

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DIAGNÓSTICO *IN VIVO* E CARACTERIZAÇÃO CELULAR DAS
MIOPATIAS *WOODEN BREAST* E *WHITE STRIPING* EM FRANGOS DE
CORTE**

TAMARA ZINN FERREIRA

PORTO ALEGRE

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**DIAGNÓSTICO *IN VIVO* E CARACTERIZAÇÃO CELULAR DAS
MIOPATIAS *WOODEN BREAST* E *WHITE STRIPING* EM FRANGOS DE
CORTE**

Autora: Tamara Zinn Ferreira

**Tese de doutorado apresentado ao Programa de
Pós-graduação em Ciências Veterinárias da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

**Orientador: Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do
Nascimento**

Co-orientadora: Profa. Dra. Liris Kindlein

PORTO ALEGRE

2018

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

CIP - Catalogação na Publicação

Zinn Ferreira, Tamara
DIAGNÓSTICO IN VIVO E CARACTERIZAÇÃO CELULAR DAS
MIOPATIAS WOODEN BREAST E WHITE STRIPING EM FRANGOS
DE CORTE / Tamara Zinn Ferreira. -- 2018.
152 f.
Orientador: Vladimir Pinheiro do Nascimento.

Coorientadora: Liris Kindlein.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,
BR-RS, 2018.

1. miopatias peitorais. 2. células miogênicas. 3.
histomorfometria. 4. restrição alimentar. 5.
ultrassom. I. Pinheiro do Nascimento, Vladimir,
orient. II. Kindlein, Liris, coorient. III. Título.

TAMARA ZINN FERREIRA

**DIAGNÓSTICO *IN VIVO* E CARACTERIZAÇÃO CELULAR DAS MIOPATIAS
WOODEN BREAST E *WHITE STRIPING* EM FRANGOS DE CORTE**

Aprovado em 28 de março de 2018:

APROVADO POR:

Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dra. Liris Kindlein
Co-Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes
Membro da Comissão

Prof. Dr. Raul Machado Neto
Membro da Comissão

Prof. Dr. Guiomar Pedro Bergmann
Membro da Comissão

Aos meus pais Júlio e Suzete...
DEDICO!

AGRADECIMENTOS

Agradeço e dedico esta conquista, aos meus pais Júlio e Suzete, os quais sem eles eu nada seria. Aos meus irmãos Júlio César, Carolina, Vanessa e aos meus pequenos amores Felipe e Henrique. Família: Amo vocês demais! Vocês são a base de tudo!

A Deus por sempre me iluminar.

A Prof. Liris Kindlein pela confiança, companheirismo e parceria durante esta caminhada acadêmica. Meu Muito Obrigada!

Aos professores Guiomar Bergmann, Jessica Starkey, Hamilton Moraes, Raul Machado, Sergio Vieira e ao meu orientador, Vladimir Pinheiro do Nascimento, por terem me acolhido em seus setores/laboratórios, pelas oportunidades e confiança.

Muito mais que colegas, a todos os amigos que a UFRGS, Cepetec, Aviário e a Auburn University me trouxeram.

Meu muito obrigada ao Denys Hupel, Mariana Pütten e a todos aqueles que estiveram comigo nesta jornada pela ajuda, paciência, calma, tranquilidade e confiança de que tudo dará certo principalmente, nesta reta final.

A CAPES pelas bolsas de estudos tanto no Brasil quanto para a realização do sonhado Doutorado Sanduíche.

Muito obrigada!

