



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS CURITIBANOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
CONVENCIONAL E INTEGRATIVA

Karina Bechtold

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES CANDIDATOS AO
ENVOLVIMENTO ETIOLÓGICO DA MIOPATIA DORSAL CRANIAL
EM FRANGOS DE CORTE**

Curitibanos
2023

Karina Bechtold

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES CANDIDATOS AO
ENVOLVIMENTO ETIOLÓGICO DA MIOPATIA DORSAL CRANIAL
EM FRANGOS DE CORTE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Convencional e integrativa da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Medicina Veterinária.

Orientador(a): Prof.(a) Francielli Cordeiro
Zimmermann, Dr.(a)

Co-orientador: Prof. Adriano Tony Ramos, Dr.

Curitiba

2023

Bechtold, Karina

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES CANDIDATOS AO ENVOLVIMENTO ETIOLÓGICO DA MIOPATIA DORSAL CRANIAL EM FRANGOS DE CORTE / Karina Bechtold ; orientadora, Francielli Cordeiro Zimmermann, coorientadora, Adriano Tony Ramos, 2023.

64 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Curitibanos, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Convencional e Integrativa, Curitibanos, 2023.

Inclui referências.

1. Medicina Veterinária Convencional e Integrativa. 2. complexo de proteínas associadas à distrofina; frangos de corte; condenações de carcaças; doenças musculares. I. Zimmermann, Francielli Cordeiro . II. Ramos, Adriano Tony . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Convencional e Integrativa. IV. Título.

Karina Bechtold

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES CANDIDATOS AO ENVOLVIMENTO ETIOLÓGICO DA MIOPATIA DORSAL CRANIAL EM FRANGOS DE CORTE

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 18 de outubro de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

[Não é necessária a assinatura dos membros]

Prof.(a) Glaucia Denise Kommers, Dr.(a)

Instituição Universidade Federal de Santa Maria

Prof.(a) Aline Félix Schneider Bedin, Dr.(a)

Instituição CEBSU/CCR/UFSC

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Medicina Veterinária Convencional e Integrativa.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof.(a) Francielli Cordeiro Zimmermann, Dr.(a)

Orientador(a)

Curitiba, 2023.

Dedico, com toda a minha gratidão, a minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força de seguir em frente a cada obstáculo.

Aos meus pais, minha irmã, por todo apoio. Ao Rafael por ser meu companheiro, me ajudar e estar comigo durante esse período, não poupar esforços para que tudo acontecesse, por me dar força e ser meu porto seguro, por ter os conselhos mais diretos, por muitas vezes querer me defender do que eu mesmo não sabia que me afetava tanto, por ter cuidado da minha saúde melhor que eu, por ter posto minha vida a frente de tudo, por fim por ser o grande amor da minha vida.

Em memória, a minha tata, meu padrinho, tio Sony e tia Marcia que tanto se orgulhavam e acreditavam no meu futuro. Ao meu professor de inglês Antônio Feliske que com sua paciência sem fim não mediu esforços para eu estar apta para este trabalho e que infelizmente partiu e não pode acompanhar sua conclusão.

Ao professor Rodrigo Bainy Leal, por todo suporte e oportunidade de aprender um pouco mais com seus alunos do Laboratório de Neuroquímica 3, Ingrid Alessandra Victoria Wolin e Angela Patricia França, sem vocês esse trabalho não seria possível, fica minha eterna gratidão.

A todos os médicos que me acompanharam e me deram suporte no momento de doença e me incentivaram a não parar e aprender a olhar para mim, em especial a Dra Isabella que salvou a minha vida, que além de uma profissional inspiradora é um ser Humano lindo.

A minha colega de mestrado Thauany Maffini de Souza, que foi sem dúvidas um dos meus maiores apoios, se tornou aquela amizade para vida toda, mesmo estando longe, quando batia o desespero uma acalmava a outra.

A todos os professores, profissionais e colegas de trabalho, que compartilhei momentos nesta caminhada, agradeço imensamente a todos, aqueles que somaram e aqueles que me mostraram o que eu não quero para a minha vida.

Em especial a minha orientadora por ter me escolhido e confiado em mim para o desenvolvimento deste trabalho, por não ter largado a minha mão quando eu pensei em desistir, por ter sido aquela mãe coruja e atenciosa nos seus conselhos para a vida. Em pensar que um dia fomos tão diferentes, e que mesmo com a diferença de idade e experiência, nos vimos com os mesmos sentimentos em relação a vida. O que mais fez sentido para mim em seguir. Pois acredito que títulos todas as pessoas podem ter, mas olharmos uma para outra como ser

humano, e enxergar além do Mestre, nos faz muito mais Humanos. Hoje sinto muito orgulho de ter sido orientada por uma grande mulher, mãe, doutora, professora, cientista e agora cantora. Obrigada por compartilhar comigo de forma tão sutil e maravilhosa que existe uma vida linda além da profissão.

E por fim e não menos importante ao grande mestre professor Adriano Tony Ramos e o amigo Guilherme Serena, por nossos caminhos se cruzarem novamente depois da graduação e serem incentivadores fundamentais para eu me encorajar a entrar nesta grande aventura.

“Antes de ser um excelente profissional, seja um bom ser humano”
(Autor desconhecido)

RESUMO

Em nível mundial o Brasil é o maior exportador e segundo maior produtor de carne de frango. Com o aumento gradual da demanda de mercado e avanços conquistados com o desenvolvimento genético, alterações nos padrões musculares dessas aves tem sido cada vez mais evidentes. A miopatia dorsal cranial (MDC), é uma das patologias musculares que tem levado a um número significativo de condenações de carcaças, no entanto, sua etiopatogenia ainda é indefinida. A hipótese deste trabalho é que frangos de corte com miopatia dorsal cranial apresentam ausência ou redução de proteínas do complexo de proteínas associadas à distrofina (DAP) no músculo Anterior Latissimus Dorsi (ALD). O objetivo da presente pesquisa foi avaliar a expressão de genes do complexo DAP, em frangos de corte acometidos com a miopatia dorsal cranial. Para a triagem de genes candidatos ao envolvimento etiológico da MDC e quantificação da expressão gênica, foi utilizada a técnica de PCR em tempo real, seguida de western blot para quantificação e imuno-localização proteica em músculos com MDC (grupo macro; N=10), músculos com lesão apenas microscópica (grupo micro; N=10) e músculos normais (grupo controle; N=10). Os grupos macro e micro pertenciam a uma mesma linhagem, de crescimento rápido e o controle à linhagem de crescimento lento. Distrofina, Beta Sarcoglicano, Distroglicano, Distrobrevina, Sarcospan, Utrofina, Desmina, Cristalina e Laminina alfa 2, foram os genes avaliados. Os genes laminina alfa 2, sarcoglicano Beta e sarcospan foram os que apresentaram resultados compatíveis com a hipótese deste trabalho, com expressão diminuída ($P<0,05$) no grupo macro em relação aos grupos micro e controle. Já a distrofina apresentou resultado oposto à laminina, estando aumentada ($P<0,05$) no grupo macro, diferindo também dentro da linhagem de crescimento rápido e entre grupo macro e grupo controle. Outros genes apresentaram comportamento diferente ($P<0,05$) entre a linhagem de crescimento lento e a linhagem de crescimento rápido, desmina e utrofina, com super-expressão nos grupos da linhagem de crescimento rápido (macro e micro). O Gene Cristalina apresentou expressão semelhante entre os grupos macro e controle, ambos com expressão diminuída, quando comparados com o grupo micro. Distroglicano e distrobrevina não demonstraram diferença estatística entre os grupos. As análises de WB e IHC (feitas apenas para Laminina alfa 2), apresentaram resultados que reforçam os resultados do PCR, com padrões de bandas fracos no WB e falhas na membrana basal quando as amostras foram observadas após a IHC (grupos micro e macro). Logo a deficiência de expressão da Laminina alfa 2, sarcoglicano Beta e sarcospan foram consideradas entre as principais envolvidas na etiologia da miopatia dorsal cranial. Com a confirmação da origem genética da MDC, novos trabalhos poderão ser realizados, sobre o melhor destino a ser dado às carcaças acometidas e embasamento para discussões sobre melhoramento genético, que tenham como objetivo a amenização da ocorrência da MDC e redução dos prejuízos econômicos, bem como, frangos com MDC poderão servir de modelo para estudo das distrofias musculares humanas.

Palavras-chave: complexo de proteínas associadas à distrofina; condenações de carcaças; doenças musculares.

ABSTRACT

Worldwide, Brazil is the largest exporter and second largest producer of chicken meat. With the gradual increase in market demand and advances made with genetic development, changes in the muscle patterns of these birds have been increasingly evident. Dorsal cranial myopathy (DCM) is one of the muscle pathologies that has led to a significant number of carcass downgrading, however, its etiopathogenesis is still undefined. The hypothesis of this work is that broiler chickens with dorsal cranial myopathy present absence or reduction of proteins from the dystrophin-associated protein (DAP) complex in the Anterior Latissimus Dorsi (ALD) muscle. The objective of the present research was to evaluate the expression of genes of the DAP complex in broiler chickens affected with dorsal cranial myopathy. For the screening of candidate genes for the etiological involvement of DCM and quantification of gene expression, the real-time PCR technique was used, followed by western blot for protein quantification and immunolocalization in muscles with DCM (macro group; N=10), muscles with only microscopic injury (micro group; N=10) and normal muscles (control group; N=10). The macro and micro groups belonged to the same fast-growing breed and the control to the slow-growing breed. Dystrophin, Beta Sarcoglycan, Dystroglycan, Dystrobrevin, Sarcospan, Utrophin, Desmin, Crystalin and Laminin alpha 2 were the genes evaluated. Laminin alpha 2, Beta Sarcoglycan and Sarcospan genes presented results compatible with the hypothesis of this work, it had its expression reduced ($P<0.05$) in the macro group in relation to the micro and control groups. Dystrophin, on the other hand, presented the opposite result to laminin, being increased ($P<0.05$) in the macro group, also differing within the fast-growing breed and between the macro group and the control group. Other genes showed different behavior ($P<0.05$) between the slow-growing breed and the fast-growing breed, desmin and utrophin, with overexpression in the groups of the fast-growing breed (macro and micro). The Crystalin gene showed similar expression between the macro and control groups, both with reduced expression when compared to the micro group. Dystroglycan and dystrobrevin showed no statistical difference between the groups. The WB and IHC analyzes (done only for Laminin alpha 2) presented results that reinforce the PCR results, with weak band patterns in the WB and gaps in the basement membrane when the samples were observed after IHC (micro and macro groups). Therefore, Laminin alpha 2, Beta Sarcoglycan and Sarcospan expression deficiencies were considered to be among the main involved in the etiology of dorsal cranial myopathy. With the confirmation of the genetic origin of MDC, new work can be carried out on the best destination to be given to affected carcasses and the basis for discussions on genetic improvement, which aim to mitigate the occurrence of MDC and reduce economic losses, as well such as, chickens with MDC could serve as a model for studying human muscular dystrophies.

Keywords: dystrophin-associated protein complex; carcass downgrading; muscle diseases.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Referência do *datasheet*. L1: Tecido de Coração (Humano) - tecido adulto normal, L2: Tecido de Coração (Humano) - tecido adulto normal com Peptídeo imunizante a 1 µg/ml.....28
- Figura 2 - Cortes histológicos de músculos ALD de frangos de corte com 43 dias de idade, H&E. I – amostra de frango caipira de crescimento lento (grupo controle). Fibras musculares normais, ampliação de 100X. II - amostra de frango de linhagem de crescimento rápido sem lesões macroscópicas de MDC, porém com lesões microscópicas (grupo micro). Fibras musculares aumentadas de tamanho, com perda do padrão poliédrico e homogeneização do sarcoplasma (degeneração hialina) (A), ampliação de 400X. III – amostra de frango de linhagem de crescimento rápido com lesão macroscópica de MDC (grupo macro). Fibras musculares com perda do padrão poliédrico (A), sarcoplasma vacuolizado (necrose flocular - B). Infiltrado inflamatório (C). Fibra com núcleos deslocados para o centro e em processo de fagocitose (D), ampliação de 400X.....33
- Figura 3 - Percentual médio de fibras com degeneração e/ou necrose no músculo ALD de frangos de corte de 43 dias de idade. Letras diferentes demonstram diferença estatística significativa entre os grupos.....35
- Figura 4 - Expressão de genes candidatos (eixo de y) ao envolvimento etiológico da miopatia dorsal cranial em amostras de músculo ALD de frangos de corte de 43 dias de vida. Grupos (eixo x): controle (sem lesão), micro (com lesão apenas microscópica) e macro (com lesão macro e microscópica). Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística significativa. Letras iguais, indicam que não houve diferença estatística a um nível de 5% de significância.....37
- Figura 5 - Curva padrão utilizada para a quantificação das proteínas de cada amostra de músculo ALD de frangos de corte. Na fórmula descrita na imagem, multiplicou-se 88,512 pela densidade óptica (DO) média de cada amostra, diminuindo de 9,123, resultando na curva (eixo y) que dividido por 5 resultou na concentração de proteína (eixo x) em (ug/ul).....41
- Figura 6 - Cubas de eletroforese e mini geis, início da corrida, onde é possível identificar os poços com as alíquotas de proteínas das amostras para corrida.....42
- Figura 7 - Cuba de eletroforese em fase intermediária de corrida, onde é possível acompanhar através da marcação a progressão das proteínas.....43

Figura 8 - Sistema <i>semi dry</i> , onde ocorreu a etapa de eletrotransferência.....	43
Figura 9 - Imagem de uma membrana após coloração com Ponceau, onde pode-se confirmar a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose. Os valores 225,150,102,76,52,38,31,24 são as faixas de pesos do padrão de peso molecular. kDa: Quilodaltons, unidade de medida dos pesos moleculares, PM: padrão de peso molecular, usado para comparativo na formação das bandas de proteínas. ER: Pool de encéfalo de rato, MH: músculo humano, PF: peito de frango, FCC: grupo controle, FSL: grupo micro (com lesão apenas microscópica), FCL: grupo macro (com lesão macroscópica e microscópica).....	44
Figura 10 - Imagem da formação das bandas de Beta actina. Os valores 225,150,102,76,52,38,31,24 são as faixas de pesos do padrão de peso molecular, kDa: Quilodaltons, unidade de medida dos pesos moleculares, MH: músculo humano, FCC: grupo controle, FSL: grupo micro (com lesão apenas microscópica), FCL: grupo macro (com lesão macroscópica e microscópica), PF: peito de frango, ER: Pool de encéfalo de rato.....	45
Figura 11 - Imagem da formação das bandas de Beta actina nas demais membranas. M3, M5, M6, M7, M8: identificação das membranas.....	45
Figura 12 - Imagem da formação das bandas de Laminina alfa 2. Laminina: Faixa de peso molecular a qual há marcação da proteína Laminina alfa 2 (seta). Valores 225,150,102,76,52,38,31,24: Faixas de pesos moleculares, kDa: Quilodaltons, unidade de medida dos pesos moleculares MH: músculo humano, FCC: grupo controle, FSL: grupo micro (com lesão apenas microscópica), FCL: grupo macro (com lesão macroscópica e microscópica), PF: peito de frango, ER: Pool de encéfalo de rato.....	46
Figura 13 - Imagem das demais membranas completas, seguindo a indicação de faixa de peso molecular da figura anterior é possível observar as ausências de formação das bandas de Laminina alfa 2 nas demais membranas. M3, M5, M6, M7, M8: identificação das membranas.....	47
Figura 14 - Cortes histológicos transversais de músculos ALD de frangos de corte submetidos à imuno-histoquímica para Laminina alfa 2, contra coloração com hematoxilina, ampliação total 400X. (A) Amostra sem lesão (grupo controle). (C) Amostra com lesão apenas microscópica (grupo micro). (E) Amostra com lesão macroscópica e microscópica (grupo macro). (A) Marcações positivas nas regiões de membrana basal muscular (setas vermelhas). Observa-se integridade de	

membranas basais. (C, E) Marcações positivas para Laminina alfa 2 nas regiões de membrana basal muscular (setas vermelhas) e regiões de descontinuidade ou ausência de marcação (setas amarelas), indicando deficiência parcial de Laminina alfa 2. (B, D, F) Controle negativo da reação, em um segundo corte da mesma região das amostras A, C, E, incubados com PBS. Nestes cortes não houveram marcações.....49

Figura 15 - Médias de marcação positiva para Laminina alfa 2, evidenciando os limites máximos, mínimos, quartis e média, nos três diferentes grupos, controle, micro e macro.....50

Figura 16 - Obtenção de imagem no Image J. Foi estabelecido uma escala numérica do *Threshold color* 0/255 para Hue, 50/230 para *Saturation* e 0/180 para *Brightness* (I) para extrair apenas as marcações positivas em membrana basal. As marcações contabilizadas foram evidenciadas em amarelo (II). As marcações em tecido conjuntivo adjacente à fibra muscular foram manualmente excluídas de cada uma das imagens. Ao obter as medidas, contabilizou-se a porcentagem absoluta de marcação da fotomicrografia (III), que posteriormente foi transformada em porcentagem relativa. Esse percentual é relativo à área total de 546.750 pixels da imagem.....51

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Resultado da dosagem de proteína de cada amostra de músculo ALD de frangos de corte de 43 dias de vida, representado por ug/ul.....41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média dos graus de fibrose, tecido adiposo, inflamação e tipos de células inflamatórias nos diferentes grupos. Grupo lesão macroscópica, Grupo lesão microscópica e Grupo controle.....	34
Tabela 2 - Quantificação da porcentagem de marcação positiva para Laminina alfa 2 nos três diferentes grupos, controle, micro e macro. O valor representa a Média e o desvio padrão a 5% de significância.....	48

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	DESENVOLVIMENTO.....	19
2.1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
2.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
2.2.1	Coleta das amostras.....	23
2.2.2	Avaliação morfológica das amostras.....	24
2.2.3	Descrição da técnica de PCR em tempo real (experimento 1).....	25
2.2.4	Descrição da técnica de Western blot (experimento 2).....	26
2.2.5	Descrição da técnica de IHQ (experimento 3).....	28
3	RESULTADOS.....	32
3.1	ANÁLISES MORFOLÓGICAS.....	32
3.2	PCR.....	35
3.3	RESULTADOS WB.....	40
3.4	RESULTADOS IHQ.....	47
4	DISCUSSÃO.....	51
5	CONCLUSÃO.....	55
	REFERÊNCIAS.....	56

1 INTRODUÇÃO

Diversas são as causas de condenações de carcaças de frangos de corte e as desordens musculares estão entre elas, dando destaque ainda à miopatia dorsal cranial (MDC). A MDC foi relatada inicialmente no Brasil (ZIMERMANN et al, 2012), mas tem ocorrência nos demais continentes onde se tem a produção intensiva de frangos de corte. Apesar de todo o prejuízo econômico já identificado, não se sabe ao certo ainda sua causa.

