ages.
Adviser: Simone Eliza Facioni Guimarães. Co-advisers: Mario Luiz Chizzotti, Polyana Coelho Galvão and Laercio dos Anjos Benjamim.

The objective of this study was to quantify and verify the percentage of solubility of intramuscular collagen (IMC), which could modify the quality of the meat of castrated and uncastrated Nelore cattle slaughtered at 9, 13 and 16 months. In addition to investigating whether possible differences in the expression of fibrogenic genes and of collagen markers remodeling would be associated with differences in content, solubility and IMC types. Thirty-six Nelore calves (*Bos taurus indicus*) were used, half of which were randomly selected for surgical castration one week before weaning. Animals were confined and submitted to the same experimental conditions, and six animals of each sex class were randomly assigned to slaughter when the mean age reached 9.3 ± 0.09 , 12.6 ± 0.05 and 15.7 ± 0.07 months. This study was carried out in a completely randomized design in a factorial scheme with 2 sexual conditions (castrated vs. uncastrated) and 3 slaughter ages (9, 13 and 16 months). Total collagen content did not differ across treatments and no interactions were found ($P > 0.201$). However, no differences were found among the ages ($P = 0.187$) and no interactions were found ($P = 0.640$). The percentage of collagen type 1 (COL 1) did not differ between treatments and no interactions were found ($P > 0.239$). There were interactions ($P = 0.023$) between age and sex, where steers slaughtered at 16 months presented lower percentage of collagen type 3 (COL 3) and no effects were found for sex ($P = 0.400$) and ages ($P = 0.107$). There were interactions ($P = 0.049$) between age and sex, where steers slaughtered at 16 months presented a lower proportion of COL 3 area and no effects were found for sex classes ($P = 0.400$) and ages ($P = 0.180$). No differences were found among fibrogenic genes and marker genes for collagen remodeling, and no interactions were found ($P > 0.220$). The results indicate that expression was constant independent of sexual classes of castrated and uncastrated in the evaluated ages. It can be concluded that as the uncastrated presented a higher percentage of soluble collagen, possibly due to the greater remodeling of the extracellular matrix stimulated by the hypertrophy of the muscular fibers, it implies with the continuity of the muscular growth in this sexual condition. The reduction of the percentage and proportion of the area of COL 3 may be associated to the

lower *turnover* of perimysium in Nellore steers at 15 months indicating stabilization of muscle growth.

INTRODUÇÃO GERAL

O tecido conjuntivo intramuscular (IMCT) é composto por macromoléculas da matriz extracelular (ECM), como proteoglicanos (PGs), glicoproteínas e colágenos (Nishimura, 2015). A principal proteína que constitui este tecido é o colágeno, e a sua biossíntese é dividida em eventos intra e extracelulares. Os eventos intracelulares iniciam, principalmente com a expressão de genes fibrogênicos, seguido de síntese de RNAm específico para as diferentes cadeias alfas de procolágeno, tradução e subsequente hidroxilação enzimática de resíduos de prolina e lisina, com simultânea glicosilação de resíduos de hidroxilisina específicos. As etapas de síntese resultam em uma molécula tripla helicoidal flanqueada por uma curta região não-helicoidal, com uma sequência repetitiva de GLY-X-Y, onde X ou Y é frequentemente prolina ou hidroxiprolina. No espaço extracelular, as moléculas de colágeno se alinham em microfibrilas, inicia-se a reticulação e formam-se fibrilas de diâmetro maior, pela adição de microfibrilas ou por associação a outras fibrilas (McCormick, 1994).

O IMCT encontra-se em três níveis hierárquicos: o epimísio que envolve todo o músculo, o perimísio envolve os feixes de fibras musculares e contém depósitos lipídicos (marmoreio), e o endomísio que envolve individualmente a fibra muscular (Nishimura, 2015). As três estruturas do IMCT são diferentes em composição e estrutura, porém todos contêm fibroblastos que são responsáveis por sua síntese e reparo. Este tecido consiste de redes fibrosas de colágeno, e quando os músculos são consumidos como carne, o epimísio é frequentemente removido durante a preparação, de forma que o perimísio e o endomísio são os principais contribuintes do IMCT para a textura da carne cozida (Purslow, 2014). Os colágenos representam de 1 a 10% da massa seca do músculo, e as variações na quantidade do perimísio são muito maiores do que as variações no endomísio entre vários músculos, portanto a força necessária para cisalhar a carne cozida é determinada pela rede perimísial, pois essa rede é considerada o fator dominante na resistência e na rigidez dos tecidos musculares (Purslow, 2014).

O alinhamento das moléculas de colágeno permite a formação das fibrilas, e sua estabilização ocorre devido formação de ligações cruzadas covalentes que conferem resistência à tração a rede perimísial. As ligações cruzadas são estruturas resultantes da condensação de resíduos de lisina ou hidroxilisina e seus aldeídos, que ligam duas ou três moléculas ou fibrilas de colágeno (McCormick, 1994). As ligações cruzadas covalentes intermoleculares do colágeno são as principais responsáveis para a resistência mecânica e a rigidez das fibras presentes no IMCT (Bailey et al. 1998), estando diretamente relacionada à resistência a força de cisalhamento dos

feixes de fibras musculares. A condensação das ligações cruzadas divalentes imaturas em ligações cruzadas trivalentes maduras é um processo catalisado pela enzima Lisil Oxidase (LOX), e está diretamente associada a redução da solubilidade térmica do colágeno (Bailey & Light 1989). Em animais jovens, o colágeno recém sintetizado contém particularmente ligações cruzadas do tipo divalentes, que são solúveis ao calor, tais ligações tornam-se trivalentes e estáveis ao calor com o aumento da idade, enquanto que a maciez da carne diminui com a redução da solubilidade do colágeno intramuscular (Hill, 1966). Portanto a influência do IMCT pode ser determinada pela quantidade e solubilidade do colágeno, que se torna termoestável devido a presença de ligações cruzadas maduras (Latorre, Iezzi, Christensen, & Purslow, 2017).

O perimísio é formado por uma rede de colágenos tipos 1, 3, 4, 5, 6, 12 e 14 (Listrat et al., 1999, Listrat et al., 2000, Nishimura et al., 1997) variando em diâmetro e composição, e são constituídos predominantemente por dois fenótipos, colágeno tipo 1 (COL 1) e colágeno tipo 3 (COL 3) que se alinham em um arranjo tridimensional para formar fibrilas nos tecidos (Bailey & Light, 1989), cujas proporções variam com a idade do animal, tipo de músculo, sexo e, provavelmente, taxa de síntese (McCormick, 1994). O COL 1 é caracterizado por filamentos espessos e apresenta-se em maior quantidade em relação ao COL 3 que é constituído de filamentos mais delgados. O COL 3 é geralmente considerado a forma embrionária ou precursora de colágenos fibrilares e com o aumento da idade há uma mudança geral e progressiva no fenótipo, elevando as concentrações de COL 1 (McCormick, 1994). Assim resistência a tração da rede perimísial pode estar relacionada ao tipo do colágeno, portanto a maior proporção de COL 3 pode ser indicativo de nova síntese de colágeno e fragilidade do IMCT presentes no perimísio.

Com o avanço da idade a fibrogenicidade em todos os tecidos aumenta e, eventualmente, algum grau de fibrose também se manifesta no músculo (Sun et al., 2015). A fibrose é um acúmulo de colágenos fibrilares, especialmente do COL 1 (Hosper et al., 2013), e é uma característica frequente no envelhecimento que ocorre mediante liberação do fator de crescimento transformante beta (TGF- β) estimulando a deposição de colágeno pelos fibroblastos. O TGF- β estimula a fibrose parcialmente via expressão reduzida de metaloproteinases da matriz (MMPs), família de enzimas funcionalmente relacionadas que clivam os componentes da ECM e elevam a expressão do inibidor tecidual das metaloproteinases (TIMPs), aumentando a deposição do colágeno (Huang et al., 2012). A fibrogênese possui papel fundamental na regulação da ECM, de forma a interferir no crescimento muscular.

No músculo esquelético, existe um equilíbrio entre as enzimas responsáveis pela síntese da ECM e seus inibidores, e o *turnover* da ECM é necessário para a migração celular, formação de miotubos e reorganização da matriz durante o crescimento muscular (Gillies & Lieber, 2011). Como o IMCT forma uma rede contínua em todo o músculo, ele deve ser continuamente remodelado durante o crescimento animal para permitir o crescimento muscular através da hipertrofia das fibras musculares. As estruturas do IMCT devem ser degradadas proteoliticamente e seguidas de síntese de novos componentes, assim, o IMCT é uma estrutura dinamicamente remodelada (Purslow, 2014). As alterações nas características do IMCT estão ligadas direta ou indiretamente a perturbações na síntese e na maturação progressiva do colágeno, e nas taxas de *turnover* que acompanham o crescimento e a hipertrofia muscular (McCormick, 1994).

O músculo cresce pela hipertrofia das fibras musculares, ocorrendo o aumento da área de superfície e, portanto, a rede endomisial que circunda as fibras também expande, afetando conseqüentemente o perimísio que deve ser continuamente remodelado para permitir a hipertrofia, assim pode-se supor que a solubilidade térmica do colágeno será maior nos músculos em crescimento mais rápido (Purslow, 2018). É notavelmente aparente que as concentrações maduras de ligações cruzadas de colágeno aumentam com a idade, e o aumento constante na reticulação de colágeno maduro é devido a reações de reticulação progressivas e contínuas que ocorrem dentro do colágeno fibrilar com conseqüente retardo das taxas de síntese à medida que os animais atingem a maturidade. Portanto, o colágeno parece ser um componente muito flexível presente na ECM e o potencial para práticas de manejo visando alterar as características do colágeno, existem.