RESUMO

A fim de elucidar o processo muscular envolvido nas miopatias peitorais de frangos de corte e a obtenção de métodos para detecção destas miopatias no animal *in vivo*, experimentos foram realizados com frangos de corte de rápido crescimento, machos, com diferentes idades de abate. Os estudos que compuseram esta tese objetivaram determinar o processo de crescimento, degeneração e regeneração celular do músculo *Pectoralis major*, bem como determinar o efeito de programas de restrição alimentar quantitativa (70%) e qualitativa (hipoprotéica e hipoenergética) sobre a ocorrência das miopatias *wooden breast* (WB) e *white striping* (WS) e suas consequências na qualidade da carne, além de validar uma metodologia para o diagnóstico *in vivo* da miopatia WB através de imagens ultrassonográficas do peito dos frangos em diferentes idades. A partir dos resultados, pôde-se concluir que dietas restritivas não obtiveram efeitos na redução da ocorrência das miopatias, entretanto, ao se aplicar a restrição entre os 22 e 28 dias de idade foi verificada redução na severidade de WB. A utilização de imagens ultrassonográficas do músculo do peito de aves aos 21 dias de idade pode ser utilizada para predição *in vivo* de WB. O aumento da severidade de WB ocasionou alterações nos atributos de qualidade de carne dos filés como: aumento da perda por cocção, nas coordenadas cromáticas L*, a* e b* e na força de deformação. Em nível celular, o músculo *Pectoralis major* das aves severamente acometidas com WB apresentaram redução na quantidade e aumento do diâmetro das fibras musculares, proliferação de macrófagos, deposição de colágeno Tipo I no endomísio e perimísio e redução de aporte vascular pela diminuição da densidade de pequenos vasos. As atividades das enzimas séricas específicas de lesão muscular apresentaram valores crescentes de acordo com a idade e grau de severidade das miopatias, podendo serem utilizadas como marcadores bioquímicos das miopatias. Filés de peito classificados como de escores mais leves para WB apresentaram maiores valores de células miogênicas (MyoD, Myf-5 e Pax7) quando comparados com os mais severos para esta miopatia. Com base no exposto, o processo regenerativo das células do músculo *Pectoralis major* acometidos com miopatias se estabelece pela desestruturação do tecido muscular e proliferação de tecido conjuntivo, que já se estabelece aos 21 dias de idade e pode ser diagnosticado através de marcadores bioquímicos e imagens ultrassonográficas do peito dos animais *in vivo*.

Palavras chave: miopatias peitorais, células miogênicas, histomorfometria, restrição alimentar, ultrassom.

ABSTRACT

In order to elucidate the muscle development on broilers' breast myopathies and develop methods to detect those myopathies using in vivo experimentation, trials were conducted in fast-growing male broilers with different slaughtering ages. The studies presented in this thesis aimed to determine the growth, degeneration and regeneration cellular processes on pectoralis major muscle, as well as determine the effect of qualitative (hypoproteic and hypoenergetic) and quantitative (70%) feed restriction on the occurrence of wooden breast (WB) and white striping (WS) myopathies, correlating their consequences on meat quality. This thesis also shows a study conducted to validate an in vivo methodology to diagnose the WB myopathy using ultrasound images of broilers' breasts at distinct ages. From the results obtained it is possible to conclude that the feed restrictions applied did not impact on the occurrence of breast myopathies. However, broilers that had feed restriction applied between 22 and 28 d of age presented a decrease on their WB myopathy severity. At 21d of age, ultrasonography on in vivo birds' breast muscles can predict WB. The increase on WB severity lead to changes on the meat quality of breast fillets, such as: higher values for cooking loss, chromaticity coordinates (L, a*, b*) and shear force. At cellular level, pectoralis major muscle of severe WB broilers had a reduction on the quantity and increase of the diameter of muscle fibers, proliferation of macrophages, collagen Type I deposition on endomysium and perimysium, and decrease on vascular supply due to microvessels density. Serum enzymes specific to muscle injury can be used as biochemical markers for the myopathies, as they presented increased activity results directly related to age and WB myopathy severity. Breast fillets classified with lighter scores of WB had more myogenic stem cells (MyoD, Myf-5 and Pax7) when compared to more severe ones for this myopathy. According to the results obtained, the regenerative process of the pectoralis major muscle affected with myopathies is recognized by the deconstruction of the muscle tissue and connective tissue proliferation. These are already established since birds 21 d of age and can be diagnosed using biochemical markers and ultrasonography of in vivo broilers' breasts.*