A constatação da presença da Miopatia Dorsal Cranial (MDC), acontece apenas na linha de abate, onde observa-se o amarelamento da pele e aumento de volume subcutâneo na região dorsal, entre as asas. Na ave viva, na granja, até o momento não foram identificados sinais clínicos sugestivos da alteração, sendo uma patologia estudada até o momento, na carcaça, ou seja, *post mortem*. Na macroscopia as lesões relacionadas à MDC, se limitam ao músculo Anterior Latissimus Dorsi (ALD). Dentre elas ocorre edema subcutâneo, hemorragia na superfície muscular, palidez, aderência e aumento da espessura do músculo e são observados após o corte da pele que recobre o músculo ALD. Na microscopia é possível observar lesão degenerativa (miofibras hialinas), necrótica (miofibras em floculação), polifásica, variação na espessura das fibras musculares, *splitting*, fibras em regeneração, infiltrado linfocítico, adiposo e de tecido conjuntivo (fibrose) no músculo ALD afetado (ZIMERMANN et al, 2012).

Tendo em vista as altas taxas produtivas, todo e qualquer fator que possa levar a prejuízos, quando incluídos aos desafios já rotineiros na cadeia de produção de aves, resultam em perdas significativas, que refletem na economia de toda uma região. As condenações parciais e totais de carcaças, são as representantes destes prejuízos. As condenações por MDC em sua maioria acontecem de forma parcial, em machos (0,5%), mais velhos e mais pesados, sendo estes de linhagens de frangos de corte geneticamente melhorados para crescimento rápido e produção de carne (ZIMERMANN et al., 2012). Para dimensionar o impacto econômico que a miopatia dorsal cranial pode representar frente a avicultura nacional, se for usado como base a produção anual de 14,524 milhões de toneladas de carne de frango em 2022 (ABPA, 2023) e 6,1 bilhões de frangos abatidos no país (IBGE, 2023), 0,5% destes frangos condenados por MDC, em relação ao total de frangos abatidos, representa 30,5 milhões de frangos com MDC no país por ano.

Se forem comparadas às outras espécies, o ciclo de criação de frangos de corte é bastante curto, o que fez com que nestes, os avanços genéticos a fim de otimizar a produção ocorresse de forma mais rápida nas últimas décadas, com objetivo bastante direcionado ao rendimento muscular. Desta forma, é de fundamental importância incluir o melhoramento genético, como fator complementar ou principal no desenvolvimento de patologias musculares.

Para as desordens musculares em humanos, tais como distrofia muscular de Duchenne destacam-se como agentes etiológicos os fatores genéticos, provocados por mutações em genes, como o gene responsável pela codificação da proteína distrofina (HOFMANN et al., 1987) e, ou mutações em genes que codificam proteínas do complexo de proteínas associadas à distrofina (DAP). Estudos que correlacionam a presença ou ausência e quantificação da distrofina e proteínas do complexo DAP em músculos de frangos de corte, que apresentem miopatia dorsal cranial ainda não tinham sido desenvolvidos.

Pode-se então sugerir como hipótese, que frangos de corte com miopatia dorsal cranial apresentam ausência ou redução de mRNA e proteínas do complexo de proteínas associadas à distrofina no músculo Anterior Latissimus Dorsi (ALD). Assim, hipoteticamente, a Miopatia dorsal cranial de frangos e a distrofia muscular de Duchenne (ou outras distrofias musculares humanas relacionadas à alteração no DAP) apresentam etiologias semelhantes.

O presente trabalho teve por objetivos realizar a avaliação do perfil de expressão de genes envolvidos na produção do complexo de proteínas associadas à distrofina e alguns outros genes relacionados à miopatias conhecidas em humanos, em amostras de músculos de frangos de corte que foram acometidos naturalmente pela a miopatia dorsal cranial. Com esse estudo espera-se também que o frango de corte possa ser utilizado como modelo animal para o estudo das miopatias humanas.

O modelo animal é de grande importância dentro ciência, possibilitando a experimentação de alternativas terapêuticas para humanos, ainda mais quando leva-se em consideração as afecções que não chegou-se a um tratamento efetivo ou mesmo paliativo, aplicável na rotina. Este trabalho também é de grande importância quando leva-se em consideração os impactos econômicos e a cadeia de produção avícola no país. Acrescenta-se ainda o fato de que SC é um estado de destaque na

produção de aves, mas onde pouco se discute sobre as pesquisas voltadas às patologias musculares que se tornaram muito importantes na produção avícola.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Na indústria de frangos de corte o Brasil se destaca por ser o segundo maior produtor mundial e o maior exportador. A Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA) tem estimativas de que o Brasil no ano de 2022 produziu 14,524 milhões de toneladas de carne de frango, sendo este valor menor somente ao produzido pelos EUA. Em 2004 o Brasil passou a ser líder no ranking de exportações mundiais de carne de frango (ABPA, 2023) e mantém essa posição até o momento.

O estado de Santa Catarina é o segundo maior produtor nacional de frangos de corte, tendo cerca de 14,5% dos frangos abatidos dentro da unidade federativa em 2022. Cerca de 66,8% da carne de frango produzida no Brasil, tem como destino o mercado interno (ABPA, 2023). Diversas alterações musculares vem sendo encontradas atualmente em abatedouros e impactam nos descartes de carcaças e conseqüentemente perdas econômicas, sendo elas a miopatia peitoral profunda, a miopatia dorsal cranial, o peito amadeirado, as estrias brancas e a carne espaguete (KUTTAPPAN et al., 2013; LAKE et al., 2011; SIHVO et al., 2014). No final da década de 70 foi definida a etiologia da miopatia peitoral profunda ou doença do músculo verde, como uma miopatia isquêmica (SILLER et al., 1979), porém, as demais miopatias permanecem sem causa definida.

Em medicina humana o estudo das miopatias está bastante avançado com suas etiopatogenias esclarecidas. Historicamente, a proteína muscular mais relevante no desenvolvimento das distrofias musculares humanas é a distrofina, uma proteína do citoesqueleto, associada a actina F, aos distroglicanos e as sintrofinas, onde a ausência resulta na perda dos componentes do complexo de proteínas associadas a distrofina (DAP).

Este complexo é composto por distrofina, dois sub complexos de distroglicanos (subunidades alfa e beta), o complexo dos sarcoglicanos (subunidades alfa, beta, gama e delta), sintrofinas (subunidades alfa, beta1 e beta 2), distrobrevina e sarcospan. Já a utrofina, desmina, plectina, B-cristalina e

laminina, são outras proteínas estruturais que são associadas a miopatias em humanos. A distrofina, as sintrofinas e a distrobrevina, são localizadas no sarcoplasma, já os distroglicanos, sarcoglicanos e sarcospan, são glicoproteínas transmembranares e a laminina é uma proteína da lâmina basal da fibra muscular (KIERSZENBAUM, 2008). A distrofina tem como função reforçar e estabilizar o sarcolema durante o estresse da contração muscular, mantendo uma conexão mecânica entre o citoesqueleto e a matriz extracelular (KIERSZENBAUM, 2008).

A distrofia muscular de Duchenne em humanos, tem como característica a deficiência de distrofina, afetando 1 em 3.500 recém nascidos do sexo masculino, sendo já manifestada na infância progredindo para a imobilidade e morte precoce, aos 20 anos, em 100% dos afetados, devido a falência dos músculos cardíaco e respiratório (HOFMANN et al., 1987). Quando submetidos à biópsia, estes músculos apresentam destruição muscular, ausência de distrofina e uma redução significativa de sarcoglicanos e de outros componentes do complexo DAP, que são detectados através de imunohistoquímica ou western blot (MIRANDA, et al., 1988; HOFMANN et al., 1987; FREUND, et al., 2007). A distrofia de Duchenne, é relatada em jovens em diversas partes do mundo, permanecendo sem uma terapêutica eficiente definida. Se confirmada a hipótese de que a miopatia dorsal cranial de frangos e a distrofia de Duchenne, se comportam de maneira etiológicamente semelhante, a utilização de frangos como modelo animal para estudos sobre os possíveis tratamentos de humanos torna-se possível.

Histologicamente as patologias (no frango e nos humanos) se comportam de forma bastante semelhantes, com presença de miofibras necróticas, progressiva substituição das fibras musculares por tecido conjuntivo (fibrose), regeneração, grande variabilidade no diâmetro das fibras, perda de padrão poliédrico, *splitting* e infiltrado de adipócitos (RAFAEL et al., 1997; SKUK et al. 2004; ZIMERMANN et al., 2012). Segundo Sundaram e Uppin (2012), nas miopatias, é possível identificar as fibras necróticas e presença de infiltrado inflamatório, predominantemente de células mononucleares e alguns heterófilos, levando a miofagocitose, sendo o tecido muscular substituído por tecido conjuntivo fibroso e fibro-adiposo nas lesões mais crônicas.

O gene distrofina está presente no cromossomo X de humanos (MERYON, 1852; DUCHENNE, 1868) e no cromossomo 1 das aves (número de acesso no genbank - NC_006088.3), que codifica a distrofina (427kd), seu tamanho é bastante

semelhante entre humanos e frangos e com uma região C-terminal, codificadora de 627 aminoácidos, altamente conservada (95%) quando comparados o gene de frango e de humano (LEMAIRE et al,1988). O gene que codifica a distrofina sofre mutações constantes (HU et al., 1988).

Quanto às outras proteínas relacionadas a miopatias humanas, a laminina alfa dois é uma das integrantes da matriz extracelular, sendo codificada no braço longo do cromossomo 6, locus 6q22-23. Sua deficiência tem sido descrita em 50% dos casos de distrofia muscular congênita, sendo assim nomeada a miopatia por deficiência de laminina alfa dois. A distrofia muscular congênita é uma forma autossômica recessiva de miopatia, tendo como importante característica a diminuição do tônus muscular em neonatos associada a contraturas e rigidez nas articulações, elevação dos níveis séricos de CK e alterações da mielinização da substância branca na ressonância magnética (BUSHBY et al., 1998; W ERNECK et al., 1997; W ERNECK & BONILLA, 1995; W E W ER & ENGVALL, 1996).

Em tecido muscular, a expressão da proteína laminina alfa dois ocorre nas regiões periféricas às fibras, membrana basal, sendo esta composta exclusivamente por carboidratos e proteínas glicosiladas, juntamente de colágeno tipo IV, que fornecem ancoragem mecânica, suporte bioquímico e regenerativo em caso de lesão direta (SANES, 2003). As proteínas não-colágenas mais abundantes em membrana basal muscular, são as isoformas das lamininas, abundantes heterotrímeros em diversos órgãos, sendo a laminina alfa dois a mais prevalente, com a função de manutenção e estabilização da força de tração de todas as estruturas envolvidas na contração muscular, tanto dos miócitos quanto dos neurônios da junção neuromuscular, servindo de barreira física contra agentes patogênicos e moléculas que possam causar dano de caráter bioquímico, como radicais livres oriundos de estresse oxidativo. Esse heterotrímero possui um formato análogo a uma cruz e é formado por cadeias $\alpha 2$, $\beta 1$ e $\gamma 1$ polipeptídicas (SCHÉELE; NYSTRÖM; DURBEEJ; TALTS; EKBLÖM; EKBLÖM, 2007).

Em humanos, as mutações com conservação parcial da leitura do gene laminina alfa dois, resultam em fenótipos semelhantes às distrofinopatias e sarcoglicanopatias, com acometimento da musculatura proximal dos membros inferiores. Podendo desenvolver hipertrofia de panturrilhas e a elevação dos níveis séricos de CK que variam entre 6 e 10 vezes acima do normal. Já a distrofina, o complexo sarcoglicano e o p-distroglicano se mantêm normais (BUSHBY et al.,

1998; HOFFMAN et al., 1996; NAOM, D'ALESSANDRO & SEW RY, 1998; PINI, 1996; SEW RY et al., 1995, TAN et al., 1997).

Sarcospan é uma proteína integral de membrana de 25 kDa, formadora de um subcomplexo compacto com os sarcoglicanos que tem como função estabilizar o alfa distroglicano no sarcolema (YOSHIDA et al., 2000; CROSBIE et al., 1997). Logo a perda de qualquer sarcoglicano tem como consequência a diminuição ou ausência do subcomplexo sarcolemal, que resulta em distúrbios musculares esqueléticos e cardíacos (NALINI et al., 2010). Mutações no gene sarcospan não tem sido associadas a doenças musculares em humanos, no entanto, diversos relatos trazem uma típica redução ou ausência desta proteína em pacientes com diagnóstico de distrofia muscular de cinturas (CROSBIE et al., 2000).

A proteína utrofina é relatada como uma das mais similares estruturalmente com a distrofina, podendo chegar a 80% de semelhança. A utrofina é encontrada com bastante relevância em células musculares do feto e depois da vida fetal muda para as junções neuromusculares e miotendinosas. Em muitos dos casos de pacientes com diagnóstico de Distrofia Muscular de Duchenne, a utrofina apresenta-se em níveis elevados como mecanismo compensatório da redução da distrofina, onde estabeleceu-se uma correlação inversa significativa entre a expressão da utrofina e a severidade da doença. (ZHOU et al.,2006; FAIRCLOUGH; BAREJA; DAVIES, 2011; RODINO; MENDELL; SALENK,2013). Alguns estudos bastante promissores propõem o uso químicos que podem super regular a atividade do gene utrofina afim de aumentar os níveis da proteína e assim prevenir a distrofia muscular (ZHOU et al.,2006; FAIRCLOUGH; BAREJA; DAVIES, 2011). Ainda assim podendo evitar reações imunes, pois a mesma já é produzida naturalmente pelas células (ZHOU et al., 2006). Estudos experimentais em ratos mdx (ratos que não têm distrofina funcional nos músculos devido a uma mutação), tem apresentado efeitos benéficos, onde a força e resistência ao estiramento mecânico apresentaram uma recuperação de 80%, depois da super expressão da utrofina. Usou-se a injeção intramuscular de vetor adenoviral que expressa utrofina sintética, resultando em diminuição de fibrose e aumento na expressão de proteínas associadas a distrofina (MARKET et al., 2009). Alguns componentes são descritos experimentalmente que superregulam a utrofina, sendo um dos mais promissores a heregulina (FAIRCLOUGH; BAREJA; DAVIES, 2011). Estudos mostram que o butirato de arginina também aumentou a expressão de utrofina em miotubos humanos em

cultura, sendo um bom candidato a ensaios clínicos (VIANELLO et al., 2013). A compreensão dos mecanismos de super-expressão de utrofina nos frangos com MDC inicial e crônica (grupos micro e macro), também pode ser útil para os estudos de possíveis tratamentos da distrofia muscular de Duchenne.