Diante do exposto é possível modificar as práticas de produção visando aumentar a solubilidade do colágeno e reduzir a contribuição do tecido conjuntivo de forma a melhorar a qualidade do produto comercial. Estratégias como redução da idade ao abate, elevação da taxa de crescimento, entre outras intervenções, podem contribuir para minimizar a dureza da carne, encurtando o período que as ligações cruzadas trivalentes são formadas (Roy, Sedgewick, Aalhus, Basarab, & Bruce, 2015). Considerando duas situações distintas, primeiro, as flutuações relativamente lentas ou moderadas no crescimento muscular e, segundo, o crescimento muscular rápido típico em machos não castrados, as relações entre crescimento e a variabilidade do colágeno intramuscular podem se tornar aparentes. É conhecido que o animal não castrado normalmente produz carcaças mais pesadas e magras do que animais castrados, e

os novilhos atingem massa proteica corporal máxima em peso menor que os não castrados (Silva, 2018). No entanto, a magnitude da diferença entre animais castrados e não castrados pode variar com a idade em que foi realizada a castração e com o estágio de desenvolvimento ao abate (Marti et al., 2013). Tem sido relatado que a castração reduz o peso na maturidade (Valadares Filho et al., 2016), explicando a deposição precoce de marmoreio em bovinos castrados comparados com bovinos não castrados. Hedrick et al. (1969) sugeriram que uma interação entre condição sexual e maturidade pode afetar a qualidade da carne. Quanto às possíveis relações entre o aumento da síntese de colágeno, a deposição de colágeno imaturo e a textura da carne, é significativo que a fração de IMCT que é solúvel seja geralmente igual ou maior em animais não castrados comparados aos castrados (Crouse et al., 1985; McCormick, 1994; Miller et al. al., 1989). Assim, devido as diferenças na fisiologia do crescimento entre as duas condições sexuais, espera-se variações nas características da carcaça e da carne com o aumento da idade, incluindo a quantidade e composição do tecido conjuntivo adjacente.

Diante do exposto, o presente trabalho testa a hipótese que podem ocorrer variações no conteúdo total, na solubilidade e no percentual dos colágenos tipos 1 e 3, além de possíveis diferenças na expressão gênica de marcadores fibrogênicos e de remodelação do colágeno presentes no músculo esquelético de bovinos Nelore castrados e não castrados nas três idades selecionadas.

Sendo assim, objetivou-se:

1º) Quantificar e verificar o percentual de solubilidade do IMC, que possam modificar a composição da carcaça e a qualidade da carne de bovinos Nelore castrados e não castrados abatidos em diferentes idades.

2º) Investigar se possíveis diferenças na expressão de genes fibrogênicos e de marcadores da remodelação do colágeno presentes no tecido muscular esquelético de bovinos Nelore castrados e não castrados nas idades avaliadas, estariam associadas a diferenças no conteúdo, na solubilidade e nos tipos de IMCT.

Referências

Bailey, A. J., & Light, N. D. (1989). Connective tissue in meat and meat products. Elsevier applied science.

- Bailey A. J, Paul R. G, Knott L. (1998). Mechanisms of maturation and ageing of collagen. *Mechanisms. Ageing Dev.* 106, 1–56.
- Crouse, J. D., Cross, H. R., & Seideman, S. C. (1985). Effects of sex condition, genotype, diet and carcass electrical stimulation on the collagen content and palatability of two bovine muscles. *Journal of animal science*, 60(5), 1228-1234.
- Gillies, A. R. & Lieber, R. L. 2011. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle and Nerve*, 44, 318-331.
- Hedrick, H.B., Thompson, G.B., Krause, G.F., 1969. Comparison of Feedlot Performance and Carcass Characteristics of Half-Sib Bulls, Steers and Heifers. *J Anim Sci* 29, 687-69.
- Hill, F. (1966). The solubility of intramuscular collagen in meat animals of various ages. *J. of Food Sci.* 31(2), 161–166.
- Huang, Y., Zhao, J. X., Yan, X., Zhu, M. J., Long, N. M., McCormick, R. J., ... Du, M. (2012). Maternal obesity enhances collagen accumulation and cross-linking in skeletal muscle of ovine offspring. *PLoS ONE*, 7(2), e31691.
- Hosper, N. A., van den Berg, P. P., de Rond, S., Popa, E. R., Wilmer, M. J., Masereeuw, R., & Bank, R. A. (2013). Epithelial-to-mesenchymal transition in fibrosis: collagen type I expression is highly upregulated after EMT, but does not contribute to collagen deposition. *Experimental cell research*, 319(19), 3000-3009.
- Latorre, M. E., Iezzi, S., Christensen, S., & Purslow, P. P. (2017). Bovinos machos jóvenes castrados versus enteros; calidad de carne y propiedades del tejido conectivo. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 43(1), 72–77.
- Listrat, A., Picard, B., & Geay, Y. (1999). Age-related changes and location of type I, III, IV, V and VI collagens during development of four foetal skeletal muscles of double-muscled and normal bovine animals. *Tissue and Cell*, 31(1), 17-27.
- Listrat, A., Lethias, C., Hocquette, J. F., Renand, G., Menissier, F., Geay, Y., & Picard, B. (2000). Age-related changes and location of types I, III, XII and XIV collagen during development of skeletal muscles from genetically different animals. *The Histochemical Journal*, 32(6), 349-356.

- Marti, S., Realini, C.E., Bach, A., Pérez-Juan, M., Devant, M. (2013). Effect of castration and slaughter age on performance, carcass, and meat quality traits of Holstein calves fed a high-concentrate diet. *J. Anim. Sci.* 91, 1129–1140.
- Miller, L. F., Judge, M. D., Diekman, M. A., Hudgens, R. E., & Aberle, E. D. (1989). Relationships among intramuscular collagen, serum hydroxyproline and serum testosterone in growing rams and wethers. *Journal of animal science*, 67(3), 698-703.
- McCormick, R.J. (1994). The flexibility of the collagen compartment of muscle. *Meat Sci.* 36, 79-91.
- Nishimura, T., Ojima, K., Hattori, A., & Takahashi, K. (1997). Developmental expression of extracellular matrix components in intramuscular connective tissue of bovine semitendinosus muscle. *Histochemistry and cell biology*, 107(3), 215-221.
- Nishimura, T. (2015). Role of extracellular matrix in development of skeletal muscle and postmortem aging of meat. *Meat Science*, 109, 48-55.
- Purslow, P. P. (2014). New developments on the role of intramuscular connective tissue in meat toughness. *Annual Reviews of Food Science and Technology*, 5, 133-153.
- Purslow, P.P. (2018). Contribution of collagen and connective tissue to cooked meat toughness; some paradigms reviewed. *Meat science*, 144, 127-134.
- Roy, B. C., Sedgewick, G., Aalhus, J. L., Basarab, J. A., & Bruce, H. L. (2015). Modification of mature non-reducible collagen cross-link concentrations in bovine m. gluteus medius and semitendinosus with steer age at slaughter, breed cross and growth promotants. *Meat Sci.* 110, 109–117.
- Silva, L. H. P. (2018). Effect of castration and maturity on body glucose sensitivity, carcass composition, meat quality traits and muscle proteome and phosphoproteome of nellore male cattle (doctoral dissertation, universidade federal de viçosa). PHD Thesis, Animal Science Departament, 191 pgs.
- Sun S, Henriksen K, Karsdal MA, Byrjalsen I, Rittweger J, Armbrecht G, et al. (2015). Collagen type III and VI turnover in response to long-term immobilization. *PLoS One*. 10, e0144525.
- Valadares Filho, S. de C., Silva, L.F.C. e, Gionbelli, M.P., Rotta, P.P., Marcondes, M.I., Chizzotti, M.L., Prados, L.F. (2016). Nutrient Requirements of Zebu and Crossbred Cattle – BR

CORTE, in: Exigências Nutricionais de Zebuínos Puros E Cruzados - BR-CORTE. Editora Federal de Viçosa.

Avaliação dos colágenos presentes na matriz extracelular de bovinos Nelore inteiros e castrados com diferentes idades.

Manuscript prepared following the Meat Science journal guidelines

Juliana C. Silva ^{a,*}, Luiz H.P. Silva ^b, Polyana C. Galvão ^a, Maria V. Souza ^a, Mauricio M. Estrada ^b, Débora E.F. Assis ^b, Mario L. Chizzotti ^b, Simone E. F. Guimarães ^b

^a Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil

^b Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil

* Autor Correspondente: Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 36570-000, MG, Brazil. Tel.: +55 31 3899 2262. E-mail: juliana.chaves@ufv.br