Keywords: *breast myopathies, feed restriction, histomorphometry, myogenic stem cells, ultrasound.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Localização anatômica do músculo <i>Pectoralis major</i>	12
Figura 2 -	Classificação do músculo <i>Pectoralis major</i> de frangos de corte para a miopatia <i>wooden breast</i> . Grau 0 - peito normal; 1- leve endurecimento na região cranial do filé; 2 - moderado endurecimento na região cranial do filé; 3 – severo endurecimento do filé; 4 – severo endurecimento com presença de lesões hemorrágicas, aumento de volume e presença de fluido amarelado	17
Figura 3 -	Classificação de <i>white striping</i> no músculo <i>Pectoralis major</i> de frangos de corte. A) normal (NORM); B) moderado (MOD), e C) severo (SEV)	19

LISTA DE ILUSTRAÇÕES ARTIGO 1

- Figure 1 -** Wooden breast occurrence in breast fillets of broilers from 7 to 49 d. Wooden breast scores were: normal breast (score 0), mild hardening in the upper (score 1), moderate hardening in the upper and/or lower part of the fillet (score 2), severe hardening (score 3), and severe hardening with hemorrhagic lesions, increased volume, and presence of yellow fluid (score 4)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES ARTIGO 2

- Figure 1 -** Histological representative micrographs samples taken from pectoralis major muscle in broilers at 21 d and 49 d. A) At 21 d, a normal (unaffected) muscle with the presence of some hyper-eosinophilic fibers. B) At 49 d, a score 4 of WB section showing a proliferative collagen infiltration with variable fiber size (degeneration and regeneration). HE. 75
- Figure 2 -** A) Size distribution (μm) of thickness of endomysium (EMT) and perimysium (PMT) according to the WB scores (0 to 4). B) Microvessels density (mm^2) according to the WB scores (0 to 4) 77

LISTA DE ILUSTRAÇÕES ARTIGO 3

Figure 1 - SC derived from PM muscle from broiler slaughtered at 43 d and unaffected and affected with WB score 2. Identification of SCs isolated with DIC (A – unaffected, B – WB affected), DAPI (C – unaffected, D – WB affected), Type – 1 Collagen infiltration (E – unaffected, F – WB affected) and Macrophage accumulation on degenerative fiber (G – unaffected, H – WB affected)

LISTA DE TABELAS ARTIGO 1

Table 1 -	Body weight gain of broilers submitted to 70 % quantitative feed restriction or qualitative restriction with low energy and protein diets, g.	51
Table 2 -	Effects of feed restriction on performance, carcass and breast yields from 1 to 49 d and means of wooden breast and white striping scores.....	52
Table 3 -	Means of echogenicity of breast according to the age and severity of wooden breast	53
Table 4 -	Means of depth of breast according to the age and severity of wooden breast	54
Table 5 -	Values of pH and color (L*- lightness, a* - redness, b* -yellowness) according to the age and severity of wooden breast	55
Table 6 -	Means of meat quality according to the age and severity of wooden breast	56
Table 7 -	Results of MORS (N) and MORSE (N.mm) cranial and medial on pectoralis major muscle according to the age and severity of wooden breast	57
Table 8 -	Work of shear and firmness on pectoralis major muscle according to the age and severity of wooden breast	58

LISTA DE TABELAS ARTIGO 2

Table 1 -	Histomorphometric measurements of breast fillets according to the age and severity of wooden breast	76
Table 2 -	Serum enzymes concentration according to the age and severity of wooden breast	78

LISTA DE TABELAS ARTIGO 3

Table 1 -	Ingredient composition of diets fed to male Yield Plus × Ross 708 broilers from 1 to 40 d of age	95
Table 2 -	Effect of wooden breast score on collagen proportion and satellite cell population density (per mm ²) and relative density (%) in the pectoralis major from broilers at 25 d of age	96
Table 3 -	Effect of wooden breast score on collagen proportion and satellite cell population density (per mm ²) and relative density (%) in the pectoralis major from broilers at 43 d of age	97