Em frangos de corte, o intenso melhoramento genético com a finalidade de rendimento muscular pode ter induzido a alterações neste gene ou em genes correlatos que são responsáveis pela produção de outras proteínas associadas à distrofina e a estabilização muscular no momento da contração. Sendo assim a falta ou a redução dessas proteínas no músculo de frangos, pode ser uma das possíveis causas da miopatia dorsal cranial.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Coleta das amostras

As amostras foram provenientes de frangos de corte criados em granjas comerciais e coletadas no frigorífico, logo após o abate das aves. Foram 20 frangos de linhagem de crescimento rápido (10 carcaças com lesão macroscópica – “grupo macro” - e 10 carcaças sem lesão macroscópica, porém com lesão microscópica – “grupo micro”) e 10 frangos de linhagem de crescimento lento (caipiras Label rouge) sem lesão macro e microscópica – “grupo controle”. Todos os 30 frangos eram machos, com idade variando entre 43 e 44 dias. A padronização dos grupos foi por idade e não por peso. As amostras coletadas de todos os grupos foram do músculo Anterior Latissimus Dorsi (ALD). Cada amostra foi dividida em cinco partes, uma delas submetida a fixação em formol tamponado a 10% e as demais partes colocadas separadamente em criotubos identificados e congeladas em nitrogênio líquido, sendo mantidas em freezer -80°C, até a realização das análises de PCR em tempo real e western blot. As porções fixadas em formol, ficaram fixadas por tempo indeterminado e foram posteriormente submetidas à processamento histopatológico e imuno-histoquímica. Para imuno-histoquímica, na etapa de padronização da técnica, não foi possível obter marcação com as amostras usadas nos demais ensaios e foi necessário usar amostras dos mesmos grupos experimentais, porém coletadas em projeto piloto anterior, congeladas e armazenadas em freezer -20°C. Essas amostras foram fixadas em formol tamponado 10% por 24h e seguiram o

processamento histopatológico e a imuno-histoquímica, conforme descrito no item abaixo (2.2.5).

2.2.2 Avaliação morfológica das amostras

A avaliação da morfologia das amostras teve o propósito de certificar que os grupos amostrais realmente pertenciam aos grupos definidos no delineamento experimental. Esta etapa do projeto foi realizada e apresentada por Torteli (2021) em seu trabalho de conclusão de curso. Após a fixação, as amostras foram clivadas transversalmente a aproximadamente 2 mm, desidratadas em equipamento histotécnico (OMA) através da passagem em soluções de graduação alcoólica crescente, clarificadas em xilol, emblocadas em parafina aquecida, seccionadas a 3 micrômetros em micrótomo (Leica) e coradas com hematoxilina e eosina. As lâminas foram submetidas à avaliação qualitativa e quantitativa das fibras musculares em objetiva de 40X em microscópio Leica. Para cada amostra, foi feita a contagem de um total de 300 fibras musculares em diferentes campos de avaliação (seguindo a metodologia de McCORMACK, et al. 2008, adaptada), sendo que dessas, foram avaliadas a quantidade de fibras que estavam em processo de degeneração e/ou necrose e a quantidade de fibras com núcleos centralizados quantificando o total de fibras com lesão e a média em cada grupo. Outras características também foram avaliadas em relação ao corte histológico qualitativamente: presença de fibrose, tecido adiposo e inflamação. Estas alterações foram quantificadas usando a objetiva de 40X e seguindo o seguinte método: grau 0: sem relevância; grau 1: leve, acometendo de 0-30% do corte histológico; grau 2: moderado, acometendo de 30-70% do corte histológico; grau 3: acentuado, acometendo de 70-100% do corte (TORTELI, 2021).

Os dados foram submetidos à análise estatística iniciando com a transformação dos dados, Box-cox, com $\lambda = 0,2342582$. Os valores transformados foram testados quanto a distribuição normal usando Shapiro-Wilk. Após normalizados, foram submetidos ao teste de Tukey, pelo software R, para múltiplas comparações, entre os diferentes grupos.

2.2.3 Descrição da técnica de PCR em tempo real (experimento 1)

Para quantificação da expressão de mRNA dos genes candidatos, as amostras de músculos oriundas de animais dos grupos macro, micro e controle foram submetidas a extração de RNA e posteriormente a PCR em tempo real.

Os genes codificadores de proteínas musculares estruturais que apresentaram alteração significativa de expressão, foram considerados candidatos ao envolvimento etiológico da MDC. Distrofina, Beta Sarcoglicano, Distroglicano, Distrobrevina, Sarcospan, Utrofina, Desmina, Cristalina e Laminina - alfa 2, foram os genes analisados.

O RNA total foi extraído com Trizol de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação do RNA extraído foi realizada por densidade ótica utilizando espectrofotômetro NanoDrop (Thermo) em um comprimento de onda de 260nm. A integridade do RNA foi analisada eletroforicamente por coloração com Gel Red e sua pureza, através da taxa de absorção da relação OD260/OD280 onde não foram utilizados valores inferiores a 1,8. O RNA total foi tratado com DNase (Promega, Madison, WI) a 37°C por 30min para digerir qualquer DNA contaminante. A reação de transcriptase reversa foi realizada com 1 mM oligo (dT) primer, Omniscript RTase (Omniscript RT Kit, Qiagen), dNTP se inibidor da RNase (Amersham Biosciences). A expressão relativa do gene foi realizada por PCR em tempo real (ABI Prism 7300, Applied Biosystems) e a variabilidade na quantidade mRNA foi corrigida pela amplificação de dois genes *housekeeping* (médias de GAPDH e Beta actina). Para a avaliação da expressão dos genes Distrofina, Beta Sarcoglicano, Distroglicano, Distrobrevina, Sarcospan, Utrofina, Desmina, Cristalina e Laminina - alfa 2 primers específicos para a espécie foram desenhados utilizando o programa Primer Express (Applied Biosystems) e foram sintetizados pela invitrogen. As sequências específicas para o desenho dos primers foram embasadas no Genbank e no Ensembl. Para verificar a identidade do produto, foram realizadas análises de curvas de dissociação de cada transcrito. As amostras foram processadas em duplicatas e expressas relativamente a um gene housekeeping (médias de GAPDH e Beta actina). Os dados então foram normalizados com uma amostra utilizada como calibrador através do método Ct com correção para eficiência de amplificação (PFAFFL, 2001).

As diferenças nos níveis de expressão de mRNA foram analisadas por ANOVA e comparações múltiplas entre os grupos foram realizadas usando as médias dos mínimos quadrados. Os dados foram testados para distribuição normal usando o teste de Shapiro-Wilk e normalizados quando necessário usando transformação logarítmica.

2.2.4 Descrição da técnica de Western blot (experimento 2)

Nesta etapa, foi realizada a tentativa de quantificação da proteína muscular estrutural Laminina – alfa 2, candidata ao envolvimento etiológico da MDC, a qual o gene demonstrou alteração significativa de expressão de mRNA. Para a realização desta etapa e confirmação de que as proteínas produzidas a partir deste gene estavam em quantidade alterada nos músculos dos diferentes grupos experimentais, fragmentos diferentes das mesmas amostras que foram submetidas ao PCR, foram submetidos à técnica de western blot para quantificação das proteínas. Nesta técnica as seguintes etapas foram realizadas: extração de proteína; dosagem de proteína; eletroforese; eletrotransferência; imunodeteção; revelação e fotodocumentação das membranas.

As amostras de tecido muscular foram submetidas ao processo de lise em Eppendorf com o auxílio de um pistilo e 250 µl tampão SDS Stop solution 4% (Tris 50 mM, EDTA 2 mM, SDS 4%, pH 6,8 suplementado com coquetel inibidor de proteases) na razão de 1:10 (tecido:tampão). Após a homogeneização do tecido, as amostras foram colocadas em banho seco a 100°C por 5 minutos, agitadas em vórtex, centrifugadas a 13.000 rpm durante 10 min e congeladas a -20°C por 3 horas. Posteriormente descongeladas em banho seco a 70° C e agitadas em vórtex. Novamente as amostras foram centrifugas a 13.000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente coletado e transferido para outro Eppendorf. As amostras foram submetidas a agitação por vórtex e centrifugadas a 1300 rpm por 3 minutos. Após, foi retirada uma alíquota para quantificação de proteínas pelo método de Lowry modificado. Subsequentemente foi adicionado às amostras uma solução de glicerol 25% (25% de glicerol, 100 mM Tris, azul de bromofenol, pH 6,8) na relação 25:100 (v/v) e β-mercaptoetanol (concentração final 8%). As amostras foram armazenadas a - 80°C até a realização da eletroforese. As

proteínas provenientes dessa extração foram analisadas pelo método de Western blot.

A eletroforese das proteínas (50µg por poço) foi realizada em minigel de SDS-PAGE em gradiente de 6% a 12% e transferida para membranas de nitrocelulose utilizando um aparelho de transferência semi-dry (1,2 mA/cm²; 1,5h). Para verificar a eficiência de transferência, as membranas foram coradas com Ponceau S. Para a imunodeteção, as membranas foram bloqueadas por 1h com leite desnatado a 5% em solução salina tamponada (TBS) (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). As membranas foram incubadas com anticorpo primário específico anti Laminina alfa 2 (ab140482 policlonal produzido em coelho, diluição 1:1.000) e anti β-actina (sc47778 anti-camundongo, diluição 1:5.000) diluídos em TBS-T (solução salina tamponada com Tris e Tween a 0,01%) contendo 2% de albumina (BSA), *overnight* em constante agitação. Em seguida, foram realizadas três lavagens com TBS-T. Após, as membranas foram incubadas durante 1 h à temperatura ambiente, em constante agitação, com o anticorpo secundário específico conjugado a peroxidase (HRP) para detecção das bandas proteicas. Posteriormente, as membranas foram submetidas a três lavagens com TBS-T e duas lavagens com TBS. Para a revelação dos imunoblottings foi utilizado Super ECL (Cytiva Amersham™ ECL Select™ Western Blotting Detection Reagent), utilizando o aparelho Fotodocumentador ChemiDoc (BioRad®), disponível no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (Lameb)/CCB/UFSC. As bandas foram quantificadas usando o software Image Lab®.

Para a imunodeteção o anticorpo utilizado foi o anti Laminina alfa 2 (ab140482), da Abcam, peptídeo sintético correspondente à Laminina Humana 2 alfa aa 2500-2600 conjugada com hemocianina de lapa, Database link: P24043, que tem como espécie hospedeira o coelho, adequado para uso nas técnicas de WB e IHQ, sendo descrito como reativo em humanos e predito para reagir em tecidos de rato, coelho, cavalo, frango, vaca, chipanzé, macaco, gorila e hamster chinês (Figura 1).

Figura 1 - Referência do *datasheet*. L1: Tecido de Coração (Humano) - tecido adulto normal, L2: Tecido de Coração (Humano) - tecido adulto normal com Peptídeo imunizante a 1 µg/ml.



Fonte: Product *datasheet* Anti-Laminin 2 alpha antibody ab140482.

2.2.5 Descrição da técnica de IHQ (experimento 3)

O objetivo desta etapa foi verificar se a proteína em estudo encontrava-se morfológicamente alterada nos músculos com lesão macro e micro, quando comparada ao músculo normal. Nesta análise foram utilizadas amostras diferentes das utilizadas nos experimentos anteriores, porém, de animais pertencentes aos mesmos grupos experimentais descritos no item “coleta das amostras”. Isto por que o tempo excessivo de fixação em formol impossibilitou a imuno-marcação e foi necessário o uso de outras amostras que estavam congeladas. Estas amostras foram descongeladas e fixadas em formol tamponado 10% por 24h e submetidas ao processamento histológico rotineiro com inclusão dos tecidos em parafina.

Anticorpos, kits e preparo dos reagentes e soluções: Para a realização da técnica foram utilizadas lâminas positivas e tratadas quimicamente com aminosilano (Immunoslide). De cada amostra, foram realizados dois cortes histológicos de 3 micrômetros cada e colocados em uma mesma lâmina, sendo um para controle negativo da reação, incubado com PBS e outro com o anticorpo. O anticorpo primário usado foi o anti Laminina alfa 2 (ab140482 policlonal produzido em coelho, diluição 1:800 em PBS). Para a realização das etapas de incubação com anticorpo secundário e polimerização, utilizou-se o kit Novolink Polymer Detection Systems

(Leica RE 7280k) de revelação e detecção de polímero. Os reagentes utilizados do kit foram a solução “Post Primary” (IgG de coelho anti-rato <math><10\mu\text{g}/\text{mL}</math> em 10% v/v de soro animal em solução salina tamponada de Tris/0,1% ProClin™ 950) e solução “Novolink Polymer” (IgG anti-coelho poli-HRP <math><25\mu\text{g}/\text{mL}</math> com 10% v/v de soro animal em solução salina tamponada de Tris/0,1% ProClin™ 950). Todos os reagentes e tampões que não eram do kit (tampão Tris-EDTA e o PBST e solução de leite em pó desnatado para bloqueio de reações inespecíficas foram analisados quanto ao pH. Os sais para preparo destes reagentes foram medidos em balança de precisão de 4 dígitos e pH aferido com pHmetro previamente calibrado. O tampão Tris-EDTA foi preparado utilizando 0,605g de Trizma base da marca Sigma Aldrich e 0,185g de EDTA, seguindo o princípio de “quantidade suficiente para” (q.s.p), em 500mL de água RODI (*Reverse osmosis deionized water*). Após a diluição, o pH foi aferido em peagâmetro (pH 9,0). Para correção de pH do tampão, utilizou-se a solução básica de NaOH 1M ou a solução ácida de HCl 50%. A solução de lavagem de PBST foi preparada utilizando 3,7g de fosfato de sódio dibásico da marca LS Chemicals, 1,075g de fosfato de potássio monobásico da marca Dinâmica Química Contemporânea Ltda. e 18g de cloreto de sódio, também da marca Dinâmica Química Contemporânea Ltda. Adicionado 1,25 μL de tween 20 no momento da mistura, obtendo-se 2,5L de PBST, q.s.p. O pH do PBST também foi aferido utilizando peagâmetro (7,0 e 7,6), padronizou-se pH em 7,3. As soluções de bloqueio de reações inespecíficas foram preparadas no dia de realização da técnica e consistia na imersão das lâminas em uma solução a base leite em pó desnatado, na proporção de 5% de leite para cada 100mL de PBST. A solução reveladora, a base do cromógeno 3-3 diaminobenzidina (DAB) da marca Sigma Aldrich®, foi preparada com 0,072g de DAB, 120mL de PBS e 1,2mL de peróxido de hidrogênio 3%.