RESUMO

O objetivo neste estudo foi quantificar e verificar o percentual de solubilidade do colágeno intramuscular, que possa modificar a qualidade da carne de bovinos Nelore castrados e não castrados abatidos aos 9, 13 e 16 meses. Além de investigar se possíveis diferenças na expressão dos genes fibrogênicos e dos marcadores da remodelação do colágeno estariam associadas a diferenças no conteúdo, na solubilidade e nos tipos de colágeno intramuscular. Foram utilizados trinta e seis bezerros Nelore (*Bos taurus indicus*), sendo a metade aleatoriamente selecionada para a castração cirúrgica uma semana antes do desmame. Os bovinos foram confinados e submetidos as mesmas condições experimentais, e seis animais de cada classe sexual foram distribuídos aleatoriamente para serem abatidos quando a média da idade atingisse $9,3 \pm 0,09$, $12,6 \pm 0,05$ e $15,7 \pm 0,07$ meses. Portanto, este estudo foi realizado seguindo delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial com 2 condições sexuais (castrado vs. não castrado) e 3 idades de abate (9, 13 e 16 meses). O conteúdo total de colágeno total não diferiu entre os tratamentos e também não foram encontradas interações ($P > 0,201$). Os novilhos não castrados apresentaram maior porcentagem de colágeno solúvel ($P = 0,034$) que os castrados, porém não foram encontradas diferenças entre as idades ($P = 0,187$), e também não foram encontradas interações ($P = 0,640$). O percentual de área do colágeno tipo 1 (COL 1) não diferiu entre os tratamentos e também não foram encontradas interações ($P > 0,239$). Foram encontradas interações ($P = 0,023$) entre idade e sexo, onde novilhos castrados abatidos aos 16 meses apresentaram menor percentual de colágeno tipo 3 (COL 3) e não foram encontrados efeitos nas classes sexuais ($P = 0,400$) e nas idades ($P = 0,107$). Foram encontradas interações ($P = 0,049$) entre idade e sexo, onde novilhos castrados abatidos aos 16 meses apresentaram menor proporção de área de COL 3 e não foram encontrados efeitos nas classes sexuais ($P = 0,400$) e nas idades ($P = 0,180$). Não foram encontradas diferenças entre os genes fibrogênicos e dos genes marcadores da remodelação do colágeno, e também não foram encontradas interações ($P > 0,220$). Os resultados indicam que a expressão foi constante não interferindo nas classes sexuais de novilhos não castrados e castrados nas idades avaliadas. Pode concluir que os novilhos não castrados apresentaram maior percentual de colágeno solúvel, possivelmente devido ao maior remodelamento da matriz extracelular estimulado pela hipertrofia das fibras musculares, acompanhando a continuidade do crescimento muscular nessa condição sexual. A redução do percentual e proporção de área do COL 3 pode estar associada

ao menor *turnover* do perimísio em novilhos Nelore aos 16 meses indicando estabilização do crescimento muscular.

Palavras chave: Fator de crescimento transformante beta, Lisil Oxidase, metaloproteinases, Zebuínos, Picosirus Red.

1. Introdução

O tecido conjuntivo intramuscular (IMCT) é composto por macromoléculas da matriz extracelular (ECM), como proteoglicanos (PGs), glicoproteínas e os colágenos (Nishimura, 2015). O IMCT encontra-se em três níveis hierárquicos: o epimísio que envolve todo o músculo, o perimísio envolve os feixes de fibras musculares e o endomísio que envolve individualmente a fibra muscular. Os colágenos representam de 1 a 10% da massa seca do músculo, e as variações na quantidade do perimísio são muito maiores do que as variações no endomísio entre vários músculos, portanto a força necessária para cisalhar a carne cozida é determinada pela rede perimísial, pois essa rede é considerada o fator dominante na resistência e na rigidez dos tecidos musculares (Purslow, 2014). As ligações cruzadas covalentes intermoleculares do colágeno são as principais responsáveis para a resistência mecânica e rigidez das fibras presentes colágenas no perimísio (Bailey et al. 1998), estando diretamente relacionada a resistência a força de cisalhamento dos feixes de fibras musculares. A condensação das ligações cruzadas divalentes imaturas em ligações cruzadas trivalentes maduras é um processo catalisado pela enzima Lisil Oxidase (LOX), e está diretamente associada a redução da solubilidade térmica do colágeno (Bailey & Light 1989, McCormick 2009), tais ligações tornam-se trivalentes e estáveis ao calor com o aumento da idade. O perimísio é formado por uma rede de colágenos variando em diâmetro e composição, e são constituídos predominantemente por dois fenótipos, colágeno tipo 1 (COL 1) e colágeno tipo 3 (COL 3), cujas proporções variam com a idade do animal, tipo de músculo, sexo e, provavelmente, taxa de síntese (McCormick, 1994). O COL 1 é caracterizado por filamentos espessos e apresenta-se em maior quantidade em relação ao COL 3 que é constituído de filamentos mais delgados e é considerado a forma embrionária ou precursora de colágenos fibrilares e com o aumento da idade há uma mudança geral e progressiva no fenótipo, elevando as concentrações de COL 1 (McCormick, 1994). Com o avanço da idade a fibrogenicidade em todos os tecidos aumenta e, eventualmente, algum grau de fibrose também se manifesta no músculo (Sun et al., 2015). A fibrose é uma característica frequente no envelhecimento que ocorre mediante liberação do fator de crescimento transformante beta (TGF- β) estimulando a deposição de colágeno pelos fibroblastos. O TGF- β estimula a fibrose parcialmente via expressão reduzida de metaloproteinases da matriz (MMPs), família de enzimas funcionalmente relacionadas que clivam os componentes da matriz extra celular (ECM) e elevam a expressão do inibidor tecidual das metaloproteinases (TIMPs), aumentando a

deposição do colágeno (Huang et al., 2012). A fibrogênese possui papel fundamental na regulação da ECM, de forma a interferir no crescimento muscular, visto que o IMCT forma uma rede contínua em todo o músculo e portanto deve ser continuamente remodelado durante o crescimento animal para permitir o crescimento muscular (Purslow, 2014). As alterações nas características do colágeno intramuscular estão ligadas direta ou indiretamente a perturbações na síntese e na maturação progressiva do colágeno, e nas taxas de *turnover* que acompanham o crescimento e a hipertrofia muscular (McCormick, 1994).

Diante do exposto é possível modificar as práticas de produção visando aumentar a solubilidade do colágeno e reduzir a contribuição do IMCT de forma a melhorar a qualidade do produto comercial. Estratégias como redução da idade ao abate, elevação da taxa de crescimento, entre outras intervenções, podem contribuir para minimizar a dureza da carne, encurtando o período que as ligações cruzadas trivalentes são formadas (Roy, Sedgewick, Aalhus, Basarab, & Bruce, 2015). É conhecido que o animal não castrado normalmente produz carcaças mais pesadas e magras do que animais castrados, e os novilhos castrados atingem massa proteica corporal máxima em peso menor que os não castrados (Silva, 2018). Portanto o objetivo deste estudo foi quantificar e avaliar os tipos, a solubilidade e a expressão gênica dos mediadores responsáveis pela deposição e composição do colágeno intramuscular, que possam modificar a composição da carcaça e a qualidade da carne de bovinos Nelore castrados ou não, e abatidos em diferentes idades.

2. Material e métodos

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da Universidade Federal de Viçosa – *CEUAP-UFV* (028/2017) de acordo com as diretrizes da ARRIVE (Kilkenny, Browne, Cuthill, Emerson, & Altman, 2013).

2.1. Localização e dieta

O experimento foi conduzido nas dependências do Laboratório Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, na cidade de Viçosa (MG). Foram utilizados trinta e seis bezerros Nelore, machos contemporâneos, com idade média de oito meses e peso corporal médio inicial de aproximadamente 250 kg, sendo todos oriundos de sistema com suplementação durante a fase de cria (*creep-feeding*), e metade dos animais foram aleatoriamente selecionados para a castração cirúrgica uma semana antes do desmame. Os

animais foram confinados logo após a desmama, vermifugados e alocados nas baias para o início da fase de adaptação que teve duração de quatorze dias. Ao início da fase de adaptação os animais foram aleatoriamente divididos em grupos, um grupo de seis bovinos de cada classe sexual (castrado e não castrado) foram aleatoriamente selecionados para serem abatidos quando a média da idade atingisse $9,3 \pm 0,09$, $12,6 \pm 0,05$ e $15,7 \pm 0,07$ meses. Os bovinos foram submetidos as mesmas condições experimentais. As exigências nutricionais foram estimadas utilizando o peso médio e o ganho médio diário de 1,4 kg/dia para as duas classes sexuais, segundo (Valadares Filho et al., 2010). A dieta (Tabela 1) foi composta de silagem de milho, fubá, farelo de soja, ureia e sal mineral e fornecida *ad libitum*.

2.2. Abates e coleta das amostras

No decorrer do experimento foram realizados três abates. Os abates foram conduzidos de maneira humanitária, os animais foram insensibilizados através de injúria cerebral promovida por marreta pneumática com dardo cativo penetrativo, logo em seguida os animais foram sangrados via veia jugular, conforme Instrução Normativa N° 3 de 13/01/2000 (Regulamento Técnico de Métodos de Insensibilização para o Abate Humanitário de Animais de Açougue). Logo após a sangria, foram retiradas amostras do músculo *Longissimus thoracis* (LT) na altura da 13ª costela, da meia carcaça esquerda, uma fração foi designada para análise histológica os fragmentos foram fixados por 48 horas em formol tamponado a 10% e, posteriormente, armazenada em álcool 70%, e outra fração foi identificada, congelada em nitrogênio líquido a -196°C e armazenada à -80°C para posteriores análises de expressão gênica. Após 24 horas de resfriamento das carcaças, foram obtidas amostras do LT na região entre a 6ª e 9ª costela da meia carcaça direita, que foram liofilizados para determinação do teor de colágeno total e percentual de solubilidade.