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
	2.1 O músculo <i>Pectoralis major</i> e sua evolução genética	12
	2.2 Desenvolvimento e regeneração muscular	13
	2.3 Miopatias peitorais em frangos de corte	15
	2.3.1 <i>Wooden Breast</i>	16
	2.3.2 <i>White Striping</i>	18
	2.4. Métodos de diagnóstico de lesão muscular e suas consequências na qualidade da carne	21
	2.4.1 Diagnóstico por imagem – Ultrassonografia	21
	2.4.2 Marcadores enzimáticos	23
	2.4.3 Morfometria do peito e qualidade de carne	25
	2.5 Restrição nutricional na prevenção de miopatias	27
3	OBJETIVOS	30
	3.1 Objetivo geral	30
	3.2 Objetivos específicos	30
	3.2.1 Experimento 1.....	30
	3.2.2 Experimento 2	30
	3.2.3 Experimento 3	31
4	MATERIAL E MÉTODOS	32
5	ARTIGO CIENTÍFICO 1: Use of in-vivo measurements to estimate breast myopathies in broilers subjected to feed restriction	33
6	ARTIGO CIENTÍFICO 2: Muscle cellular characterization of wooden breast myopathy on broilers at 21 and 49 d of age	60
7	ARTIGO CIENTÍFICO 3: Characterization of myogenic stem cell populations and collagen infiltration in broiler chickens affected by wooden breast	79
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	99
	REFERÊNCIAS	101
	ANEXO - Cópia da instrução aos autores do periódico <i>Journal of Poultry Science</i>	116

1. INTRODUÇÃO

A elevada taxa de crescimento corporal dos frangos de corte está sendo associada a ocorrência de lesões principalmente no músculo *Pectoralis major*, com destaque especial para as miopatias *wooden breast* e *white striping*, caracterizadas macroscopicamente por filés de peito com consistência dura, coloração pálida e com aumento de volume e por estriações esbranquiçadas, paralelas à fibra muscular e que geralmente ocorrem na superfície ventral do peito, respectivamente.

A velocidade do desenvolvimento do músculo *Pectoralis major* durante o crescimento de frangos de corte pode estar relacionada ao surgimento destas lesões musculares, entretanto atualmente o diagnóstico das miopatias é evidenciado apenas nas carcaças, no final do ciclo de vida dos animais. Dentre os principais métodos de diagnóstico confiáveis por imagem utilizados na medicina veterinária, destaca-se a ultrassonografia, que possibilita a validação de exames *in vivo* como metodologia para diagnóstico de lesões musculares e assim poder selecionar geneticamente animais com características específicas.

A etiologia destas miopatias é desconhecida, porém há hipóteses que suas ocorrências estejam relacionadas com diversos fatores, dentre eles: ambientais, genéticos e nutricionais. Sendo assim, estratégias nutricionais como a restrição alimentar, podem apresentar resultados satisfatórios sobre a velocidade de crescimento dos tecidos, e conseqüentemente sobre a integridade do tecido muscular.

A restrição alimentar consiste em privar os animais ao livre acesso ao alimento (restrição quantitativa), restringindo a quantidade de ração oferecida ou alterando os níveis de nutrientes (restrição qualitativa), de maneira que o nutriente de interesse esteja disponível da forma restrita na ração. Ambas visam diminuir a taxa de crescimento das aves o que pode reduzir o grau de lesões musculares.

O músculo esquelético possui uma elevada capacidade de crescimento e regeneração. Este processo ocorre tanto no período de desenvolvimento embrionário como durante o processo de regeneração muscular, através das células satélites presentes no músculo maduro. As células miogênicas envolvidas no processo de regeneração muscular quando na ocorrência de miopatias, no entanto, a capacidade regenerativa das células satélites é finita; e se o músculo perde a sua capacidade regenerativa, ocorre a substituição do tecido muscular por tecido adiposo ou conjuntivo.