Realização da técnica: as amostras destinadas a imunohistoquímica, depois de colocadas em lâminas positivadas, permaneceram por 24h em estufa a 60°C, seguindo para etapa inicial de desparafinização, passando 20 minutos em xilol à 60°C e 5 min em xilol morno. A hidratação foi realizada através da passagem seriada e sequencial em tipos decrescentes de etanol, iniciando por 3 passagens de 5 minutos em etanol absoluto, seguida de mais passagens de 5 minutos, uma em etanol 96%, uma em etanol 80% e por fim em etanol 70%. Ao fim desta etapa foram realizadas 2 lavagens de 5 minutos em água RODI. Em seguida, as lâminas foram

encaminhadas para a recuperação antigênica, sendo submersas em solução tampão de Tris-EDTA em pH 9 e submetidas a um estresse térmico controlado de 99°C, realizado em banho maria digital, durante 20 minutos. Durante o período de elevação até a temperatura desejada, as lâminas já eram submetidas ao equipamento, para evitar choque térmico no tecido durante o andamento do protocolo. Após os 20 minutos em 99°C, as amostras eram retiradas do banho maria digital e ficavam na bancada para alcançarem a temperatura ambiente. Em seguida, foram realizadas 3 lavagens de 5 minutos em água RODI para dar continuidade ao protocolo. A etapa subsequente consistiu no bloqueio das enzimas peroxidases endógenas do tecido, através da submersão dos cortes em peróxido de hidrogênio (10 volumes) 3% por 10 minutos, primeiramente delimitando o corte com uma caneta de parafina e em seguida pingando a substância diretamente nos cortes em todas as lâminas. Após, as lâminas eram novamente submetidas a 2 lavagens de 5 minutos em água RODI e uma lavagem de 5 minutos em PBST. Após essas lavagens, as lâminas foram submersas nos 200mL da solução de bloqueio de reações inespecíficas a base de leite em pó, por 60 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas eram mais uma vez submetidas a 2 lavagens em água RODI, uma vez por 3 minutos e outra por 1 minuto e logo após, 2 lavagens em PBST, também por 5 minutos. Após essa etapa, as lâminas eram retiradas das cubetas e com auxílio de papel toalha, o excesso de PBST era manualmente extraído. Em seguida, 100 a 400 microlitros do anticorpo primário que era colocado sobre os cortes, já posicionados em câmara úmida. O anticorpo era colocado apenas em um dos cortes de cada lâmina, enquanto no outro corte colocava-se apenas PBS, sendo este o controle negativo da reação. Após a aplicação do anticorpo primário nos cortes, as lâminas eram levadas à geladeira (a uma temperatura média de 4,1°C) para incubação overnight (16h). No segundo dia de protocolo, as lâminas eram retiradas da geladeira e seguia-se para 3 lavagens de 5 minutos em PBST. Na sequência, eram incubadas, com o anticorpo secundário, proveniente do kit Novolink (Leica), durante 2h. Após o processo de incubação o excesso de anticorpo foi retirado e as lâminas submetidas a 3 lavagens de 5 minutos em PBST, em seguida incubadas por 2h com o polímero, também proveniente do kit Leica. Ao fim dessa incubação, as lâminas foram submetidas às últimas lavagens em PBST, também em 3 lavagens de 5 minutos e posteriormente à etapa de revelação da marcação através do cromógeno DAB. O DAB, preparado no dia, poucos minutos antes do

uso, foi então gotejado em cada um dos cortes e verificou-se a presença ou não de reação após sua aplicação, bem como sua intensidade de marcação (num período de 1-10 minutos após a aplicação do DAB). Ao observar a ocorrência da marcação, parou-se a reação submergindo a lâmina em um frasco com água RODI e confirmou-se observando as lâminas ao microscópio. Após todas as lâminas da bateria terem sido marcadas, elas foram submetidas a uma única lavagem em água RODI, por 3 minutos. Por fim, foi realizada uma contra coloração para contraste de fundo, com hematoxilina de Harris, deixando em contato com os cortes por aproximadamente 2 minutos e 30 segundos. Em seguida, as lâminas foram submersas rapidamente em água RODI, seguidas de mais 5 minutos de imersão em água RODI. Ao fim dos 5 minutos, o excesso de água era retirado por uma secagem rápida na estufa, para que então as lâminas fossem submetidas à etapa de desidratação e montagem. A desidratação ocorria submergindo as lâminas 2 vezes em etanol 96% por 10 segundos cada e por 3 vezes de 10 segundos em etanol absoluto. O excesso de etanol era retirado novamente por uma secagem rápida na estufa, passadas em xilol de clarificação, seguidas de xilol de montagem e na sequência, montadas com goma de Damar e lamínula.

As análises inicialmente se deram através de avaliação qualitativa para identificar se houve marcação na técnica. Posteriormente, as lâminas foram fotografadas utilizando *software* LEICA LAS EZ e salvas em formato .tif com maior resolução possível pelo microscópio Leica DM500 (5MP). As imagens obtidas foram novamente analisadas, porém desta vez de forma quantitativa através do *software* Image J. Neste *software* a marcação positiva foi convertida em uma porcentagem da área total fotografada. Foram submetidas à técnica oito amostras e cada uma foi fotografada 5 vezes em ampliação de 400x, em regiões distintas, caracterizando 5 repetições por amostra e totalizando 120 imagens.

As imagens fotografadas foram, então, analisadas por meio do *software* para obtenção dos dados de marcação positiva, todas com padronização dos parâmetros de análise: Imagem analisada em *Threshold color*, *Hue pass* 0/255; *Saturation pass* 50/230 e *Brightness pass* 0/180, seguida por *Measurements*, onde foi obtida a área marcada, que posteriormente foi convertida em área relativa, tendo o marco de 546.750 pixels como 100% de área. Na análise das imagens, as falsas marcações em região de tecido conjuntivo foram excluídas manualmente para evitar interferências nos dados finais. Essas informações obtidas foram levadas à uma

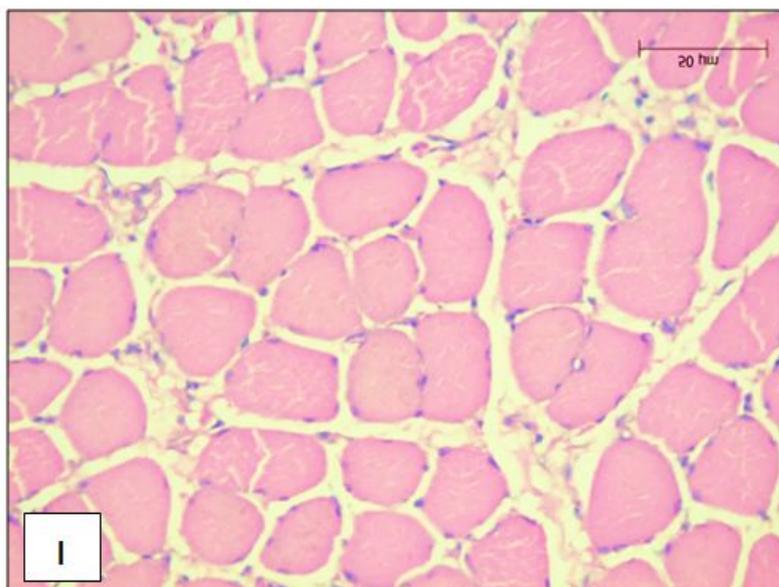
tabela do Microsoft Excel, dispostas em 3 colunas, uma para os tratamentos, uma para as repetições de cada tratamento e uma com os dados de área de marcação positiva. Optou-se por utilizar os dados relativos, via porcentagem de marcação da figura. Posteriormente, sob análise via software R Studio, através do teste de comparação de médias de Tukey de foi possível chegar a algumas inferências estatísticas, que forneceram um norte para a discussão dos resultados.

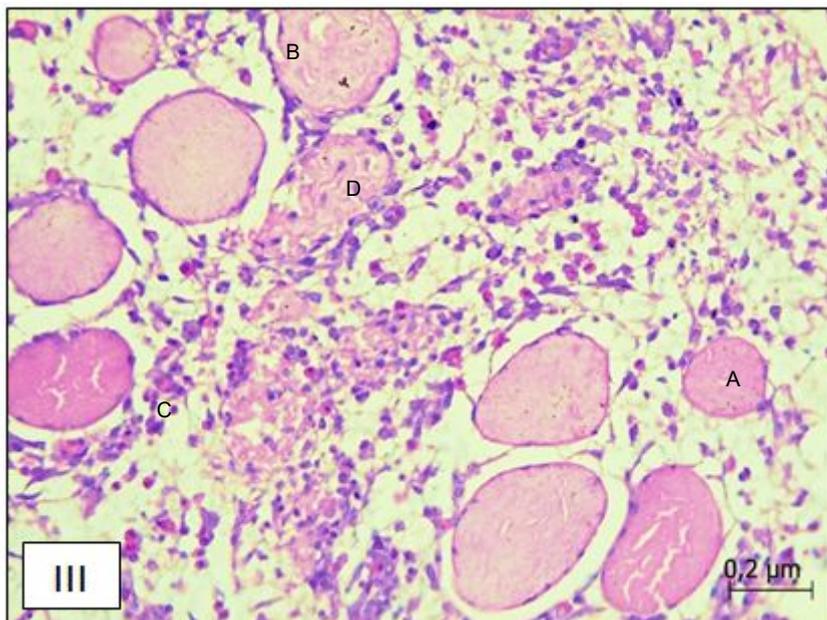
3 RESULTADOS

3.1 ANÁLISES MORFOLÓGICAS

As amostras de músculos do grupo controle apresentaram fibras musculares morfológicamente normais, com formato poliédrico, tamanho padrão, sem alterações no sarcoplasma, nem infiltrado inflamatório, sem proliferação de tecido conjuntivo fibroso e adipócitos (Figura 2 I). Já em ambos os grupos da linhagem de crescimento rápido (grupo macro e grupo micro), a análise histológica demonstrou as miofibras com perda do padrão poliédrico, homogeneização do sarcoplasma, hipereosinofilia (degeneração hialina), vacuolização do sarcoplasma (necrose flocular), infiltrado de linfócitos e macrófagos, tecido conjuntivo fibroso e adipócitos substituindo as fibras musculares. A quantidade destas alterações foi bem mais expressiva no grupo macro (Figura 2 III) em relação ao grupo micro (Figura 2 II).

Figura 2 - Cortes histológicos de músculos ALD de frangos de corte com 43 dias de idade, H&E. I – amostra de frango caipira de crescimento lento (grupo controle). Fibras musculares normais, ampliação de 100X. II - amostra de frango de linhagem de crescimento rápido sem lesões macroscópicas de MDC, porém com lesões microscópicas (grupo micro). Fibras musculares aumentadas de tamanho, com perda do padrão poliédrico e homogeneização do sarcoplasma (degeneração hialina) (A), ampliação de 400X. III – amostra de frango de linhagem de crescimento rápido com lesão macroscópica de MDC (grupo macro). Fibras musculares com perda do padrão poliédrico (A), sarcoplasma vacuolizado (necrose flocular - B). Infiltrado inflamatório (C). Fibra com núcleos deslocados para o centro e em processo de fagocitose (D), ampliação de 400X.





Fonte: TORTELLI, 2021.

As análises quanto ao grau de fibrose, presença de adipócitos, inflamação e tipos de células inflamatórias, foram representadas através das médias de cada grupo (Tabela 1). O grupo controle apresentou presença insignificante de fibrose, adipócitos e células inflamatórias. No grupo micro, o grau de fibrose foi 1, média de adipócitos 1, quase não apresentou inflamação, sendo poucos os macrófagos e linfócitos. No grupo macro, a média do grau de fibrose foi 2, média de adipócitos 2, inflamação 1 e as principais células inflamatórias presentes foram macrófagos, linfócitos e alguns heterófilos.

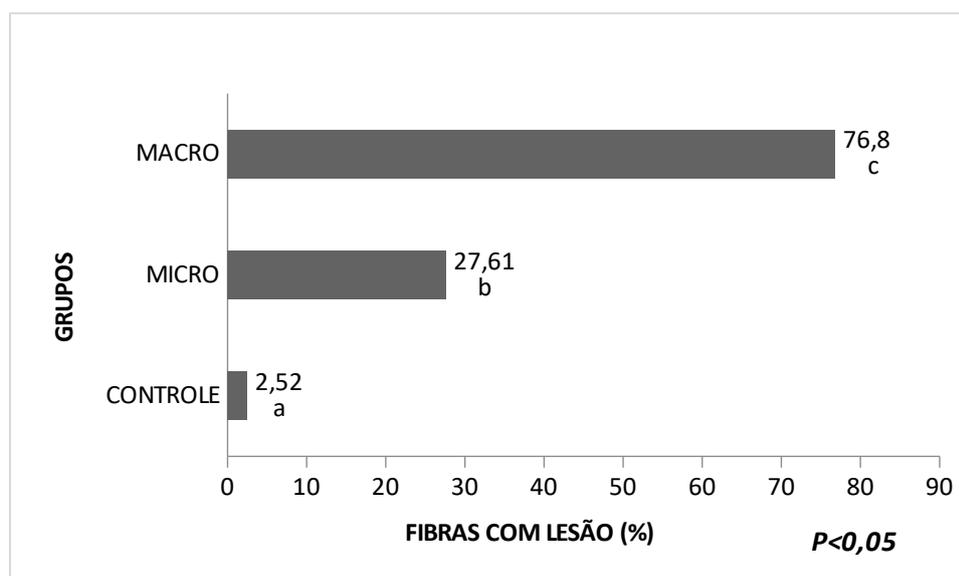
Tabela 1 - Média dos graus de fibrose, tecido adiposo, inflamação e tipos de células inflamatórias nos diferentes grupos. Grupo lesão macroscópica, Grupo lesão microscópica e Grupo controle.

Grupos	Grau médio de fibrose	Grau médio de adipócitos	Grau médio de inflamação	Tipos de células inflamatórias
Controle	0	0	0	
Micro	1	1	0	Macrófagos, linfócitos
Macro	2	2	1	Macrófagos, linfócitos e heterófilos

Fonte: TORTELI, 2021.

A análise estatística demonstrou que a quantidade de fibras com lesão entre os três grupos foi significativamente diferente ($P < 0,05$), (Figura 3). Nos frangos do grupo controle a quantidade de lesões encontradas foi praticamente insignificante (média de 2,52%). Nos frangos do grupo micro foi encontrada média de 27,61% de fibras com lesão e nos frangos do grupo macro média de 76,80% de fibras com degeneração e/ou necrose.

Figura 3 - Percentual médio de fibras com degeneração e/ou necrose no músculo ALD de frangos de corte de 43 dias de idade. Letras diferentes demonstram diferença estatística significativa entre os grupos.



Fonte: TORTELI, 2021.

3.2 PCR

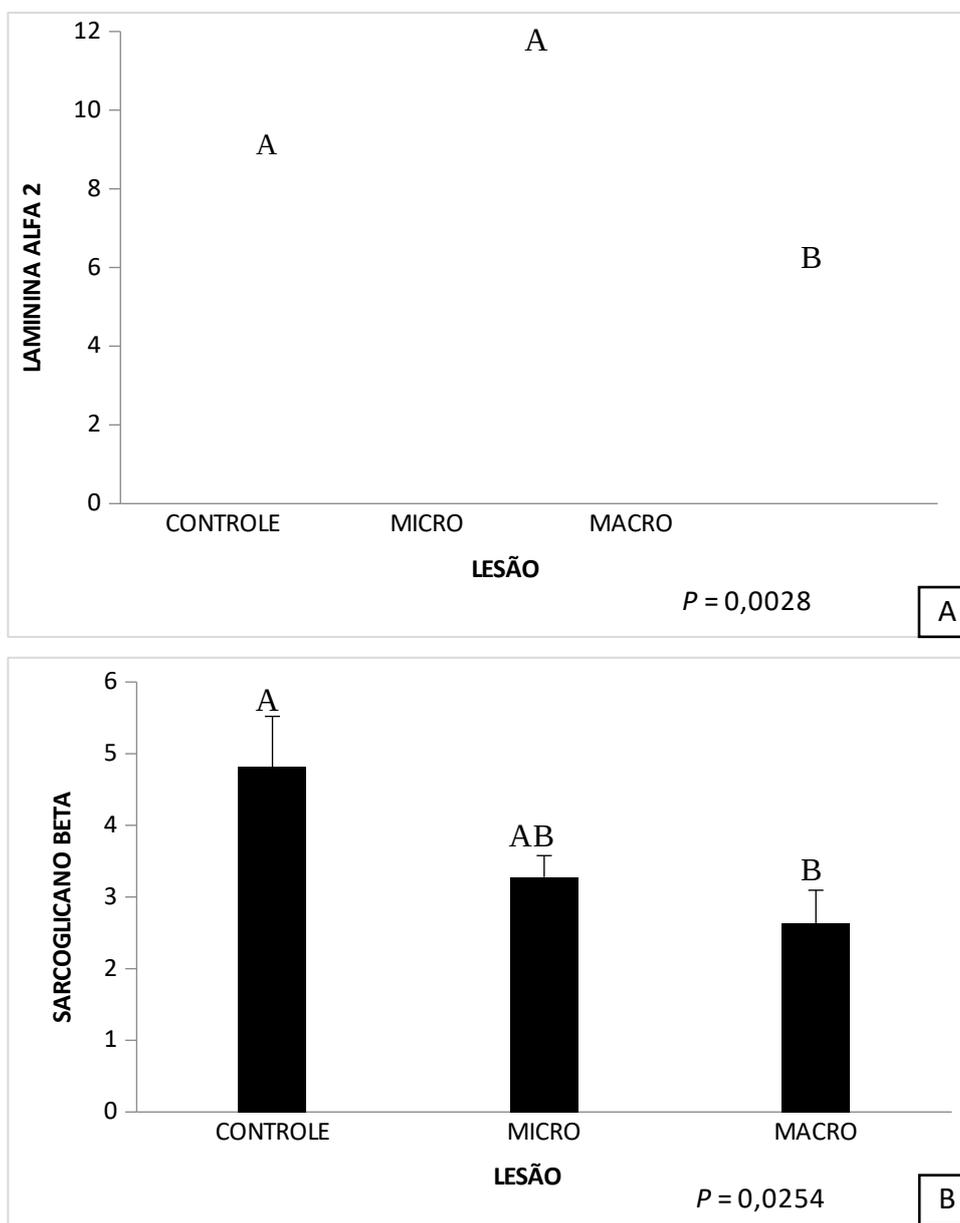
Os genes candidatos ao envolvimento etiológico da MDC, laminina alfa 2, sarcoglicano beta e o sarcospan (Figura 4 A, B e E), apresentaram expressão de mRNA reduzida ($P < 0,05$). O sarcoglicano beta e o sarcospan dentro da mesma linhagem de crescimento rápido (grupos macro e micro) apresentaram resultados semelhantes, diferindo apenas o grupo macro do grupo controle. A laminina alfa 2, diferiu dentro da mesma linhagem e também quando comparada a linhagem de crescimento rápido (grupo macro) com o grupo controle (linhagem de crescimento lento). O sarcoglicano beta foi semelhante entre os grupos micro e controle e também semelhante entre os grupos micro e macro, entretanto entre os grupos controle e macro houve diferença estatística ($P < 0,05$), com sub-expressão no grupo macro. Quanto aos demais genes, a Distrofina apresentou expressão aumentada ($P < 0,05$) no grupo macro (Figura 4 I), diferindo também dentro da linhagem de crescimento rápido e entre grupo macro e grupo controle.