2.3. Determinação do colágeno total e percentual de solubilidade

A quantificação do colágeno foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Cross et al. (1973), com modificações com base nos artigos de Hadlich, Morales, Silveira, Oliveira, & Chardulo (2008) e Latorre, Iezzi, Christensen, & Purslow (2017), como descrita a seguir: Foram adicionadas 1,5 g de amostra liofilizada em duplicata em tubo de 50 ml de centrífuga em 12 ml de solução salina tamponada (3,5998g NaCl, 0,1790g KCl, 1,4303g Acetato de Sódio, 146,7 μL Ácido Acético diluídos em 2L de ddH₂O pH=5,6). As amostras foram agitadas e colocadas em

banho-maria a 80°C por 60 minutos. Após resfriamento do tubo em banho de gelo (4°C por 15 minutos), este foi centrifugado a 6000 *g* por 10 minutos e a uma temperatura de 2°C, usando centrífuga Beckman Coulter, Fullerton, CA, com rotor JA-20. O sobrenadante foi coletado em frascos confeccionados em vidro neutro, com tampa de rosca com dispositivo anti-gotas (anel de vedação) em polipropileno e o sedimento foi ressuscitado em 12 ml de solução salina. Uma segunda centrifugação foi realizada conforme mencionado anteriormente. Todo o sobrenadante foi retirado dos tubos e acondicionados nos frascos totalizando 16 ml de sobrenadante, foi acrescentado 30 ml de HCl 6N. O sedimento (*pellet*) foi ressuscitado em 8 ml de ddH₂O e acondicionado em frascos de vidros e receberam 20 ml de HCl 6N. As amostras foram mantidas em estufa a 110°C por 16 horas. Após resfriar a temperatura ambiente foi acrescentado 200mg e 900mg de carvão ativado no frasco de digestão do sobrenadante e sedimento respectivamente. Em seguida foram filtradas e acrescidas de 7 gotas de vermelho de metila, após tiveram o pH ajustado para 6,5, mediante utilização de NaOH 2N. As amostras de sobrenadante foram alocadas em balão de 200 ml e o sedimento em balão de 250 ml em ddH₂O. Em tubos de tampa rosca de 35 ml foram colocados 1 ml do filtrado neutralizado mais 2 ml de Isopropanol agitado em vortex acrescido e 1 ml de solução oxidante (1 volume de solução estoque cloramina T (4,35g em 50 ml ddH₂O) em 4 volumes de solução tampão; 5,5 g de ácido cítrico monohidratado, 34,4 g de acetato de sódio anidro, 37,5 g de citrato trissódico dissolvidos em 500 ml ddH₂O) e agitada em vortex, após repouso de 4 minutos, foi adicionado 2 ml de Solução de Erlich (2 g de 4-dimetilbenzaldeído e 2,5 ml de ácido perclórico a 70%). O tubo foi agitado em vórtex e colocado banho-maria a 60°C por 25 minutos. Em seguida foram arrefecidos e lidas em espectrofotômetro a 558 nm. Para construção da curva padrão foi preparada solução stock de hidroxiprolina purificada (0,1 g de 4-hidroxiprolina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO)/1000 mL de solução de ddH₂O acrescida de 0,25 ml de HCl 4N). A reação de cor e a leitura foram realizadas da mesma forma aquela realizada com as amostras. Foram utilizadas quatro concentrações conhecidas de hidroxiprolina para estabelecimento da curva padrão: 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10 µg de hidroxiprolina/ml. Para determinar a quantidade efetiva de colágeno, a quantidade de hidroxiprolina foi multiplicada por 7,52 para o sobrenadante e por 7,25 para o resíduo (Cross et al., 1973). O sobrenadante determinou a fração do colágeno solúvel e o resíduo a fração de colágeno insolúvel, em mg/g. O colágeno total (mg de colágeno/g de carne), foi definido pela soma dos dois. A porcentagem de solubilidade foi calculada a partir da razão do colágeno presente na fração sobrenadante e o colágeno total.

2.4. Avaliação histológica dos colágenos tipos 1 e 3 utilizando a coloração Picrosirius Red

O processamento das amostras para microscopia seguiu os métodos rotineiros do Laboratório de Histopatologia do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. As amostras de músculo previamente obtidas e que se encontravam em álcool a 70% foram colocadas no histotécnico (processador automático de tecidos-Leica TP1020, Aotec Instrumentos Científicos Ltda, São Paulo, SP, Brasil), na sequência foram incluídas em parafina. Cada bloco, representando uma amostra foi levado ao do micrótomo para obtenção de cortes com 5 µm de espessura. Posteriormente, os cortes foram desparafinados, reidratados e corados com Picrosirius Red. Em seguida os cortes foram desidratados e cobertos com lamínula, utilizando meio de montagem rápida.

A análise histológica foi conduzida em microscópio de luz (Olympus CX31, Olympus Optical do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) acoplado à câmera fotográfica (Olympus U-CMAD3 SC20, Olympus Optical do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e em microscópio de luz polarizada (Olympus BX 50, Olympus Optical do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) também acoplado à câmera fotográfica (Olympus Q-Color 3, Olympus Optical do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil). Com a coloração Picrosirius Red foi possível fazer a diferenciação entre COL 1 e COL 3, que é capaz de detectar o padrão de birrefringência das fibras colágenas quando submetidas à microscopia de luz polarizada. As fibras do tipo I, são intensamente birrefringentes e demonstram coloração com tonalidade variando do vermelho ao amarelado, enquanto as fibras do tipo III, menos birrefringentes, emitem coloração esverdeada (Charan Gowda, Kokila, Gopinathan, & Praveen, 2017). Os campos histológicos foram selecionados e avaliados conforme descrito por Bedoya et al. (2019), sendo da seguinte maneira: da “esquerda para a direita e de cima para baixo e, para cada campo fotomicrografado”. O total de 10 imagens foram obtidas, e analisadas no *Software Image J*, com o *plug-in Threshold Colour*.

2.5. Expressão gênica dos genes fibrogênicos (COL1A1, COL3A1, TGFBI), e marcadores da remodelação do colágeno (LOX, MMP-2, TIMP-1) por reação da cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR)

As análises de RT-qPCR foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. Cinquenta miligramas de músculo LT em pó foram utilizados para extração de RNA total com reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para remover a contaminação por DNA, as amostras de RNA total foram então tratadas com DNase I, Grade de Amplificação (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). O espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare, Freiburg, Alemanha) foi utilizado para estimar a concentração de RNA a 260 nm, e a pureza do RNA foi verificada por meio da razão de 260/280 nm. Finalmente, a integridade do RNA foi verificada através da presença de bandas de 18s e 28s em eletroforese em gel de agarose a 1%. A síntese de cDNA foi realizada usando o kit Transcriptase Reversa GoScript (Promega, Madison, WI, EUA). As amostras foram armazenadas a -20 até a análise. Os primers foram projetados pela ferramenta Web Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) usando as sequências de referência *Bos taurus* do banco de dados GenBank. As sequências dos primers dos 6 genes-alvo e do 18S rRNA controle endógeno são mostrados na Tabela 2. A PCR quantitativa em tempo real foi realizada utilizando uma unidade de PCR Real-Times 7300 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA) e SYBR Green RT-PCR Master Mix GoTaq (Promega, Madison, WI, EUA) seguindo os parâmetros do ciclo: 95 ° C por 3 min e 40 ciclos a 95 ° C por 10 se 60 ° C por 30 s. Os valores do limiar do ciclo (Ct) foram registrados para genes alvo e endógeno.

2.6. Análise estatística

Os dados foram analisados em delineamento inteiramente casualizado seguindo um arranjo fatorial 2 (castrado e não castrado) x 3 (9, 13 e 16 meses). A análise de variância (ANOVA) foi realizada, utilizando o procedimento GLM do SAS. Uma vez detectado efeito significativo ($P \leq 0,05$), as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey.

Para análise estatística dos dados de conteúdo total, solubilidade e tipos de colágeno a ANOVA foi realizada usando o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{isl} = \mu + I + S + (IS) + \epsilon_{isl}, \text{ onde:}$$

Y_{ijl} é o valor observado, em animal l , classe sexual i e idade j , em que $i = 1$ ou 2 (classe sexual não castrado e castrado, respectivamente) e $j = 1, 2$ ou 3 (9, 13 ou 16i, respectivamente), μ é a constante geral,

$S_{(ij)l}$ é o efeito aleatório de animais na classe sexual i e idade j ,

$S_{(ij)l} \sim N(0, \sigma^2 A)$,

ε_{ijl} é o erro aleatório, ie, $\varepsilon_{ijl} \sim N(0, \sigma^2 e)$.

Para análise estatística dos dados de RT-qPCR a ANOVA foi feita usando o seguinte modelo estatístico:

$Y_{ijkl} = \mu + A_{(ij)l} + D_{ijk} + (RIG)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$, onde:

Y_{ijkl} é o nível de expressão do gene k , em animal l , classe sexual i e idade j , em que $i = 1$ ou 2 (classe sexual não castrado e castrado, respectivamente) e $j = 1, 2$ ou 3 (9, 13 ou 16, respectivamente), μ é a constante geral,

$A_{(ij)l}$ é o efeito aleatório de animais na classe sexual i e idade j ,

$A_{(ij)l} \sim N(0, \sigma^2 A)$,

D_{ijk} é o efeito aleatório específico da amostra, $D_{ijk} \sim N(0, \sigma^2 D)$,

$(RIG)_{ijk}$ é o efeito de interação entre classe sexual e a idade.

Os dados da expressão gênica foram gerados como valores de Ct (threshold cycle). Os dados foram transformados para expressão relativa ($2^{-\Delta Ct}$) (Livak e Schmittgen, 2001).

3. Resultados

Animais castrados e não castrados foram abatidos com pesos médios de 276,4, 389,3 e 488,6 kg de peso corporal nas três idades selecionadas. Foram encontradas diferenças no percentual de solubilidade entre as 2 classes sexuais (Tabela 3, Figura 2). A condição sexual por idade no efeito de interação foi encontrada para o percentual de área de COL 3 (Tabela 3, Figura 3) e para a proporção de COL 3 (Tabela 3, Figura 4).

3.1. Teor de colágeno total e percentual de solubilidade.

O conteúdo total de colágeno não diferiu entre as idades ($P = 0,726$) e entre as classes sexuais ($P = 0,231$), e também não foram encontradas interações ($P = 0,201$). A solubilidade do

colágeno diferiu ($P = 0,0343$) entre as classes sexuais, evidenciando maior solubilidade em animais não castrados, porém não foram encontradas diferenças entre as idades avaliadas ($P = 0,187$) e não foram encontradas interações ($P = 0,640$). O teor de colágeno intramuscular total e solúvel no músculo LT estão demonstrados (Tabela 3, Figura 2).