Para tanto, o presente trabalho teve como objetivos validar uma metodologia de

diagnóstico *in vivo* da miopatia *wooden breast* através de análises ultrassonográficas do músculo *Pectoralis major*, determinar o processo de crescimento, degeneração e regeneração celular, bem como determinar o efeito de programas de restrição alimentar sobre a ocorrência das miopatias *wooden breast* e *white striping* em frangos de corte abatidos em diferentes idades e as consequências na qualidade da carne.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

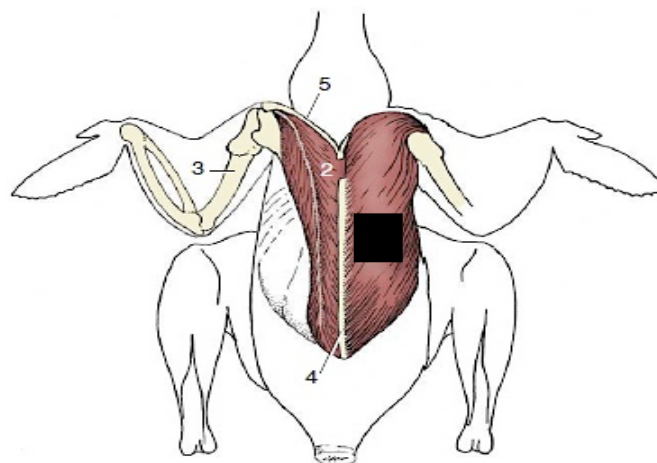
2.1. O músculo *Pectoralis major* e sua evolução genética

O músculo peitoral das aves é composto pelos músculos *Pectoralis major* e *supracoracoideus*. O *Pectoralis major* é o principal contribuinte do aumento de rendimento muscular em frangos de corte, e a seleção para maiores rendimentos de peito possui diferentes respostas no *Pectoralis major* quando comparado ao *supracoracoideus* (ZAPATA *et al.*, 2012).

O *Pectoralis major* é o músculo mais volumoso do corpo da ave formando, em parte, a massa carnosa associada com o peito. Ele tem origem na quilha do esterno e da clavícula, seguindo diretamente para a superfície ventral do tubérculo dorsal do úmero. Localiza-se dorsalmente ao rádio e seu curto tendão passa subcutaneamente sobre a superfície craniodorsal da articulação do carpo e termina na extremidade proximal do osso metacárpico (DYCE; WENSING, 2010).

Anatomicamente, este músculo é dividido em três porções: torácica, de maior massa muscular; propatagial, associada com o tensor propatagial; e abdominal, representada como um feixe muscular cutâneo composto de dois feixes musculares (subcutâneo torácico e abdominal) (Figura 1) (VANDEN BERGE, 1975).

Figura 1 - Localização anatômica do músculo *Pectoralis major*



Fonte: Dyce e Wensing (2010)

1. *Pectoralis major*; 2. *Supracoracoideus*; 3. Úmero; 4. Esterno; 5. Clavícula

Entretanto, as aves utilizadas na avicultura moderna atualmente vêm sofrendo várias alterações na sua composição corpórea e fisiológica. Nas últimas décadas, a indústria avícola sofreu mudanças significativas nas áreas de nutrição, genética e sanidade. De 1957 a 2005, houve aumento de 400% no crescimento de frangos de corte e redução de 50 % na conversão alimentar. Neste mesmo espaço de tempo, houve o incremento de 79 % e de 85 % do músculo *Pectoralis major* de machos e de fêmeas, respectivamente (ZUIDHOF *et al.*, 2014).

Autores verificaram que este crescimento muscular difere em frangos de corte e aves poedeiras, sugerindo que, nos animais destinados a produção de carne, a taxa de síntese proteica nos músculos do peito é maior e a taxa de degradação proteica nos músculos do peito e das pernas é menor, quando comparado às poedeiras. Assim, o peso corpóreo do frango de corte tende a ser duas a três vezes maior do que de uma ave poedeira da mesma idade, devido à maior deposição de proteína nas partes comestíveis da carcaça, principalmente no músculo peitoral (GONZALES; SARTORI, 2002).