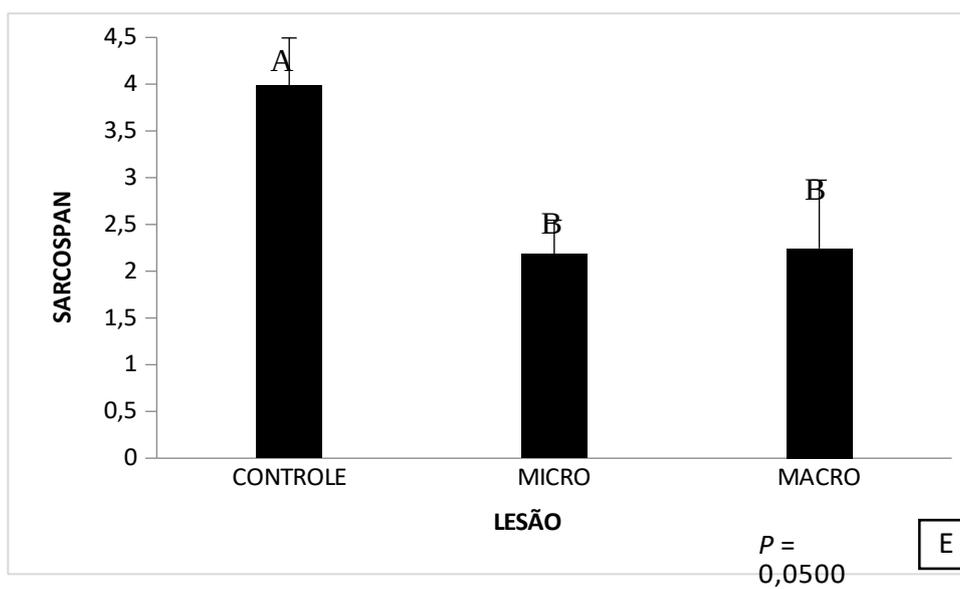
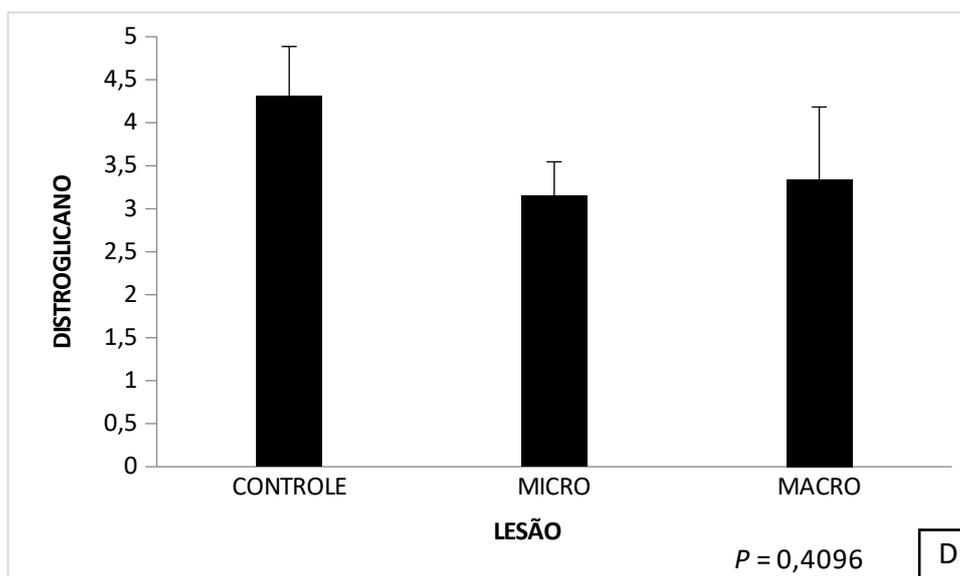
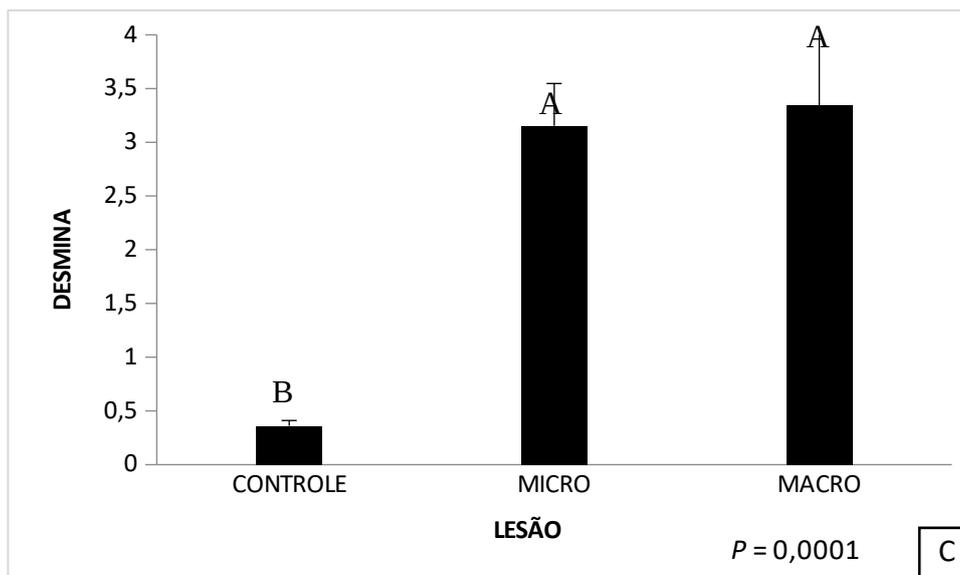
Ao considerar a diferença estatística ($P < 0,05$), outros genes apresentaram comportamento diferente entre a linhagem de crescimento lento e a linhagem de crescimento rápido, sendo desmina e utrofina (Figura 4 C e F), com super-expressão nos grupos da linhagem de crescimento rápido (macro e micro).

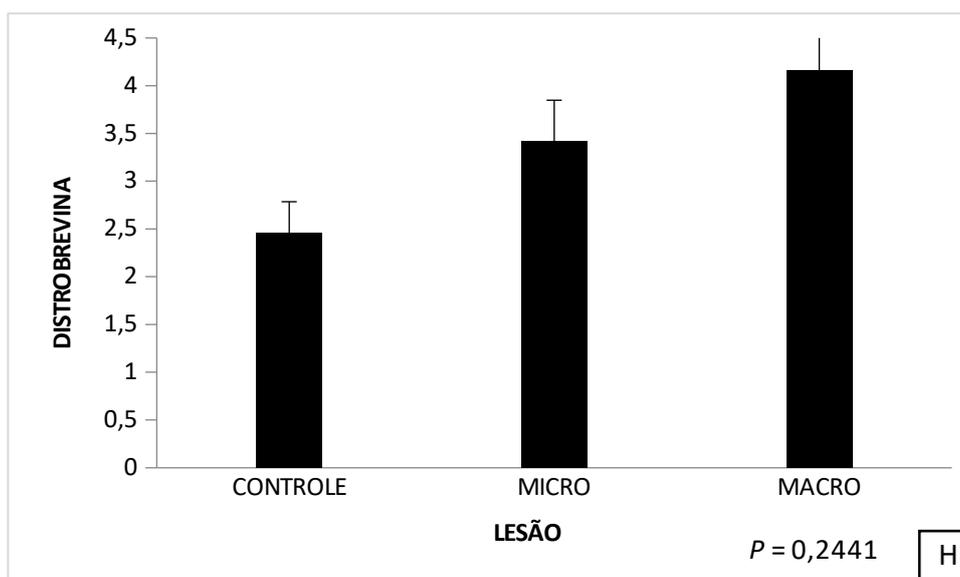
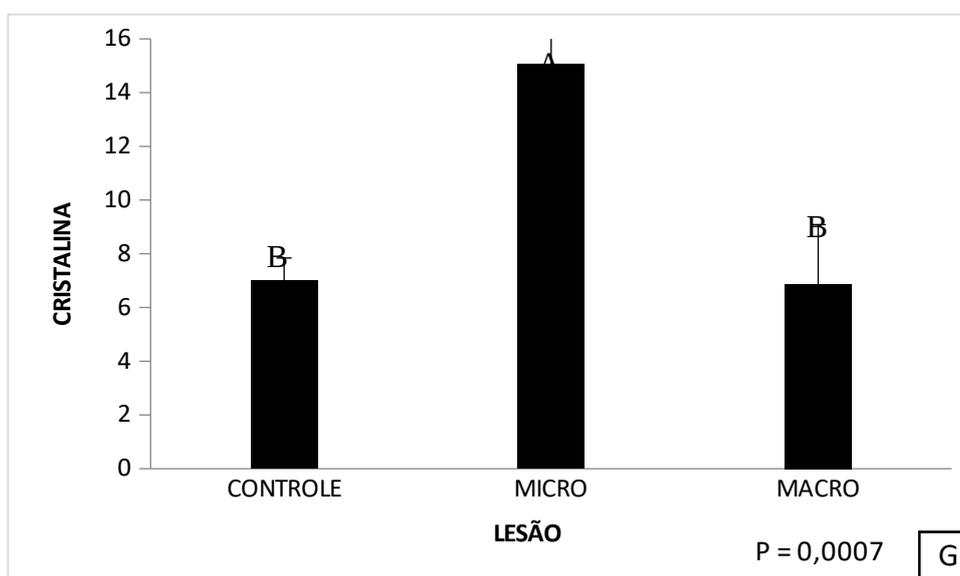
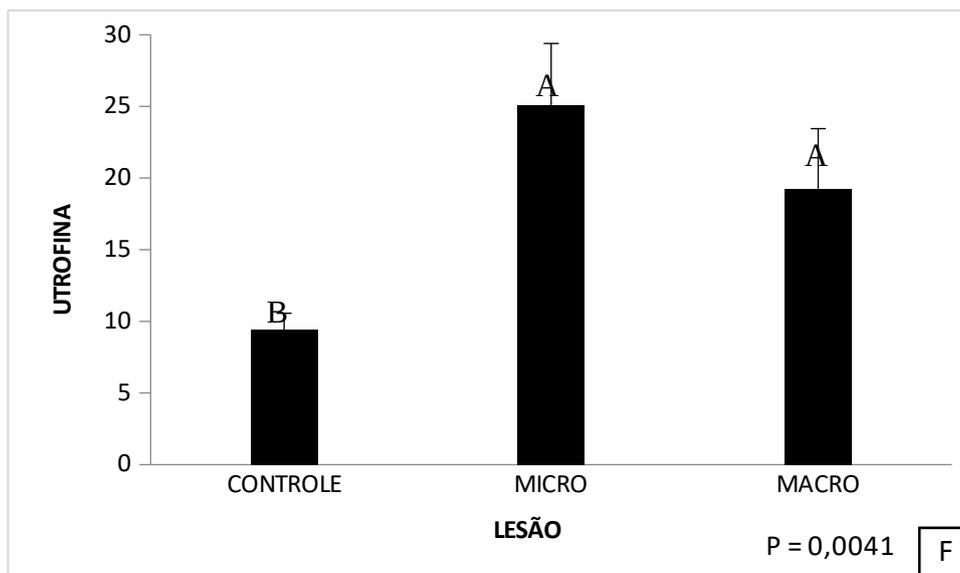
Já o gene Cristalina apresentou expressão semelhante entre os grupos macro e controle, ambos com expressão diminuída ($P < 0,05$), quando comparados com o grupo micro. Distroglicano e distrobrevina não demonstraram diferença estatística entre os grupos (Figura 4 D e H).

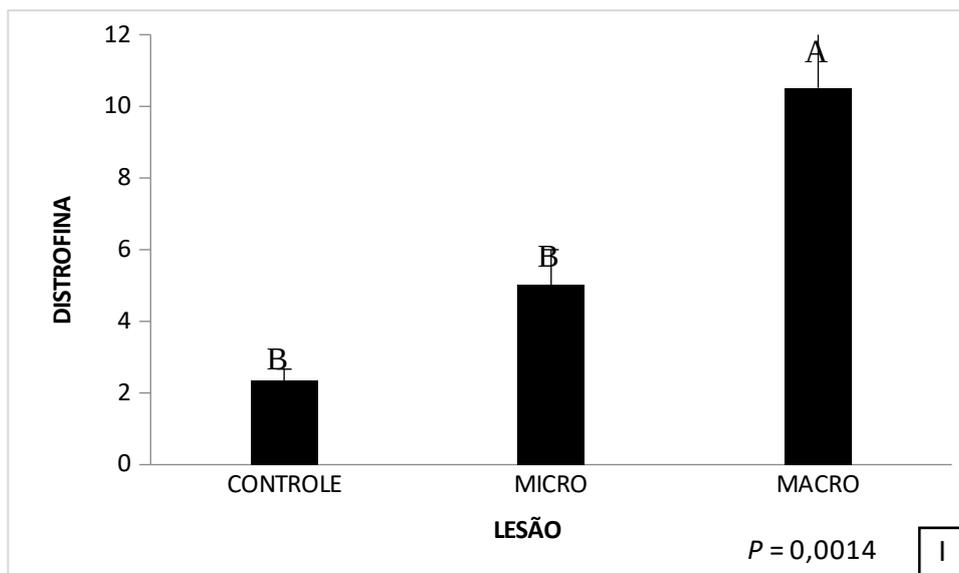
Sendo assim, dentre os genes estudados, a laminina alfa 2, o sarcoglicano Beta e sarcospan foram os genes que apresentaram alterações indicativas de deficiência de expressão, condizentes com a hipótese do trabalho. A Laminina alfa dois, por ter neutralizado o efeito da linhagem, foi analisada pelos experimentos subsequentes de WB e IHQ.

Figura 4 - Expressão de genes candidatos (eixo de y) ao envolvimento etiológico da miopatia dorsal cranial em amostras de músculo ALD de frangos de corte de 43 dias de vida. Grupos (eixo x): controle (sem lesão), micro (com lesão apenas microscópica) e macro (com lesão macro e microscópica). Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística significativa. Letras iguais, indicam que não houve diferença estatística a um nível de 5% de significância.









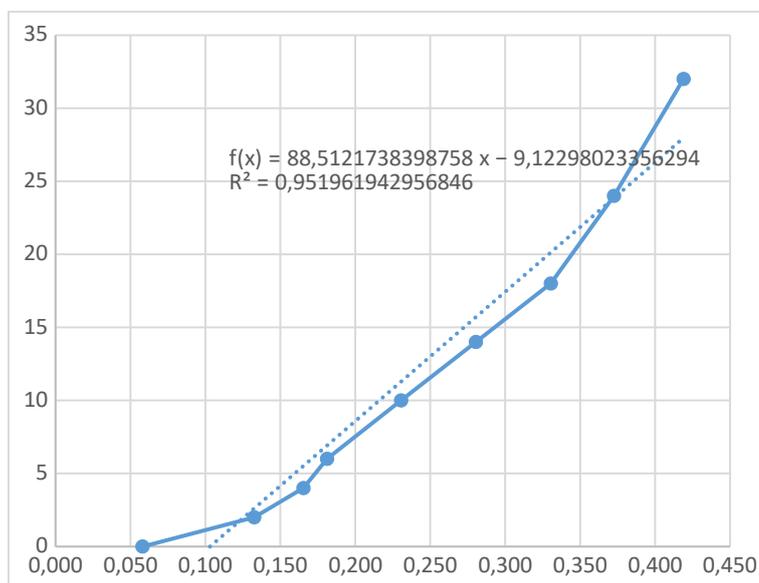
Fonte: o autor.

3.3 RESULTADOS WB

Para a realização da técnica de WB, foram realizadas várias rodadas de padronização, com o objetivo de ajustar a metodologia já descrita em material humano, para o tecido muscular de frangos de corte. Nesta técnica as seguintes etapas foram realizadas: extração de proteína; dosagem de proteína; eletroforese; eletrotransferência; imunodeteccção; revelação e fotodocumentação das membranas.

Para a etapa de extração e dosagem de proteínas foi realizada a curva padrão, com concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA), versus absorbância da amostra, onde obteve-se a equação de ajuste (Figura 5) em que foi possível substituir, os valores médios de absorbância das amostras (densidades ópticas médias), resultando na concentração de proteína total (ug/ul) de cada amostra (Quadro 1).