3.2. *Quantificação histológica de fibras de colágeno tipo 1 (COL 1) e tipo 3 (COL 3).*

O percentual de área do colágeno tipo 1 (COL 1) não diferiu entre as classes sexuais e as idades e também não foram encontradas interações ($P > 0,239$). Foram encontradas interações ($P = 0,023$) entre idade e sexo, onde novilhos castrados abatidos aos 15 meses apresentaram menor percentual de área de colágeno tipo 3 (COL 3) e não foram encontrados efeitos nas classes sexuais ($P = 0,400$) e nas idades ($P = 0,107$), evidenciando menor conteúdo de COL 3 em bovinos castrados abatidos aos 15 meses (Figura 3).

Foram encontradas interações ($P = 0,049$) entre idade e sexo, onde bovinos castrados abatidos aos 15 meses apresentaram menor proporção de COL 3 e não foram encontrados efeitos nas classes sexuais ($P = 0,400$) e nas idades ($P = 0,180$), evidenciando menor conteúdo de COL 3 em novilhos castrados abatidos aos 15 meses (Figura 4). O percentual de área e proporção do COL 1 e COL 3 no músculo LT estão demonstrados (Tabela 3).

3.3 *Níveis de expressão dos marcadores fibrogênicos (TGFB1, COL1A1 e COL3A1) e dos mediadores da remodelação do colágeno (MMP II, TIMP II e LOX)*

Para investigar o efeito da castração e da idade na expressão dos genes que codificam os componentes da ECM, avaliamos os níveis de expressão dos marcadores fibrogênicos (TGF β 1, COL1A1 e COL3A1) e dos mediadores da remodelação da ECM (MMP II, TIMP II e LOX) no LT. Não evidenciamos diferenças entre os genes nas duas classes sexuais ($P > 0,303$) e nas três idades avaliadas ($P > 0,399$), e também não foram encontradas interações ($P > 0,099$). Os resultados indicam que a expressão foi constante não interferindo a idade de touros e novilhos. A comparação da expressão dos genes, em *fold-change* entre os diferentes tratamentos, que codificam os componentes da ECM no músculo LT estão demonstrados (Tabela 3).

4- Discussão

No estudo conduzido por Silva (2018), utilizando os animais deste trabalho, foram observadas que as carcaças dos animais não castrados apresentaram maior peso corporal ($P = 0,02$) sendo 6% mais pesadas que os castrados. Esses resultados sugerem que, quando castrados ao desmame e depois alimentados intensivamente, os novilhos Nelore apresentam menor efeito no crescimento muscular. Porém não foram encontradas diferenças na Força de Cisalhamento Warner-Bratzler (WBSF), demonstrando que a castração e as idades avaliadas não interferiram na maciez da carne oriunda destes animais.

4.1. Teor de colágeno total e percentual de solubilidade

O crescimento muscular ocorre devido a hipertrofia das fibras musculares, promovendo o aumento da área de superfície e, portanto, a rede endomisial que circunda as fibras também expande, afetando consequentemente o perimísio que deve ser continuamente remodelado para permitir a expansão resultante desse crescimento, assim supõe-se que a solubilidade térmica do colágeno seja maior nos músculos em crescimento mais rápido (Purslow, 2018). Neste trabalho os resultados demonstram que existem diferenças no percentual de solubilidade do IMCT entre as duas classes sexuais evidenciando maior solubilidade em animais não castrados, porém um conteúdo semelhante de colágeno total foi observado.

De acordo com Purslow (2018) as ligações cruzadas trivalentes maduras do colágeno são formadas pela condensação das ligações cruzadas divalentes devido principalmente ao aumento da idade, e uma abordagem possível para reduzir a contribuição da ECM muscular, seria estimular o *turnover* do IMCT, promovendo a degradação proteolítica do colágeno seguida pela síntese de colágeno. Rompala e Jones (1984) sugerem que a solubilidade térmica do IMCT está relacionada com o *turnover* da ECM, e ou com o crescimento muscular. Neste estudo, a taxa de crescimento elevada nos novilhos não castrados pode ter culminado com uma resposta semelhante a sugerida por estes autores, associando o maior remodelamento da ECM a hipertrofia muscular. Em estudos anteriores Cross et al. (1984) demonstraram que tanto o teor de colágeno total quanto o percentual de solubilidade do colágeno foram mais elevados em animais não castrados. supõe-se que a síntese de colágeno solúvel acompanha a curva de crescimento muscular declinando à medida que o animal se aproxima da maturidade (Blanco et al., 2013), e esse efeito estaria relacionado à testosterona interferindo na solubilidade do IMCT

principalmente devido ao efeito anabólico deste hormônio promovendo a expansão da rede perimísial.

A redução na maciez da carne em animais mais velhos é amplamente relatada, e é resultante do aumento da estabilidade térmica e mecânica do IMCT (Purslow, 2018). É descrito que a idade dos animais influencia na formação da ECM, e Girard et al. (2011) demonstraram que o conteúdo total de colágeno aumenta e a solubilidade do colágeno reduz com o aumento da idade ao abate, evidenciando menor solubilidade do IMCT.

O aumento na solubilidade do colágeno neste estudo, é possivelmente decorrente do aumento na síntese de colágeno relacionado às alterações durante o crescimento muscular em touros jovens, indicando a continuidade do crescimento nesta classe sexual. Alterações nas características do colágeno intramuscular estão ligadas direta ou indiretamente a perturbações na síntese de colágeno e nas taxas de *turnover*. Porém a inexistência de diferenças entre as idades avaliadas pode estar relacionada a precocidade dos animais que foram abatidos em idade reduzida. Neste estudo, os resultados, no entanto, não foram relacionados à diferença na WBSF (Silva, 2018), demonstrando que alterações na solubilidade do IMCT pode não estar relacionada a algumas características sensoriais da carne.

4.2. *Quantificação histológica de fibras de colágeno tipo 1 (COL 1) e tipo 3 (COL 3).*

As variações na proporção dos colágenos tipos 1 e 3 nos músculos e sua relação com a textura da carne têm sido investigadas, embora os resultados não sejam conclusivos e muitas vezes contraditórios. As quantidades e a distribuição do IMCT podem variar com o desenvolvimento muscular, crescimento e função (Purslow 2005). É relatado que o percentual de área de colágeno tipo 1 e 3 pode ser alterada dependendo dos tipos de músculos e da idade dos animais (Listrat et al., 1999), e na musculatura bovina adulta, o COL 1 é mais abundante no perimísio, mas os níveis de COL 3 são mais elevados no endomísio (Mayne & Sanderson, 1985). Kovanen & Suominen (1989) relatam que os tecidos fetais ou neonatais são ricos em COL 3 e na musculatura esquelética há um deslocamento no envelhecimento aumentando as proporções de COL 1.

Blanco & Alonso (2010), demonstraram diferenças nas relações de COL 1 e COL 3 no LT de bovinos da raça Criolla (*Bos taurus taurus*) em diferentes idades, porém essas diferenças foram significativas em animais com 24 meses, evidenciando maior conteúdo para os dois tipos de colágenos avaliados, esses resultados sugerem que a idade pode interferir na composição da

ECM demonstrando o aumento na proporção para ambos os tipos de colágeno com o avançar da idade. Burson et al. (1986) em um estudo com touros Simmentais e novilhos castrados, utilizando dieta altamente concentrada 259 d antes do abate aos 17 meses de idade, demonstrou que porcentagem de COL 3 não difere do IMCT, porém foram utilizados animais heterogêneos em que as carcaças de touros e novilhos castrados tiveram graus médios de rendimento USDA de 1,9 e 2,5, respectivamente, e graus de qualidade médios USDA de *high Good* e *low Choice*, respectivamente.

Neste estudo, encontramos efeito de interação entre a idade e classe sexual na análise histológica evidenciando que novilhos castrados aos 16 meses apresentam menor conteúdo de COL 3, indicando possível interferência na composição da ECM nestes animais, porém não encontramos diferenças para o percentual e a proporção dos tipos de colágenos no IMCT, que foi consistente com a ausência de diferenças na expressão dos genes fibrogênicos no músculo esquelético dos animais avaliados. Contudo, o efeito de interação pode sugerir que este tipo de colágeno esteja parcialmente relacionado à solubilidade, visto que o colágeno tipo 3 é menor em diâmetro do que as fibrilas de colágeno tipo 1, sendo possivelmente mais susceptível a solubilização, possibilitando assim inferir que o percentual e a proporção de COL 3 estão relacionados com a taxa de crescimento muscular neste estudo indicando que os animais não castrados ainda estão em crescimento.

4.3 Níveis de expressão dos marcadores fibrogênicos (TGF β 1, COL1A1 e COL3A1) e dos mediadores da remodelação do colágeno (MMP II, TIMP II e LOX)

O fator de crescimento transformador β 1 (TGF β 1) é um regulador chave da fibrogênese, e é abundantemente expresso em fibroblastos (Park et al., 2018). Para avaliar a influência da fibrogênese no músculo LT, determinamos os níveis de expressão dos genes que codificam o TGF β 1, COL1A1 e COL3A1. Nossos resultados demonstram que tanto a castração quanto a idade não afetaram a expressão do TGF β 1, COL1A1 e COL3A1, portanto, é possível inferir que a castração e a idade não influenciam a fibrogênese ao nível de mRNA neste estudo. Martins et al. (2015) também não observaram diferenças para a expressão de mRNA dos marcadores fibrogênicos TGF β 1, COL1A1 e COL3A1 no músculo esquelético de Angus comparados com bovinos Nelore, demonstrando que a ausência de diferenças na expressão destes marcadores podem não influenciar a fibrogênese a nível de mRNA.