Segundo diversos autores, a seleção genética resultou em um aumento na tendência de miopatias espontâneas ou geradas pelo estresse (lesão muscular) (SANTE *et al.*, 1991; LE BIHAN-DUVAL; MILLET; REMIGNON, 1999; MITCHELL, 1999 SANDERCOCK *et al.*, 2001; MACRAE *et al.*, 2007). Como consequência disto, por razões comerciais, os músculos da região do peito são os mais susceptíveis a apresentarem alterações histopatológicas (SOIKE; BERGMANN, 1998).

2.2 Desenvolvimento e regeneração muscular

O músculo esquelético possui uma elevada capacidade de crescimento e regeneração. O número de fibras musculares é determinado durante a embriogênese e nesta fase, estruturas denominadas somitos sofrem compartimentalizações e darão origem aos mioblastos, que são células precursoras da musculatura. Essas células irão proliferar e migrar para locais específicos, onde se diferenciarão em miotubos e finalmente se agruparão para formar as fibras musculares (BUCKINGHAM *et al.*, 2003). Este processo ocorre tanto no período de desenvolvimento embrionário como durante o processo de regeneração muscular, através das células satélites presentes no músculo maduro (OLIVEIRA, 2009).

Células satélites são as células precursoras da musculatura esquelética após o nascimento. Estas células estão localizadas entre a membrana plasmática e a lâmina basal

da fibra muscular (SEALE *et al.*, 2000). Após o nascimento, as células satélites são as únicas células musculares que ainda proliferam, diferenciam-se e fundem-se com as fibras musculares adjacentes ou com outras células satélites (MAURO, 1961). Após a mitose, as células satélites incorporam DNA à fibra muscular e, apesar de representarem um pequeno percentual da densidade total de núcleos no tecido muscular, essa deposição de DNA à fibra muscular pode representar mais da metade do DNA acumulado após a eclosão (GRANT; GERRARD, 1998).

No músculo maduro, células satélites são quiescentes, mas podem ser ativadas em resposta a estímulos como crescimento e injúrias, para reparar as miofibras. Este processo consiste em curta fase de proliferação, seguida pela saída do ciclo celular, a diferenciação em mioblastos e finalmente a fusão com os miotubos (KOLEVA *et al.*, 2005). Células satélites quiescentes expressam a proteína Pax7 (ZAMMIT; BEAUCHAMP, 2001), durante a proliferação expressam MyoD, Myf5 e Pax7 (ZAMMIT *et al.*, 2006; KOLEVA *et al.*, 2005), enquanto que MRF4 e Miogenina são necessários para a formação dos miotubos (NINOV, 2010).

A seleção genética para um maior crescimento provocou um aumento na taxa de proliferação dos mioblastos e das células satélites, isto foi observado pelo maior número de mionúcleos, maior síntese de DNA e maior conteúdo total de DNA (REHFELDT *et al.*, 2000). De acordo com Halevy *et al.* (1998), as células satélites parecem ser a única fonte de células miogênicas durante o crescimento muscular esquelético de frangos de corte pós-eclosão, sendo que a maioria dos núcleos em células musculares maduras provém de tais células. Durante o crescimento inicial, o número de células satélites é relativamente alto para fornecer um maior conteúdo de DNA para o crescimento da fibra. À medida que o crescimento desacelera, estes valores decrescem até alcançarem uma menor população estável no músculo maduro, variando de 4 a 15 % dos núcleos totais na fibra (ALLEN; RANKIN, 1990 *apud* POPHAL, 2012).

Esta população de células precursoras musculares pode suportar diversos ciclos de degeneração e regeneração (CHARGÉ; RUDINICKI, 2004). Na degeneração é possível observar a morte das fibras musculares por apoptose ou necrose. Este evento é marcado pelo rompimento do sarcolema das miofibras, refletido por uma elevação no nível sérico de proteínas musculares como a creatina quinase, geralmente restrita ao citoplasma da célula muscular. Assim, em decorrência deste processo, é possível observar a ativação de células mononucleadas, especialmente células inflamatórias e células-satélites, que determinam a indução da regeneração muscular (OLIVEIRA, 2009).