Figura 5 - Curva padrão utilizada para a quantificação das proteínas de cada amostra de músculo ALD de frangos de corte. Na fórmula descrita na imagem, multiplicou-se 88,512 pela densidade óptica (DO) média de cada amostra, diminuindo de 9,123, resultando na curva (eixo y) que dividido por 5 resultou na concentração de proteína (eixo x) em (ug/ul).



Fonte: o autor

Quadro 1 - Resultado da dosagem de proteína de cada amostra de músculo ALD de frangos de corte de 43 dias de vida, representado por ug/ul.

nº Eppendor f	nº da amostra	DO1	DO2	DO3	DO média	curva	ug/ul
1	260	0,2968	0,3439	0,3071	0,3159	18,841	3,8
2	210	0,1882	0,1953	0,1788	0,1874	7,467	1,5
3	225	0,1758	0,1648	0,1755	0,1720	6,104	1,2
4	250	0,3088	0,3514	0,3195	0,3266	19,782	4,0
5	300	0,329	0,3097	0,2972	0,3120	18,490	3,7
6	290	0,2661	0,3326	0,3158	0,3048	17,858	3,6
7	283	0,2541	0,2531	0,2588	0,2553	13,477	2,7
8	280	0,2315	0,3231	0,3068	0,2871	16,292	3,3
9	235	0,2447	0,3174	0,2388	0,2670	14,507	2,9
10	203	0,2745	0,3567	0,3117	0,3143	18,696	3,7
11	244	0,19	0,2172	0,2065	0,2046	8,984	1,8
12	263	0,2372	0,315	0,3032	0,2851	16,115	3,2
13	215	0,2207	0,2655	0,2602	0,2488	12,899	2,6
14	253	0,2585	0,2697	0,2698	0,2660	14,421	2,9

15	229	0,2756	0,2841	0,3447	0,3015	17,560	3,5
16	218	0,3224	0,3685	0,3037	0,3315	20,222	4,0
SN	424	0,2834	0,328	0,2681	0,2932	16,826	3,4
18	274	0,3051	0,336	0,2859	0,3090	18,227	3,6
19	238	0,2592	0,2894	0,3511	0,2999	17,422	3,5
20	268	0,2942	0,3701	0,3122	0,3255	19,688	3,9
21	434	0,256	0,3322	0,262	0,2834	15,961	3,2
22	485	0,2738	0,3372	0,3244	0,3118	18,475	3,7
23	445	0,2786	0,2762	0,3396	0,2981	17,265	3,5
24	405	0,261	0,2823	0,2693	0,2709	14,852	3,0
25	491	0,1837	0,2826	0,2424	0,2362	11,786	2,4
26	472	0,2014	0,2699	0,2611	0,2441	12,486	2,5
27	293	0,2052	0,2236	0,2091	0,2126	9,698	1,9
28	455	0,2398	0,2967	0,3069	0,2811	15,761	3,2
29	411	0,2896	0,3189	0,3228	0,3104	18,354	3,7
30	463	0,2559	0,3107	0,2968	0,2878	16,351	3,3

Fonte: o autor

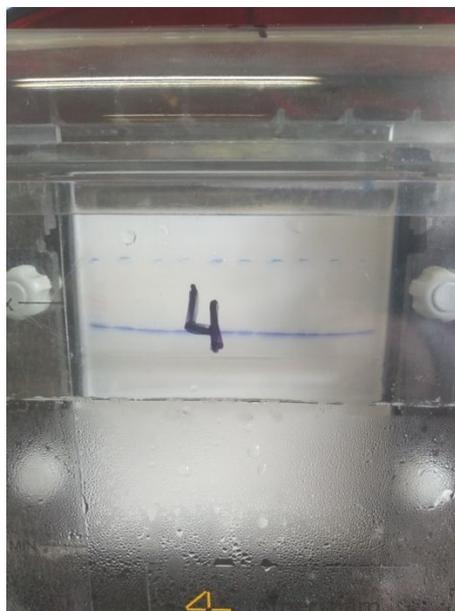
Após quantificadas as proteínas, alíquotas das amostras foram submetidas à eletroforese (Figura 6), onde foi possível identificar a progressão do processo através da formação das bandas no gel (Figura 7).

Figura 6 - Cubas de eletroforese e mini geis, início da corrida, onde é possível identificar os poços com as alíquotas de proteínas das amostras para corrida.



Fonte: o autor.

Figura 7 - Cuba de eletroforese em fase intermediária de corrida, onde é possível acompanhar através da marcação a progressão das proteínas.



Fonte: o autor.

Após realizada a corrida das proteínas no mini gel o mesmo foi submetido ao processo de eletrotransferência, em sistema *semi dry* (Figura 8) em que as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose.

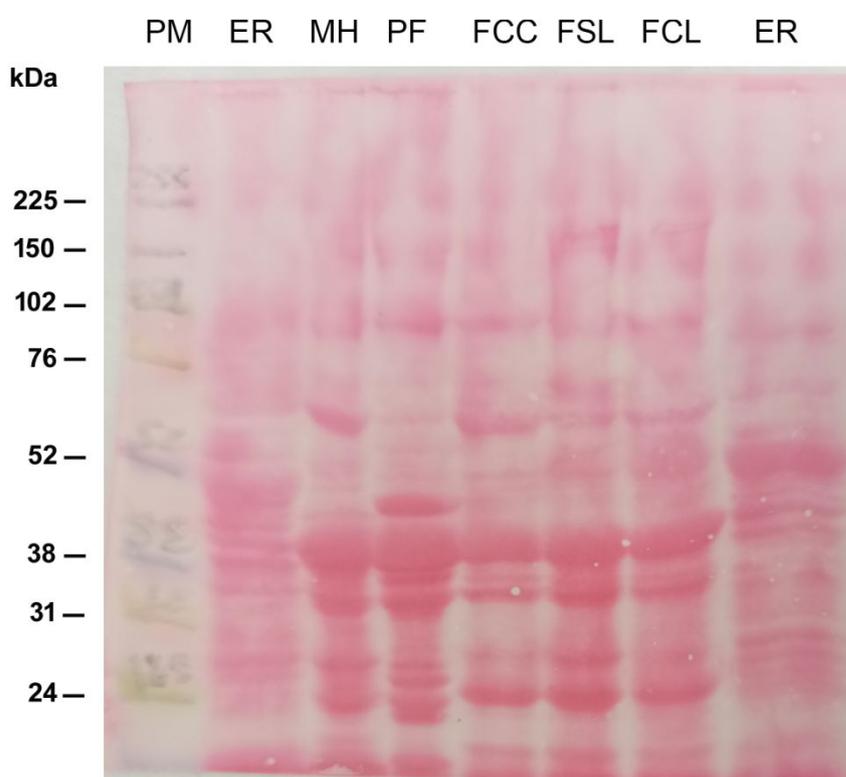
Figura 8 - Sistema *semi dry*, onde ocorreu a etapa de eletrotransferência.



Fonte: o autor.

Para a confirmação da transferência das proteínas para a membrana foi utilizada a coloração de Ponceau. É uma etapa que mostra a eficiência do processo de transferência das proteínas (Figura 9).

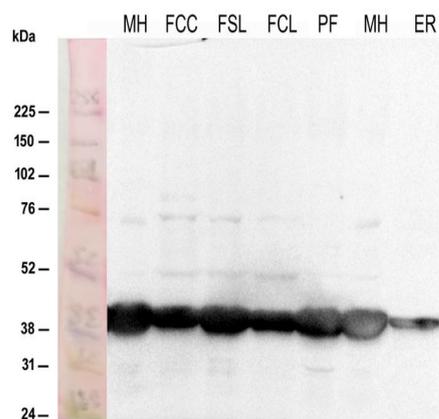
Figura 9 - Imagem de uma membrana após coloração com Ponceau, onde pode-se confirmar a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose. Os valores 225,150,102,76,52,38,31,24 são as faixas de pesos do padrão de peso molecular. kDa: Quilodaltons, unidade de medida dos pesos moleculares, PM: padrão de peso molecular, usado para comparativo na formação das bandas de proteínas. ER: Pool de encéfalo de rato, MH: músculo humano, PF: peito de frango, FCC: grupo controle, FSL: grupo micro (com lesão apenas microscópica), FCL: grupo macro (com lesão macroscópica e microscópica).



Fonte: o autor, 2023.

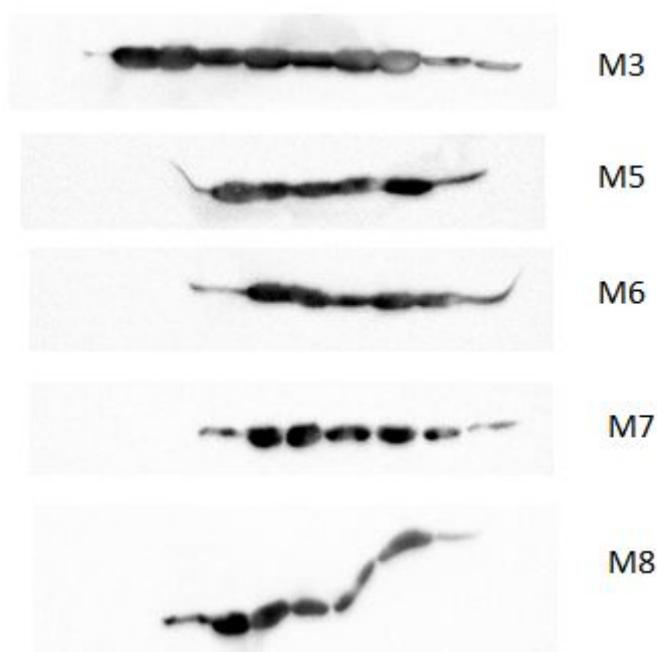
Como controle de carga foi utilizada a proteína Beta actina, que está bem marcada nas amostras, sem apresentar marcações inespecíficas, mostrando que as amostras estavam viáveis para a execução da técnica (Figura 10).

Figura 10 - Imagem da formação das bandas de Beta actina. Os valores 225,150,102,76,52,38,31,24 são as faixas de pesos do padrão de peso molecular, kDa: Quilodaltons, unidade de medida dos pesos moleculares, MH: músculo humano, FCC: grupo controle, FSL: grupo micro (com lesão apenas microscópica), FCL: grupo macro (com lesão macroscópica e microscópica), PF: peito de frango, ER: Pool de encéfalo de rato.



Fonte: o autor, 2023.

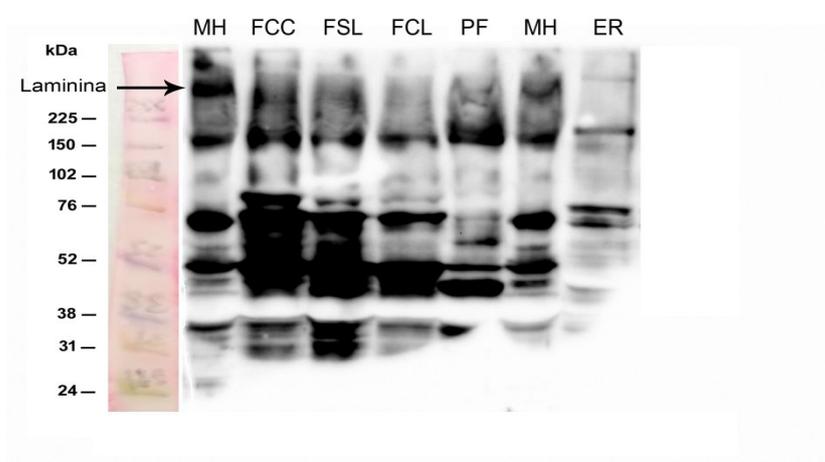
Figura 11 - Imagem da formação das bandas de Beta actina nas demais membranas. M3, M5, M6, M7, M8: identificação das membranas.



Fonte: o autor, 2023.

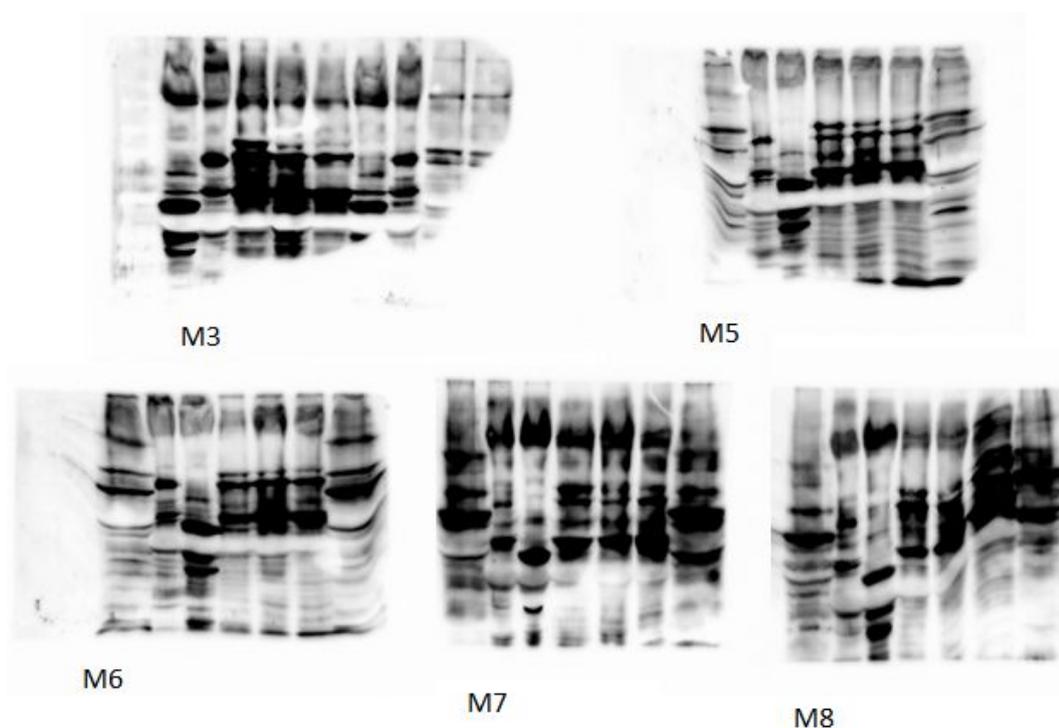
Após a imunodeteccção, revelação e fotodocumentação das membras em cinco repetições, as amostras de todos os grupos apresentaram um padrão de marcação para proteína Laminina alfa 2 muito fraco, o que impossibilitou a quantificação das bandas (Figura 12).

Figura 12 - Imagem da formação das bandas de Lamina alfa 2. Laminina: Faixa de peso molecular a qual há marcação da proteína Laminina alfa 2 (seta). Valores 225,150,102,76,52,38,31,24: Faixas de pesos moleculares, kDa: Quilodaltons, unidade de medida dos pesos moleculares MH: músculo humano, FCC: grupo controle, FSL: grupo micro (com lesão apenas microscópica), FCL: grupo macro (com lesão macroscópica e microscópica), PF: peito de frango, ER: Pool de encéfalo de rato.



Fonte: o autor, 2023.

Figura 13 - Imagem das demais membranas completas, seguindo a indicação de faixa de peso molecular da figura anterior é possível observar as ausências de formação das bandas de Lamina alfa 2 nas demais membranas. M3, M5, M6, M7, M8: identificação das membranas.



Fonte: o autor, 2023.

3.4 RESULTADOS IHQ

Realizou-se a imunohistoquímica das amostras utilizando anticorpo anti Laminina alfa 2 para biomarcação, com posterior quantificação da marcação via software Image J. Para tanto foram comparados os três grupos, controle lesão macro e lesão micro. Após a realização da imunohistoquímica as lâminas foram submetidas à observação ao microscópio e conferência individual de marcações positivas nos cortes de tecido. As marcações foram observadas nos locais esperados (membrana basal das fibras musculares) com a coloração marrom-dourada, devido a polimerização de uma enzima ligada ao anticorpo secundário, a peroxidase de rábano (HRP), que serve de substrato para a ligação da solução reveladora, ou cromógeno, a base de DAB.