Resultados conflitantes foram descritos por Zhang et al. (2011) e Park et al. (2018), que encontraram níveis mais baixos de expressão de COL1A1 e COL3A1 em animais castrados em comparação com animais não castrados, em um estudo com gado Qinchuan e gado Coreano, respectivamente. Porém Park utilizou animais com escores de marmoreio (1,1 vs. 7,2 nos touros e novilhos, respectivamente), o que difere deste estudo que utilizou Zebuínos precoces que não atingem elevados escores de marmoreio. Diferentemente, o trabalho conduzido por Duarte et al. (2013), observou maior expressão de genes fibrogênicos em Wagyu comparado ao gado Angus. Silva (2018) demonstrou que os novilhos Nelore em idade de abate, utilizados neste estudo, apresentam maior deposição de gordura intramuscular do que os animais não castrados, confirmando que perto da puberdade, a composição do ganho entre estas classes sexuais são marcadamente diferentes, e neste estudo encontramos menor proporção e porcentagem de área referente ao COL 3 no perimísio de novilhos castrados aos 16 meses podendo sugerir que o menor *turnover* da ECM nestes animais pode estar associado a maior deposição de gordura e menor hipertofia muscular.

Duarte et al. (2013), relatou que a adipogênese intramuscular e a fibrogênese podem ocorrer concomitantemente levando ao aumento de gordura intramuscular e deposição de colágeno no músculo esquelético, porém apesar de nossos novilhos castrados com 16 meses apresentarem maior conteúdo de gordura intramuscular não encontramos diferenças na expressão dos genes dos marcadores fibrogênicos analisados neste estudo, possivelmente devido ao menor grau de marmorização quando comparado ao gado Wagyu.

Diversos trabalhos demonstram que a formação de ligações cruzadas intermoleculares do colágeno é mais relevante do que o conteúdo de colágeno para determinar a maciez da carne bovina (Du et al., 2013; McCormick, 1999; Miao et al., 2016). A reticulação da molécula de colágeno é catalisada pela LOX e a redução das ligações cruzadas intermoleculares estão associadas à melhora da maciez da carne, principalmente devido a maior solubilidade térmica do IMC. Para avaliar o efeito da idade e da castração na expressão de genes associados a reticulação de colágeno, avaliamos os níveis de mRNA do gene que codifica a LOX. Porém, apesar de diferenças observadas na solubilidade, os níveis de mRNA para expressão da LOX não diferiram entre os tratamentos. Martins et al. (2015) também não observaram diferenças para a expressão de mRNA de enzimas chave do remodelamento do colágeno *LOX*, *MMP2* e *TIMP1*, coincidindo com nosso estudo que indica que a castração de bovinos Nelore precoces

pode não afetar significativamente a ligação cruzada de colágeno intermediada pela LOX no LT ao nível de mRNA.

Christensen & Purslow (2016) relatam que as MMPs atuam como enzimas que degradam os componentes estruturais da ECM, mas novas evidências mostram que também estão envolvidas em uma ampla gama de vias de sinalização extra e intracelulares. As MMPs desempenham papel central como reguladoras do microambiente tecidual sob condições fisiológicas durante o desenvolvimento e remodelação ou condições que contribuem para a destruição tecidual (Christensen & Purslow, 2016; Shiomi, Lamaitre, Darmiento, & Okada, 2010). As gelatinases (MMP-2 e MMP-9) clivam eficientemente os colágenos desnaturados (Shiomi, Lamaitre, Darmiento, & Okada, 2010). Avaliamos os níveis de mRNA dos genes que codificam a MMP-2 e TIMP-2 e mudanças na expressão de mRNA dos marcadores de remodelação do colágeno, que também seriam responsáveis por diferenças na solubilidade do mesmo, não foram observadas. Porém são necessários mais estudos para avaliar o efeito das MMPs nos tratamentos abordados neste trabalho. Nossos resultados sugerem que a castração e a idade precoce dos animais não regulam diretamente a expressão dos genes das enzimas responsáveis pelo remodelamento do colágeno.

5. Conclusões

A castração reduz a solubilidade do colágeno intramuscular, possivelmente devido ao menor *turnover* do IMCT em novilhos Nelore. Os animais não castrados apresentam maior percentual de colágeno intramuscular solúvel, possivelmente devido ao maior remodelamento da ECM associado à maior taxa e à continuidade do crescimento em novilhos não castrados. A redução do conteúdo de colágeno tipo 3 pode estar associada ao menor *turnover* do perimísio em novilhos castrados aos 15 meses. Contudo devido à ausência de diferenças nos marcadores responsáveis pela fibrogênese e pelo remodelamento do colágeno, é possível inferir que a castração e a idade não são influenciadas ao nível de mRNA. De acordo com estes resultados, os tipos de fibras de colágeno no LT não são fatores determinantes para o aumento da solubilidade do colágeno, porém mais estudos são necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos no remodelamento da matriz extracelular em bovinos Nelore precoces.

Agradecimentos

Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Bolsa 459912 / 2014-3), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e INCT-CA por fornecer apoio financeiro a este projeto.

Referências

- Bailey, A. J., & Light, N. D. (1989). *Connective tissue in meat and meat products*. Elsevier applied science.
- Bailey A. J, Paul R. G, Knott L. (1998). Mechanisms of maturation and ageing of collagen. *Mechanisms. Ageing Dev.* 106, 1–56.
- Bedoya, S. A. O., Souza, M.V., Conceição, L. G., Vitoria, M. I. V., Valente, F. L., Loures, F. H., Moreira, J.C.L. & Coelho, P.G.B. (2019). Quantificação do colágeno dérmico equino por duas técnicas morfométricas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 71(3). In press.
- Blanco, M. R., & Alonso, C. R. (2010). Collagen types I and III in bovine muscles: influence of age and breed. *Journal of muscle foods*, 21(3), 417-423.
- Blanco, M., Jurie, C., Micol, D., Agabriel, J., Picard, B., & Garcia-Launay, F. (2013). Impact of animal and management factors on collagen characteristics in beef: a meta-analysis approach. *animal*, 7(7), 1208-1218
- Burson, D.E., Hunt, M.C., Unruh, J.A. & Dikeman, M.E. (1986). Proportion of types I and III collagen in Longissimus collagen from bulls and steers. *Journal of Animal Science*, 63, 453-456.
- Charan Gowda, B. K., Kokila, G., Gopinathan, P. A., & Praveen, K. S. (2017). Picrosirius red and polarization microscopy – a tool for gender differentiation. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 11(1), 107–109.
- Christensen, S., & Purslow, P. P. (2016). The role of matrix metalloproteinases in muscle and adipose tissue development and meat quality: A review. *Meat Science*, 119, 138–146.

- Cross, H. R., Carpenter, Z. L., & Smith, G. C. (1973). Effects of intramuscular collagen and elastin on bovine muscle tenderness. *Journal of Food Science*, 38(6), 998–1003.
- Cross, H. R., Schanbacher, B. D., & Crouse, J. D. (1984). Sex, age and breed related changes in bovine testosterone and intramuscular collagen. *Meat Science*, 10(3), 187–195.
- Du, M., Huang, Y., Das, A. K., Yang, Q., Duarte, M. S., Dodson, M. V., & Zhu, M. J. (2013). Meat Science and Muscle Biology Symposium: Manipulating mesenchymal progenitor cell differentiation to optimize performance and carcass value of beef cattle. *Journal of Animal Science*, 91, 1419–1427.
- Duarte, M. S., Paulino, P. V., Das, A. K., Wei, S., Serão, N. V., Fu, X., ... Du, M. (2013). Enhancement of adipogenesis and fibrogenesis in skeletal muscle of Wagyu compared with Angus cattle. *Journal of Animal Science*, 91, 2938–2946.
- Girard, I., Aalhus, J. L., Basarab, J. A., Larsen, I. L., & Bruce, H. L. (2011). Modification of muscle inherent properties through age at slaughter, growth promotants and breed crosses. *Canadian Journal of Animal Science*, 91, 635–648.
- Hadlich, J. C., Morales, D. C., Silveira, A. C., Oliveira, H. N. de, & Chardulo, L. A. L. (2008). Efeito do colágeno na maciez da carne de bovinos de distintos grupos genéticos. *Acta Animals Science*, 28(1), 57–62.
- Hill, F. (1966). The solubility of intramuscular collagen in meat animals of various ages. *Journal of Food Science*, 31(2), 161–166
- Huang, Y., Zhao, J. X., Yan, X., Zhu, M. J., Long, N. M., McCormick, R. J., ... Du, M. (2012). Maternal obesity enhances collagen accumulation and cross-linking in skeletal muscle of ovine offspring. *PLoS ONE*, 7(2), e31691.
- Kilkenny, C., Browne, W. J., Cuthill, I. C., Emerson, M., & Altman, D. G. (2013). Improving bioscience research reporting: The arrive guidelines for reporting animal research. *Animals*, 4(1), 35–44.
- Kovanen, v. & Suominen, H. (1989). Age and training-related changes in the collagen metabolism of rat skeletal muscle. *Eur. J. Appl. Physiol.* **58**, 765–771.

- Latorre, M. E., Iezzi, S., Christensen, S., & Purslow, P. P. (2017). Bovinos machos jóvenes castrados versus enteros; calidad de carne y propiedades del tejido conectivo. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 43(1), 72–77.
- Listrat, A., Rakadjiyski, N., Jurie, C., Picard, B., Touraille, C., Geay, Y., (1999). Effect of the type of diet on muscle characteristics and meat palatability of growing sales bulls. *Meat Science*. 53, 115–124.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402–408.
- Martins, T. S., Sanglard, L. M. P., Silva, W., Chizzotti, M. L., Rennó, L. N., Serão, N. V. L., ... Duarte, M. S. (2015). Molecular factors underlying the deposition of intramuscular fat and collagen in skeletal muscle of Nellore and Angus cattle. *PLoS ONE*, 10(10), e0139943.
- McCormick, R. J. (1994). The flexibility of the collagen compartment of muscle. *Meat Science*, 36(1-2), 79-91.
- McCormick, R. J. (1999). Extracellular modifications to muscle collagen: Implications for meat quality. *Poultry Science*, 78, 785–791.
- McCormick, R. J. (2009). 7 Collagen. *Applied muscle biology and meat science*, 129.
- Miao, Z. G., Zhang, L. P., Fu, X., Yang, Q. Y., Zhu, M. J., Dodson, M. V., & Du, M. (2016). Invited review: Mesenchymal progenitor cells in intramuscular connective tissue development. *Animal*, 10(1), 75–81.
- Mayne, R., & Sanderson, R.D., (1985). The extracellular matrix of skeletal muscle. *Collagen and Related Research*. 5, 449–468.
- Nishimura, T. (2015). Role of extracellular matrix in development of skeletal muscle and postmortem aging of meat. *Meat Science*, 109, 48-55.
- Park, S. J., Kang, H. J., Na, S., Lee, S. H., & Baik, M. (2018). Differential expression of extracellular matrix and integrin genes in the longissimus thoracis between bulls and steers and their association with intramuscular fat contents. *Meat Science*, 136, 35–43.

- Purslow, P. P. (2002). The structure and functional significance of variations in the connective tissue within muscle. In *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 133(4), 947–966.
- Purslow, P.P. (2005). Intramuscular connective tissue and its role in meat quality. *Meat Science*, 70, 435–447.
- Purslow, P. P. (2014). New developments on the role of intramuscular connective tissue in meat toughness. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5, 133-153.
- Purslow, P.P. (2018). Contribution of collagen and connective tissue to cooked meat toughness; some paradigms reviewed. *Meat science*, 144, 127-134.
- Rompala, R. E., & Jones, S. D. (1984). Changes in the solubility of bovine intramuscular collagen due to nutritional regime. *Growth*, 48(4), 466–472.
- Roy, B. C., Sedgewick, G., Aalhus, J. L., Basarab, J. A., & Bruce, H. L. (2015). Modification of mature non-reducible collagen cross-link concentrations in bovine m. gluteus medius and semitendinosus with steer age at slaughter, breed cross and growth promotants. *Meat Science*, 110, 109–117.
- Shiomi, T., Lamaitre, V., Darmiento, J., & Okada, Y. (2010). Matrix metalloproteinases, a disintegrin and metalloproteinases, and a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motif in non-neoplastic disease. *National Institute of Health, NIH Public Access*, 60(7), 477–496.
- Silva, L. H. P. (2018). Effect of castration and maturity on body glucose sensitivity, carcass composition, meat quality traits and muscle proteome and phosphoproteome of Nelore male cattle (doctoral dissertation, universidade federal de viçosa). PHD Thesis, Animal Science Departaament, 191 pgs.
- Sun S, Henriksen K, Karsdal MA, Byrjalsen I, Rittweger J, Armbrecht G, et al. (2015). Collagen type III and VI turnover in response to long-term immobilization. *PLoS One*. 10, e0144525.
- Valadares Filho, S. C., Marcondes, M. I., Chizzotti, M. L., & Paulino, P. V. R. (2010). *Exigências nutricionais de zebuínos puros e cruzados-BR CORTE* (2nd ed.). Viçosa, MG, Brazil: Suprema Gráfica LTDA.

- Woessner, J. F. (1961). The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 93(2), 440–447.
- Zhang, Y. Y., Zan, L. S., Wang, H. B., Qing, L., Wu, K. X., Quan, S. A., ... Wang, C. J. (2011). Differentially expressed genes in skeletal muscle tissues from castrated Qinchuan cattle males compared with those from intact males. *Livestock Science*, 135, 76–83.

Tabela 1. Composição da dieta experimental.

Ingredientes	%MS
Silagem de Milho	41,51
Milho Fubá	45,29
Farelo de Soja	10,17
Uréia	1,01
Núcleo Mineral ¹	2,02

¹Composição por kg: 150g de Ca, 17g de P, 23g de S, 45g de K, 14g de Mg, 57g de Na, 360mg de Cu, 21,6mg Co, 415mg de Fe, 21mg de I, 715mg de Mn, 6mg de Se, 397g PB (NNP) e 714mg de Monensina Sódica.

Tabela 2. Sequência dos primers referentes aos genes estudados

Gene	Abrev.	Sequência
Transforming growth factor, beta 1	TGFβ 1	F: AGCCAGGGGGGATGTGCCA R: TAGCACGCGGGTGACCTCT
Lysyl oxidase	LOX	F: TGCCCCACAGATGCGCACAC R: CCCC GGACGTCGAGTAGCCA
Metaloproteinase 2	MMP 2	F: CGTCGCCCATCATCAA R: CAGCCGTAGAAGGTGTTTAG
Inibidor da Metaloproteinase 2	TIMP 2	F: CCCGGACGAGTGCCTCTGGA R: CGCAGGAGCCGTCGCTTC
Colágeno Tipo 1 Alfa 1	COL1A1	R: CCACCCCCAGCCGCAAAGAGT F: ACGCAGGTGACTGGTGGGATGTC
Colágeno Tipo 3 Alfa1	COL3A1	F: GGCCCCTGGAAAGGACGGA R: CCCC GCCAGCACCACAACAT
18 S Ribossomal	18 S	F: CCTGCGGCTTAATTTGACTC R: AACTAAGAACGGCCATGCAC

Tabela 3. Teor de colágeno total (Col tot) e percentual de colágeno solúvel (Col sol); Percentual de Colágenos tipos 1 (Col 1) e 3 (Col 3); Proporção de colágeno tipo 3 (PCol 3) expressão relativa de marcadores fibrogênicos (TGF β 1, COL1A1 e COL3A1) e de marcadores do remodelamento do colágeno (LOX, MMP 2, TIMP 2) no músculo LT (*Longissimus thoracis*) de bovinos Nelore.

	Idade (I)			Classe sexual (S)		SEM	P-Value		
	9 m	13 m	16 m	Não Castrado	Castrado		I	S	I*S
Col tot ¹	3,209	3,167	3,247	3,263	3,1526	0,073	0,726	0,231	0,201
Col sol ²	15,923	15,075	14,629	15,879 ^a	14,5384 ^b	0,538	0,187	0,034	0,640
Col 1 ³	9,180	9,771	9,281	9,542	9,2788	0,507	0,372	0,470	0,239
Col 3 ³	1,648	1,683	1,506	1,644	1,5809	0,104	0,106	0,400	0,023
PCol 3 ⁴	15,804	15,236	14,402	15,410	14,8842	0,868	0,180	0,400	0,049
TGFβ1 ⁵	1,046	1,356	1	1,046	1,2184	2,5E-5	0,399	0,443	0,099
LOX ⁵	1,085	1,036	1,121	1	1,1610	1,9E-6	0,974	0,594	0,971
MMP2 ⁵	1	1,189	1,047	1,148	1,0118	3,6E-5	0,651	0,435	0,220
TIMP2 ⁵	1	1,223	1,213	1,138	1,1489	5,0E-5	0,639	0,976	0,286
COL1A1 ⁵	1	1,076	1,310	1,025	1,1207	1,3E-7	0,957	0,809	0,472
COL3A1 ⁵	1	1,823	1,371	1,704	1,0920	1,4E-6	0,523	0,303	0,980

¹Teor de colágeno intramuscular com ênfase no conteúdo de hidroxiprolina em mg/g; ²Porcentagem de colágeno solúvel; ³Porcentagem de área referente ao colágeno do tipo 1 e tipo 3; ⁴Proporção de área referente ao colágeno tipo 3; ⁵Nível de expressão relativa (fold-change) para os seis genes (COL1A1, COL3A1, TGF- β , MMP II, TIMP II e LOX) em comparações pareadas de idades (9, 13 e 16 meses) e classe sexual (Não Castrado e Castrado). ^{a,b} As médias de ^{ab}LS com letra sobrescrita incomum diferem significativamente. Em todos os casos, nível de significância foi estabelecido em $p \leq 0,05$.