Os dados numéricos referentes a área absoluta e relativa gerados a partir do software Image J foram submetidos a análises estatísticas e foi possível observar a

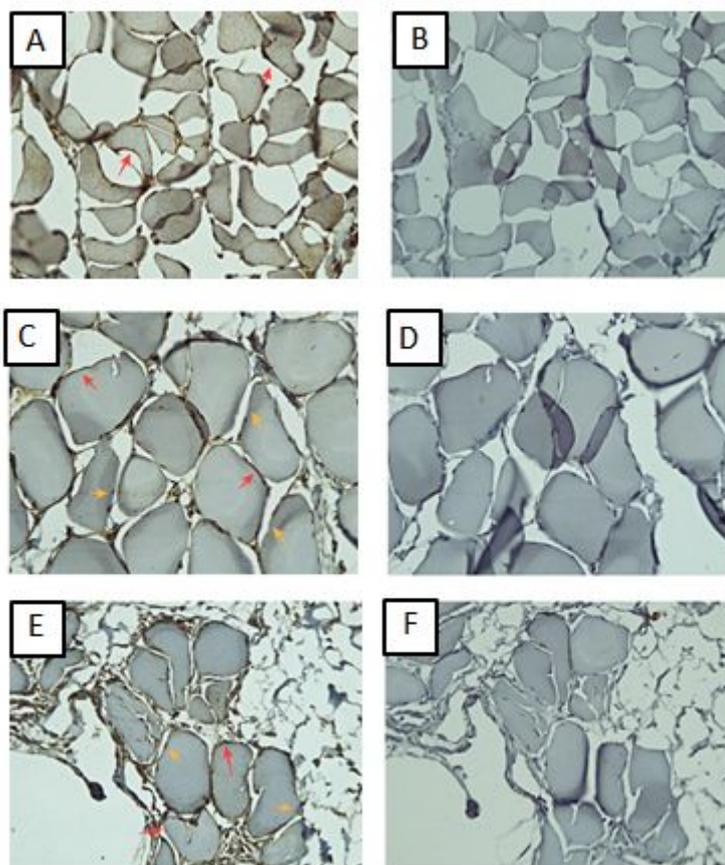
relação entre a área de marcação positiva e a natureza da lesão presente nas amostras. Com base na análise quantitativa, não há diferença estatística entre os três grupos do presente estudo (Tabela 2). O grupo controle, sem lesão, apresentou uma tendência de maior porcentagem de marcação que os grupos lesão micro e macro, porém, os grupos foram estatisticamente semelhantes pelo Teste de Tukey. A análise qualitativa das fotomicrografias de imunohistoquímica apresentam maior correlação com os dados obtidos na etapa anterior de PCR, quando ficou evidente a manutenção da continuidade da membrana basal do grupo controle quando comparado a descontinuidade presente no grupo lesão micro e macro (Figura 14).

Tabela 2 - Quantificação da porcentagem de marcação positiva para Laminina alfa 2 nos três diferentes grupos, controle, micro e macro. O valor representa a Média e o desvio padrão a 5% de significância.

Parâmetro	Controle	Micro	Macro	p-valor
% de Marcação para Laminina alfa 2	5,058± 1,561	4,66± 1,284	3,570± 2,162	0,2207
CV= 38.59%				

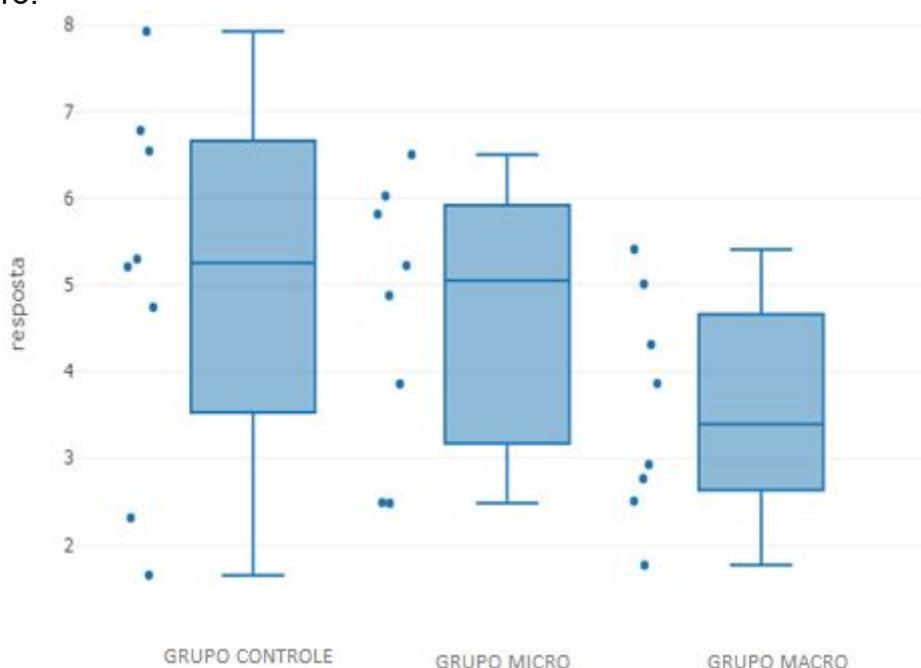
Fonte: LOPES, 2022.

Figura 14 - Cortes histológicos transversais de músculos ALD de frangos de corte submetidos à imuno-histoquímica para Laminina alfa 2, contra coloração com hematoxilina, ampliação total 400X. (A) Amostra sem lesão (grupo controle). (C) Amostra com lesão apenas microscópica (grupo micro). (E) Amostra com lesão macroscópica e microscópica (grupo macro). (A) Marcações positivas nas regiões de membrana basal muscular (setas vermelhas). Observa-se integridade de membranas basais. (C, E) Marcações positivas para Laminina alfa 2 nas regiões de membrana basal muscular (setas vermelhas) e regiões de descontinuidade ou ausência de marcação (setas amarelas), indicando deficiência parcial de Laminina alfa 2. (B, D, F) Controle negativo da reação, em um segundo corte da mesma região das amostras A, C, E, incubados com PBS. Nestes cortes não houveram marcações.



Fonte: LOPES, 2022.

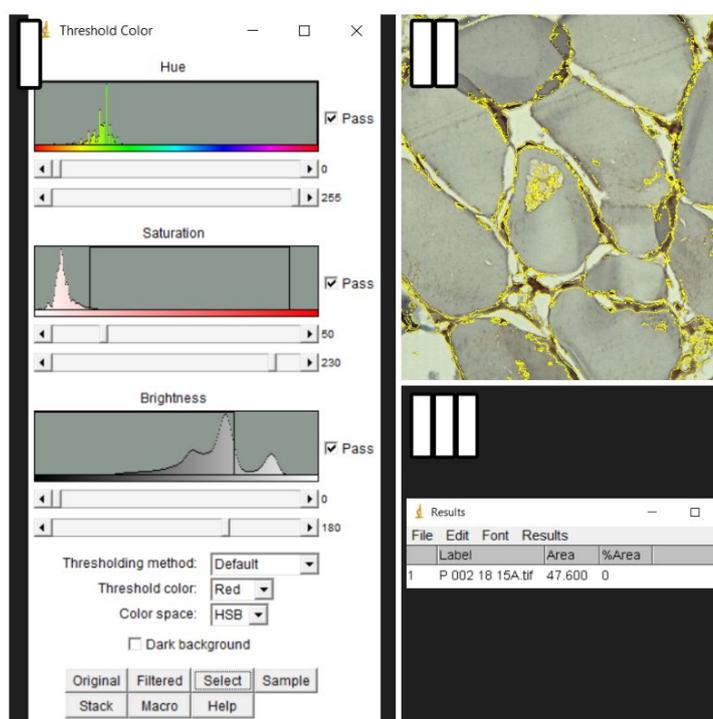
Figura 15 - Médias de marcação positiva para Laminina alfa 2, evidenciando os limites máximos, mínimos, quartis e média, nos três diferentes grupos, controle, micro e macro.



Fonte: LOPES, 2022.

Não foi observada diferença estatística pelo Teste de Tukey nas médias de marcações positivas para Laminina alfa 2 entre os três grupos. Notou-se uma tendência de maior marcação, 5,05%, nos tecidos do grupo controle, seguido pelo grupo micro, 4,66% (com lesão apenas histológica) e de menor média de marcação, 3,57% nas amostras do grupo macro (com lesão severa tanto macroscópica, quanto histológica). Os dados obtidos seguiram distribuição normal ($p= 0,584$) pelo teste de Shapiro-Wilk a 5%, bem como cursaram com variação homogênea ($p=0,395$) pelo teste de Bartlett. Nessas imagens, a porcentagem de marcação referiu-se a um espectro de cores, convertidas em pixels que foram posteriormente quantificadas pelo software Image J (Figura16). A área total das fotomicrografias foi de 546.750, portanto, as porcentagens obtidas são todas em relação a este total.

Figura 16 - Obtenção de imagem no Image J. Foi estabelecido uma escala numérica do *Threshold color* 0/255 para Hue, 50/230 para *Saturation* e 0/180 para *Brightness* (I) para extrair apenas as marcações positivas em membrana basal. As marcações contabilizadas foram evidenciadas em amarelo (II). As marcações em tecido conjuntivo adjacente à fibra muscular foram manualmente excluídas de cada uma das imagens. Ao obter as medidas, contabilizou-se a porcentagem absoluta de marcação da fotomicrografia (III), que posteriormente foi transformada em porcentagem relativa. Esse percentual é relativo à área total de 546.750 pixels da imagem.



Fonte: LOPES, 2022.

4 DISCUSSÃO

As análises morfológicas tiveram o propósito de certificar que as amostras avaliadas realmente pertenciam aos grupos propostos no delineamento experimental. O resultado das análises morfológicas foi condizente com o esperado para cada um dos grupos estudados. Assim, pode-se ter segurança de que se tratava de um grupo sem lesão (controle), um grupo com lesão leve e ou mais inicial (micro) e outro grupo com lesão acentuada (macro). Para isso foi necessário trabalhar com duas linhagens, uma de crescimento lento e outra de crescimento

rápido, pois na linhagem de crescimento rápido não foi possível encontrar carcaças com músculos totalmente sem lesão em um estudo piloto (dados não publicados). No grupo controle, o pequeno percentual de alterações encontradas e apresentadas nos resultados, se deve, provavelmente, a artefatos de fixação que ocorrem nos músculos devido a hipercontração *post mortem*. Os grupos micro e macro, oriundos da linhagem de crescimento rápido, demonstraram lesões conforme já descrito anteriormente por Zimermann et al. (2012) e Caron (2017), mas como esperado, a quantidade das lesões foi significativamente maior e de caráter mais crônico no grupo macro.

Segundo Zimermann et al. (2012), uma característica da carcaça acometida pela miopatia dorsal cranial é o espessamento do musculo ALD, que nas amostras analisadas apresentaram em média o dobro do tamanho de um músculo normal. As lesões histológicas, segundo Zimermann (2008), apresentam todas as características de uma lesão crônica e de acordo com Valentine e McGavin (2007), um músculo que é afetado cronicamente ou desnervado desenvolve fibrose profunda e infiltração gordurosa, características essas que mesmo o músculo estando atrofiado, macroscopicamente o faz aumentar de tamanho, sendo denominada de pseudohipertrofia, características histológicas que foram observadas nas amostras analisadas no grupo macro.

Após certificação dos grupos experimentais, buscou-se dar início à verificação da expressão gênica de alguns genes relacionados a proteção estrutural do músculo frente ao evento da contração. Dentre os genes estudados, a laminina alfa dois foi a que apresentou resultado mais condizente com a hipótese deste trabalho, expressão diminuída ($P < 0,05$) no grupo macro em relação aos grupos micro e controle que não apresentaram diferença estatística entre eles. Essa falta de diferença entre os grupos micro e controle elimina o possível viés da linhagem para esta proteína. Desta forma, a laminina alfa dois foi considerada a principal candidata ao envolvimento etiológico da MDC, seguido do sarcoglicado beta e sarcospan, dentre as proteínas estudadas neste trabalho. A sub-expressão da laminina alfa dois apenas no grupo macro, permite eliminar o viés da linhagem e pode ser pensada como sendo a causa da lesão, porém, também pode ser uma consequência da mesma. A sub-expressão do sarcoglicano beta, que teve neutralizado o viés da linhagem e também mostrou diferença entre os grupos macro e controle é um

candidato em potencial para agente etiológico da MDC. A subexpressão do sarcospan, entretanto, pode ter sofrido a influência da linhagem dos frangos.

Deficiências sejam elas congênitas ou adquiridas, de Laminina alfa dois podem cursar com uma pronunciada fraqueza e hipotonia muscular, comprovadas em modelos laboratoriais de camundongos. A deficiência total ou parcial de Laminina alfa dois, tanto em humanos como em camundongos, leva a distrofias musculares do tipo 1A, caracterizadas pelas apresentações clínicas de hipotonia e fraqueza muscular (GUO et al., 2003). Nestes casos, como verificado no presente trabalho, as membranas basais musculares mostram-se interrompidas, reduzindo significativamente a expressão de seus receptores em superfície de membrana basal, levando a uma alteração na sinalização bioquímica normal do tecido (SCHÉELE; NYSTRÖM; DURBEEJ; TALTS; EKBLÖM; EKBLÖM, 2007). A Laminina alfa dois também tem uma participação importante na manutenção das junções neuromusculares, principalmente na proliferação de Células de Schwann e na modulação da mielinização dos neurônios motores, que confere funcionalidade ao músculo pela transmissão do potencial de ação nervoso e disparo da cascata intracelular para a contração muscular. Logo a deficiência dessa proteína na membrana basal resulta em uma mielinização parcial dos axônios, levando às alterações morfofuncionais e bioquímicas neuromusculares (YANG et al., 2005). Estas alterações, além de funcionais, também podem ser observadas na carcaça quando a mesma é direcionada a produção de carne, onde ocorre o comprometimento de propriedades químicas e físicas do produto obtido e estando diretamente ligada a aceitação do mercado, sobretudo de carne de aves (KUTTAPPAN; HARGIS; OWENS, 2016).

Outra proteína que merece destaque no presente trabalho é a Distrofina. Entretanto, esta apresentou resultado de expressão num perfil oposto à laminina alfa dois, estando aumentada ($P < 0,05$) no grupo macro, diferindo também dentro da linhagem de crescimento rápido e entre grupo macro e grupo controle. Os grupos controle e micro foram estatisticamente semelhantes, o que também neutraliza o possível viés da linhagem. Esse resultado foi oposto à hipótese proposta no presente trabalho e leva a necessidade de mais estudos para melhor compreensão dos mecanismos celulares envolvendo a distrofina. Especula-se que o aumento da distrofina também seja uma consequência da MDC podendo ter ocorrido em função de um mecanismo pós lesional compensatório. Observa-se neste ponto a

necessidade de maior compreensão a cerca dos mecanismos celulares que levam a super expressão de distrofina nos frangos com MDC e se estes poderiam ser replicados em humanos para um possível tratamento de distrofia muscular de Duchenne. Lembrando que a MDC tem uma ocorrência natural no frango e que muitos estudos ainda são necessários para compreensão da sua patogenia.

Outros genes que apresentaram comportamento diferente ($P < 0,05$), porém entre a linhagem de crescimento lento e a linhagem de crescimento rápido, foram a desmina e a utrofina, com super-expressão nos grupos da linhagem de crescimento rápido (macro e micro). O Gene Cristalina apresentou expressão semelhante entre os grupos macro e controle, ambos com expressão diminuída ($P < 0,05$), quando comparados com o grupo micro. Tal resultado foi inesperado e em uma primeira análise, não o coloca entre os genes candidatos, pelo menos não em relação a etiologia da MDC. Entretanto, com este resultado infere-se que em lesões crônicas, esta proteína volte a ter uma expressão semelhante a um grupo sem lesão e em lesões mais iniciais a proteína também esteja aumentada para compensar o efeito lesional da falta das outras proteínas.

As análises de WB e IHC tiveram como propósito reforçar os resultados encontrados no PCR. Estas foram padronizadas e realizadas apenas para a proteína laminina alfa dois. Quanto às outras proteínas, pretende-se aplicar o uso dessas técnicas em trabalhos futuros, iniciando com o sarcoglicano beta e sarcospan. Tanto no WB quanto na IHC, os resultados qualitativos obtidos reforçaram os resultados do PCR, com padrões de bandas fracas no WB e falhas na membrana basal quando as amostras foram observadas após a IHC (grupos micro e macro). No WB, as marcações foram fracas para os três grupos experimentais e não foi possível verificar diferenças entre os três grupos, porém, todos apresentaram marcação mais fraca em relação a amostra de músculo humano e encéfalo de rato sem lesões. Quando comparada a imagem do *datasheet* e as imagens das membranas do presente trabalho, conforme esperado, é possível identificar que a banda de músculo humano e encéfalo de rato são expressas na faixa esperada de 344 kDa, o que mostra a efetividade do anticorpo, no entanto, nas amostras de frango as marcações foram muito fracas e não foi possível a sua quantificação. As amostras de músculo humano e de encéfalo de rato não tinham alterações sugestivas de deficiência de Laminina alfa dois e foram usadas apenas como controle da reação.