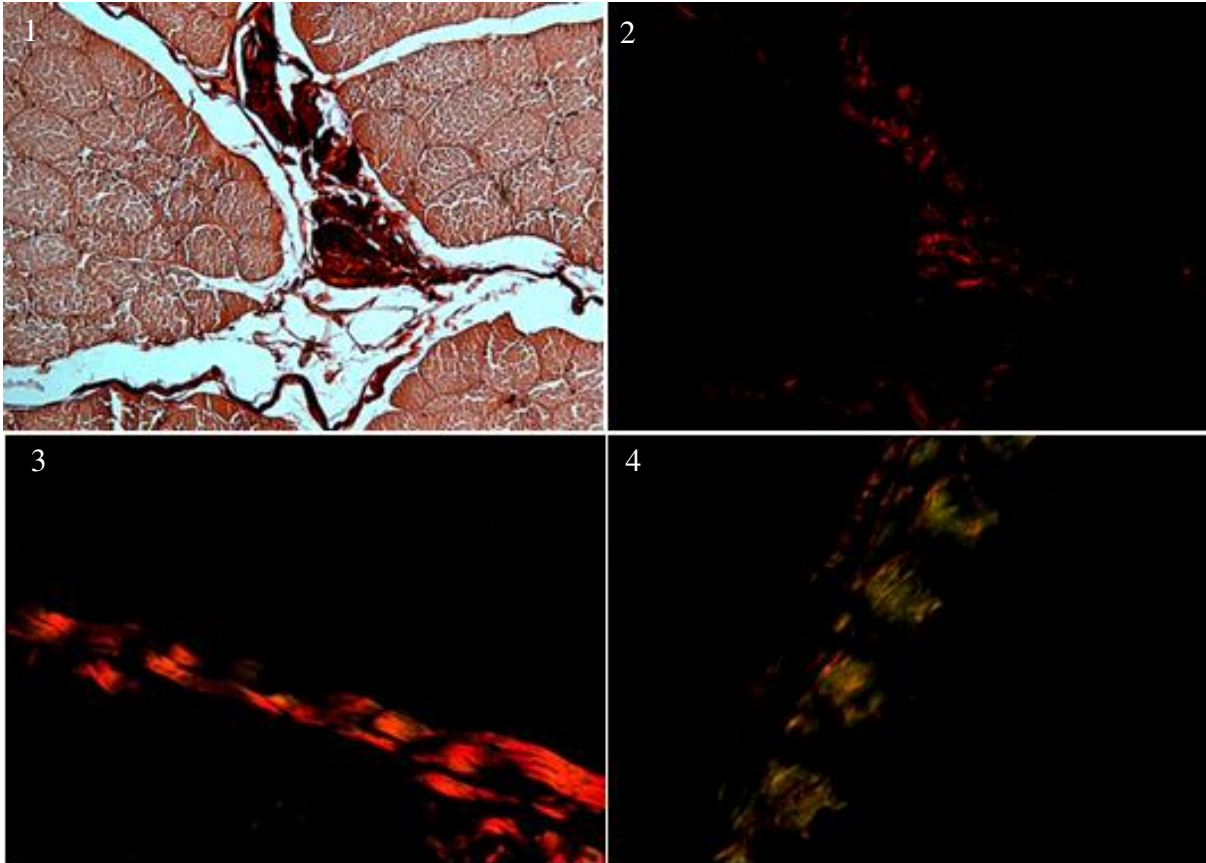


Fig 1. (1) Fotomicrografia mostrando fibras de colágeno no perimísio 200x. (2) Fotomicrografia mostrando fibras de colágeno no perimísio em microscopia de polarização em 200x. (3) Fotomicrografia mostrando fibras de colágeno no perimísio de bovinos Nelore castrados (16 meses) com birrefringência laranja avermelhada sob microscopia de polarização em 400x. (4) Fotomicrografia mostrando fibras de colágeno no perimísio de bovinos Nelore não castrados (16 meses) com birrefringência verde-amarelo sob microscopia de polarização em 400x.

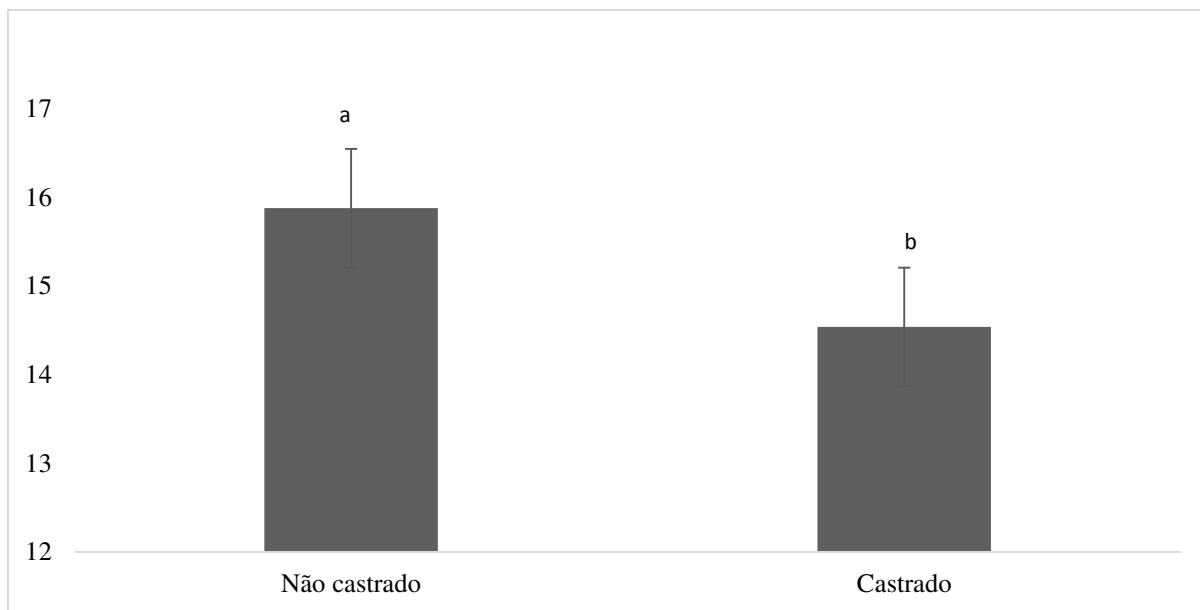


Fig. 2. Porcentagem de colágeno solúvel no LT de touros e novilhos. ^{a,b} As médias de ^{ab}LS com letra sobrescrita incomum diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. Barras denotam erro padrão

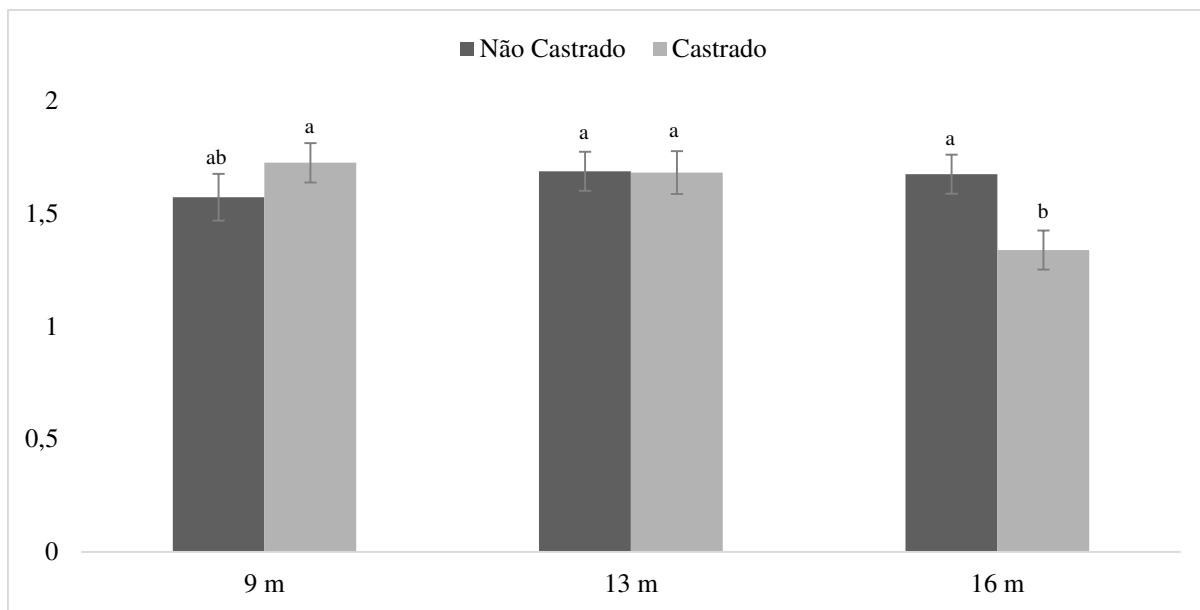


Fig. 3. Porcentagem de área de colágeno tipo 3 (COL 3) no LT de touros e novilhos nas três Idades avaliadas. ^{a,b} As médias de ^{ab}LS com letra sobrescrita incomum diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. Barras denotam erro padrão

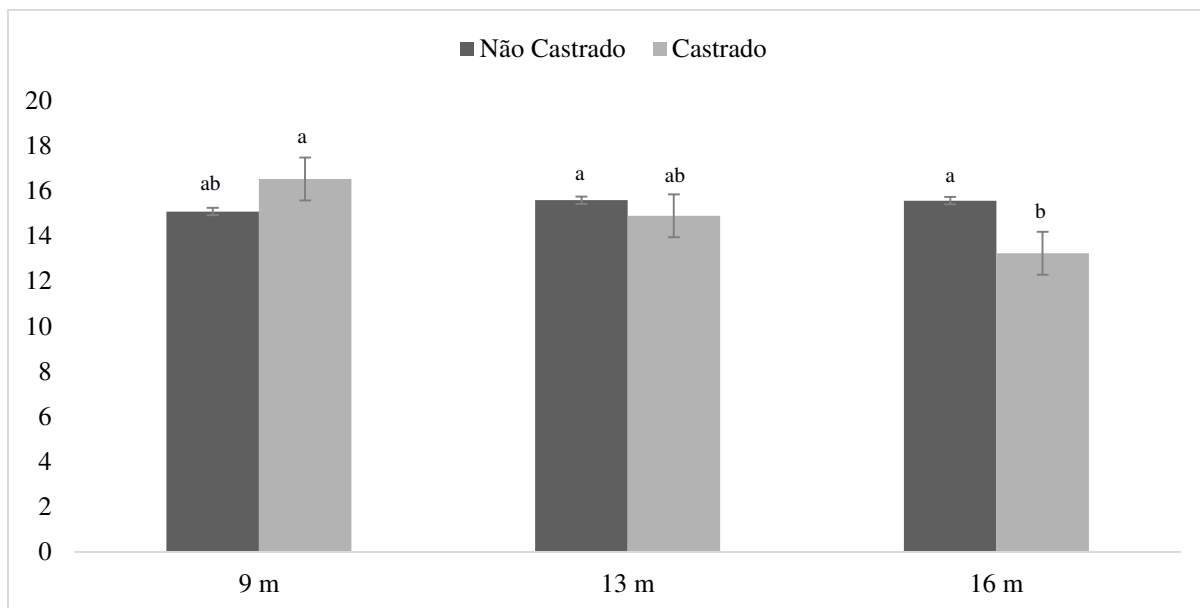


Fig. 4. Proporção de área de colágeno tipo 3 (COL 3) no LT de touros e novilhos nas três Idades avaliadas. ^{a,b} As médias de ^{ab}LS com letra sobrescrita incomum diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. Barras denotam erro padrão