O anticorpo utilizado nesta pesquisa, foi o único anticorpo comercial encontrado para frangos, entretanto, segundo o *datasheet*, era predito para funcionar nesta espécie e comprovadamente reativo apenas para tecidos humanos. O desenvolvimento de anticorpo anti-laminina alfa dois reativo e específico para frangos é uma demanda verificada no presente trabalho. A etapa de padronização da técnica para tecidos musculares de frango foi bastante prolongada e exaustiva, porém, após serem esgotadas todas as possibilidades de testes possíveis no período estudado, concluiu-se que, para pesquisas futuras, necessita-se de um novo anticorpo anti-laminina alfa dois comprovadamente reativo para frango.

Análise qualitativa das fotomicrografias de IHC demonstraram descontinuidade de membrana basal, sobretudo naquelas amostras com alteração severa do grupo macro. Não foi observada diferença estatística pelo Teste de Tukey nas médias de marcação positivas dos 3 grupos. Contudo, notou-se uma tendência de maior marcação nos tecidos hígidos do controle, seguido pelo grupo com lesão moderada do grupo micro e por último, as amostras com lesão severa do grupo macro, com a menor média de marcação.

5 CONCLUSÃO

Dentre os genes estudados no presente trabalho, conclui-se que Laminina alfa 2, sarcoglicano beta e sarcospan foram os genes que apresentaram alterações indicativas de deficiência de expressão, condizentes com a hipótese do trabalho e desta forma, podem estar envolvidos na etiologia da miopatia dorsal cranial. Sugere-se, para trabalhos futuros, análises de WB e IHC para sarcoglicano beta e sarcospan. Outros ensaios histoquímicos, enzimáticos e bioquímicos que proporcionem uma maior compreensão dos mecanismos celulares envolvidos na MDC também são necessários.

REFERÊNCIAS

ABPA. Relatórios Anuais. Disponível em:

<https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2023/04/Relatorio-Anual-2023.pdf>

BUSHBY KMD, ANDERSON LV, POLLIT C, NAOM I, MUNTONI F, BINDOFF L. Abnormal merosin in adults. A new form of late onset muscular dystrophy not linked to chromosome 6q2. *Brain* 1998; 121:581-588.

CARON, L.; MORÉZ, M.; COLDEBELLA, A. et al. Aspectos patológicos de miopatias em frangos de corte. Embrapa Suínos e Aves – Concórdia, Santa Catarina. 2017.

CHOMCZYNSKI E SACCHI. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate- Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry*, v.162, p.156- 159, 1987.

COLLINS, C.A., MORGAN, J.E. Duchenne s muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. *International Journal of Experimental Pathology*, v.84, p.165 172, 2003.

CROSBIE, R.H., HEINGHWAY, J., VENZKE, D.P., LEE, J.C. and CAMPBELL, K.P. (1997) Sarcospan: the 25kDa transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex. *J. Biol. Chem.*, 272, 31221–31224.

CROSBIE, R.H., LIM, L.E., MOORE, S.A., HIRANO, M., HAYS, A.P., MAYBAUM, S.W., COLLIN, H., DOVICO, S.A., STOLLEE, C.A., FARDEAU, M. et al. (2000) Molecular and genetic characterization of sarcospan: insights into sarcoglycan-sarcospan interactions. *Hum. Mol. Genet.*, 9, 2019–2027.

DUCHENNE, G. B. Recherches sur la paralysie musculaire pseudo-hypertrophique ou paralysie myosclerosique. *Arch. Gen. Med.* 11, 5, 178, 305, 421, 552. 1868.

FAIRCLOUGH RJ, BAREJA A, DAVIES KE. Progress in therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Exp Physiol.* 2011 Nov;96(11):1101–13.

FREUND, A.A., SCOLA, R.H., ARNDT, R.C., LORENZONI, P.J., KAY, C.K., WERNECK, L.C. Duchenne and becker muscular dystrophy - A molecular and immunohistochemical approach. *Arq Neuropsiquiatr.* v.65, n.1, p.73-76, 2007.

GUO, L.T.; ZHANG, XU.; KUANG, W.; XU, H.; LIU, L.A.; VILQUIN, J.-T.; MIYAGOSUZUKI, Y.; TAKEDA, S.; RUEGG, M.A.; WEWER, U.M. Laminin α 2 deficiency and muscular dystrophy; genotype-phenotype correlation in mutant mice. *Neuromuscular Disorders*, [S.L.], v. 13, n. 3, p. 207-215, mar. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0960-8966\(02\)00266-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0960-8966(02)00266-3).

HAMERSKI, A. C. M. Caracterização do músculo e avaliação de marcadores enzimáticos de frangos de corte acometidos com Miopatia Dorsal Cranial (MDC). 51

f, 2014. Dissertação (graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2014.

HOFMANN, E.P., BROWN, R.H., KUNKEL, L.M. Dystrophin: The Protein Product of the Duchenne Muscular Dystrophy Locus. *Cell*. v.51, p.919-928, 1987.

HOFFMANN, E.P., HUDECKI, M.S., ROSENBERG, P.A., POLLINA, C.M., KUNKEL, L.M., Cell and Fiber-Type Distribution of Dystrophin. *Neuron*, v.1, n.41, p.1-420, 1988.

HU, X.Y., BURGHESE, A.H., RAY, P.N., THOMPSON, M.W., MURPHY, E.G., WORTON, R.G. Partial gene duplication in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *J. Med. Genet.* v.25, p.369-376, 1988.

IBGE. Abate de animais, produção de leite, couro e ovos. 2022.
<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/36455-em-2022-abate-de-bovinos-volta-a-subir-e-producao-de-ovos-de-galinha-bate-recorde>

KIERSZENBAUM, A.L. (2008). Tecido muscular. In: KIERSZENBAUM, A.L. *Histologia e biologia celular uma introdução a patologia*. 2ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 199-222.

KUTTAPPAN, V.A.; HARGIS, B.M.; OWENS, C.M. White striping and woody breast myopathies in the modern poultry industry: a review. *Poultry Science*, [S.L.], v. 95, n. 11, p. 2724-2733, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pew216>.

KUTTAPPAN, V. A., SHIVAPRASAD, H. L., SHAW, D. P., VALENTINE, B. A., HARGIS, B. M., CLARK, F. D., MCKEE, S. R., OWENS, C. M. Pathological changes associated with white striping in broiler breast muscles. *Poultry Science*, v. 92, n. 2, p. 331–338, 2013.

KUTTAPPAN, V. A., HUFF, G. R., HUFF, W. E., HARGIS, B. M., APPLE J. K., COON, C., OWENS, C. M. Comparison of hematologic and serologic profiles of broiler birds with normal and severe degrees of white striping in breast fillets. *Poultry Science*, v. 92, n. 2, p. 339–345, 2013.

KUTTAPPAN, V. A., BREWER, V. B., MAUROMOUSTAKOS, A., MCKEE, S. R., EMMERT, J. L., MEULLENET, J. F., OWENS C. M. Estimation of factors associated with the occurrence of white striping in broiler breast fillets. *Poultry Science*, v. 92, n. 3, p. 811–819, 2013.

LAKE, J. A.; DEKKERS, J. C. M.; ABASHT, B. Genetic basis and identification of candidate genes for wooden breast and white striping in commercial broiler chickens. *Scientific Reports*, (2021) 11:6785. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86176-4>

LAKE, J. A.; PAPAHA, M. B.; ABASHT, B. Increased expression of lipid metabolism genes in early stages of wooden breast links myopathy of broilers to metabolic syndrome in humans. *Genes* 2019, 10, 746; doi:10.3390/genes10100746.

LEMAIRE, C., HEILIG, R., MANDEL J.L. The chicken dystrophin cDNA: striking conservation of the C-terminal coding and 3' untranslated regions between man and chicken. *The EMBO Journal*, v.7, n.13, p.4157-4162, 1988.

LOPES, F. B. RELATÓRIO FINAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA: AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES CANDIDATOS AO ENVOLVIMENTO ETIOLÓGICO DA MIOPATIA DORSAL CRANIAL: padronização da técnica de imuno-histoquímica para marcação de laminina alfa 2 em músculos de frangos de corte. 2022. 31 f. Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Catarina, Curitibanos, 2022.

MAKSIMOVIC N., ANDJELKOVIC, A., RASIC, V.M., STOJANOVIC, V.R., KOTLICA, B.K., BRANKOVIC, S., DAMNJANOVIC, T., JEKIC, B., BUNJEVACKI, V., LUKOVIC, L., PEROVIC, D., CVJETICANIN, S., I. NOVAKOVIC. Quantitative analysis of the dystrophin gene by real-time PCR. *Arch. Biol. Sci.* v.64, n.2, p.787-792, 2012.

MALAYERI F.A., PANJEHPOUR, M., MOVAHEDIAN, A., GHAFFARPOUR, M., ZAMANI, G.R., TABRIZI, M.H., ZAMANI, M. Detection of Duchenne/Becker Muscular Dystrophy Carriers in a Group of Iranian Families by Linkage Analysis. *Acta Medica Iranica.* v.49, n.3, 2011.

MARKERT CD, ATALA A, CANN JK, CHRIST G, FURTH M, AMBROSIO F, et al. Mesenchymal stem cells: emerging therapy for Duchenne muscular dystrophy. *PM R.* 2009 Jun;1(6):547–59.

MERYON, E. On granular and fatty degeneration of the voluntary muscles. *Medico-Chirurgical Trans.* 35, 73. 1852.

MIRANDA, A.F., BONILLA, E., MARTUCCI, G., MORAES, C.T., HAYS, A.P., DIMAURO, S. Immunocytochemical Study of Dystrophin in Muscle Cultures from Patients with Duchenne Muscular Dystrophy and Unaffected Control Patients. *American Journal of Pathology*, v.132, n.3, 1988.

MUDALAL, S. et al. Implications of white striping and wooden breast abnormalities on quality traits of raw and marinated chicken meat. *Animal*, v.9, n4, p.728-734, 2015.

NALINI, A., GAYATHRI, N., THAHA, F., DAS, S. and SHYLASHREE, S. (2010) Sarcoglycanopathy: clinical and histochemical characteristics in 66 patients. *Neurol. India*, 58, 691–696.

NAOM I, D'Alessandro M, SEWRY CA. Laminin-a2 chain gene mutations in two siblings presenting with limb-girdle muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 1998; 8:495-501.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, v.29:e45, 2001.

PINI A, MERLINI L, TOMÉ FMS, CHEVALLAY M, GOBBI G. Merosin-negative congenital muscular dystrophy, occipital epilepsy with periodic spasms and focal

cortical dysplasia - report of three Italian cases in tow families. *Brain Dev* 1996; 18:316-322.

RAFAEL J., GOROSOPE M., NISHIKAWA B.K., HOFFMAN E.P. Pathophysiology of dystrophin deficiency: a clinical and biological enigma. In: *Dystrophin: Gene, Protein and Cell Biology*. Eds S.C. BROWN & J.A. LUCY. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 201-232. 1997.

RODINO - KLAPAC LR, MENDELL JR, SAHENK Z. Update on the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Current neurology and neuroscience reports*. 2013. p. 332.

SANES, J R. The Basement Membrane/Basal Lamina of Skeletal Muscle. *Journal Of Biological Chemistry*, [S.L.], v. 278, n. 15, p. 12601-12604, abr. 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.r200027200>.

SCHÉELE, Susanne; NYSTRÖM, Alexander; DURBEEJ, Madeleine; TALTS, Jan F.; EKBLÖM, Marja; EKBLÖM, Peter. Laminin isoforms in development and disease. *Journal Of Molecular Medicine*, [S.L.], v. 85, n. 8, p. 825-836, 11 abr. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00109-007-0182-5>.

SILLER, W.G.; MARTINDALE, L.; WIGHT, P.A.L. Exercise-induced deep pectoral myopathy in broiler fowls and turkeys. *Veterinary Science Communications*, v. 2, p. 331-336, 1978/1979.

SIHVO, H. K., IMMONEN, K., PUOLANNE, E. Myodegeneration with fibrosis and regeneration in the pectoralis major muscle of broilers. *Veterinary Pathology*, v. 51, n. 3, p. 619-623, 2014.

SIHVO, H. K., LINDÉN, J., AIRAS, N., IMMONEN, K., VALAJA, J., PUOLANNE, E. Wooden breast myodegeneration of pectoralis major muscle over the growth period in broilers. *Veterinary Pathology*, v. 54, n. 1, p. 119-128, 2017.

SKUK, D., ROY, B., GOULET, M., CHAPDELAINE, P., BOUCHARD, J.P., ROY, R., DUGRE, F.J., LACHANCE, J.G., DESCHENES, L., SENAY, H., SYLVAIN, M., TREMBLAY, J.P. Dystrophin Expression in Myofibers of Duchenne Muscular Dystrophy Patients Following Intramuscular Injections of Normal Myogenic Cells. *Molecular therapy*. v.9, n.3, 2004.

SUNDARAM, C.; UPPIN, M. S. Approach to the interpretation of muscle biopsy. In: SUNDARAM, C. (Ed). *Muscle biopsy*. Rijeka: In: Tech, 2012. cap. 2, p.15-32. 2012
Tan E, Topaloglu H, Sewry C, Zorlu Y, Naom I, Erdem S, D'Alessandro M, Muntoni F, Dubowitz V. Late onset muscular dystrophy with cerebral white matter changes due to partial merosin deficiency. *Neuromuscul Disord* 1997; 7:85-89.

TORTELI, Maria Cecília Munaretto. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA COMPARATIVA DO MÚSCULO ANTERIOR LATISSIMUS DORSI ENTRE FRANGOS DE CORTE DE LINHAGEM COMERCIAL E AVES CAIPIRA. 2021. 39 f. TCC (Graduação) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Catarina, Curitiba, 2021.

TRAVESSO M., MALNATI, M., MINETTI, C., REGIS, S. TEDESCHI, S., PEDEMONTE, M., BRUNO, C., BIASSONI, R., ZARA, F. Multiplex real-time PCR for detection of deletions and duplications in dystrophin gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v.339, p.145-150, 2006.

VALENTINE, B.A. & McGAVIN, M.D. Skeletal Muscle. In: McGAVIN, M.D. & ZACHARY, J.F. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 4th ed. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2007, p. 996-1039.

VIANELLO S, YU H, VOISIN V, HADDAD H, He X, FOUTZ AS, et al. Arginine butyrate: a therapeutic candidate for Duchenne muscular dystrophy. *FASEB J*. 2013 Jun;27(6):2256–69.

WERNECK LC, BONILLA E. Immunohistochemical alterations of dystrophin in congenital muscular dystrophy. *Arq Neuropsiq* 1995; 53:416-423.

WERNECK LC, SCOLA RH, IWAMOTO FM. Congenital muscular dystrophy and merosin deficiency. *Arq Neuropsiq* 1997; 55:780-787.

WEWER UM, ENGVALL E. Merosin/lamini-2 and muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 1996; 6:409-418.

YANG, Dongren; BIERMAN, Jesse; TARUMI, Yukie S.; ZHONG, Yong-Ping; RANGWALA, Reshma; PROCTOR, Thomas M.; MIYAGOE-SUZUKI, Yuko; TAKEDA, Shin'Ichi; MINER, Jeffrey H.; SHERMAN, Larry S.. Coordinate control of axon defasciculation and myelination by laminin-2 and -8. *Journal Of Cell Biology*, [S.L.], v. 168, n. 4, p. 655-666, 7 fev. 2005. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200411158>.

YOSHIDA, M., HAMA, H., ISHIKAWA-SAKURAI Sakurai, M., IMAMURA, M., MIZUNO, Y., ARAISHI, K., WAKABAYASHI-TAKAI, E., NOGUCHI, S., SASAOKA, T. and OZAWA, E. (2000) Biochemical evidence for association of dystrobrevin with the sarcoglycan-sarcospan complex as a basis for understanding sarcoglycanopathy. *Hum. Mol. Genet.*, 9, 1033–1040.

ZHOU G, XIE H, ZHANG S, YANG Z. Current understanding of dystrophin-related muscular dystrophy and therapeutic challenges ahead. *Chin Med J (Engl)*. 2006 Aug 20;119(16):1381–91.

ZIMERMANN, F.C. Miopatia dorsal cranial em frangos de corte: caracterização anatomopatológica colheita e análise de dados. Porto Alegre: UFRGS, 2008. 83 p. Dissertação (mestrado) Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

ZIMERMANN, F.C. Pesquisa etiológica da miopatia dorsal cranial em frangos de corte. Porto Alegre: UFRGS, 2011. 74 p. Tese (doutorado) Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

ZIMERMANN, F.C., FALLAVENA, L.C.B., SALLE, C.T.P., MORAES, H.L.S., SONCINI, R. A. BARRETA, M.H., NASCIMENTO, V.P. Downgrading of Heavy Broiler Chicken Carcasses Due to Myodegeneration of the Anterior Latissimus Dorsi: Pathologic and Epidemiologic Studies. *Avian diseases*, 56:418-421, 2011.