No entanto, a capacidade regenerativa das células-satélite é finita; se o músculo perde a sua capacidade regenerativa, ocorre a substituição do tecido muscular por tecido adiposo ou conjuntivo.

2.3 Miopatias peitorais em frangos de corte: *Wooden Breast* e *White Striping*

Alterações musculares caracterizadas por uma miodegeneração no filé do peito de frangos de corte tem causado preocupações à indústria avícola, as quais incluem estriações esbranquiçadas, paralelas à fibra muscular e que geralmente ocorrem na superfície ventral do filé do peito (*white striping* (WS)), Kuttappan *et al.*, 2009), filés de consistência dura, pálidos e com aumento de volume (*wooden breast* (WB)), Sihvo *et al.*, 2014), e filés com uma tendência de separação das bandas de fibras musculares (*spaghetti meat* (SM)), SIRRI *et al.*, 2016).

Estas miopatias possuem etiologia desconhecida, porém são associadas a frangos de corte machos, de rápido crescimento, ganho de peso e possuem aumento da severidade conforme o peso do filé (KUTTAPPAN *et al.*, 2012; 2013, PETRACCI *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2014; TROCINO *et al.*, 2015; RADAELLI *et al.*, 2017).

A menor densidade capilar resultante da seleção genética realizada ao longo dos anos pode estar relacionada com uma redução no fornecimento de nutrientes, oxigênio e também na remoção mais lenta de ácido lático nos músculos, conduzindo a danos musculares e com o aparecimento destas miopatias (BILGILI, 2013).

Nestas miopatias, alterações macroscópicas são restritas ao músculo peitoral maior, que mostra-se pálido com áreas extensas de dureza substancial acompanhados de estrias brancas; outros músculos esqueléticos parecem não serem afetados. Nenhum sintoma *ante-mortem* particular tem sido relacionado com esta condição. Essa condição gera rejeição de consumo, o que traz perdas econômicas significativas para indústria e aumenta o interesse para resolver a etiologia e, posteriormente, encontrar meios para evitá-la. Miopatias descritas anteriormente que possam afetar o músculo peitoral major de frangos de corte incluem distrofia muscular hereditária, tensão térmica, trauma, esforço, nutricional e toxicológico. Contudo a consistência endurecida do músculo não é, tipicamente, um achado dentro dessas etiologias. Atualmente, a etiologia e os fatores que causam o rápido aumento desta desordem no músculo peitoral ainda é desconhecida.

Petracci *et al.* (2013) relataram que os híbridos para alto rendimento de peito apresentaram uma maior incidência de *white striping* em comparação com aves de

rendimento padrão. De fato, a questão genética vem sendo reportada como uma das principais responsáveis pelo aumento do aparecimento das lesões musculares principalmente no peito das aves, mas falta definição da causa que podem ser multifatoriais, associados além de fatores genéticos, por fatores ambientais, nutricionais, de manejo ou fisiológicos (ZAMBONELLI, 2017).

Com o intuito de reduzir a ocorrência destas miopatias uma vez que possuem uma estreita relação com o rápido ganho de peso dos animais, estudos com estratégias nutricionais foram elaborados, demonstrando que a suplementação com vitamina E (KUTTAPPAN *et al.*, 2012), selênio (FERREIRA *et al.*, 2016; SIHVO *et al.*, 2017), não possuem efeito na prevenção destas miopatias, entretanto, dietas com diminuição do conteúdo proteico (KUTTAPPAN *et al.*, 2012) e dos níveis de lisina (CRUZ *et al.*, 2017) sugerem uma efeito positivo na ocorrência das lesões de peito, porém estas alterações também foram associadas com uma diminuição na taxa de crescimento e/ou peso da ave ao abate.

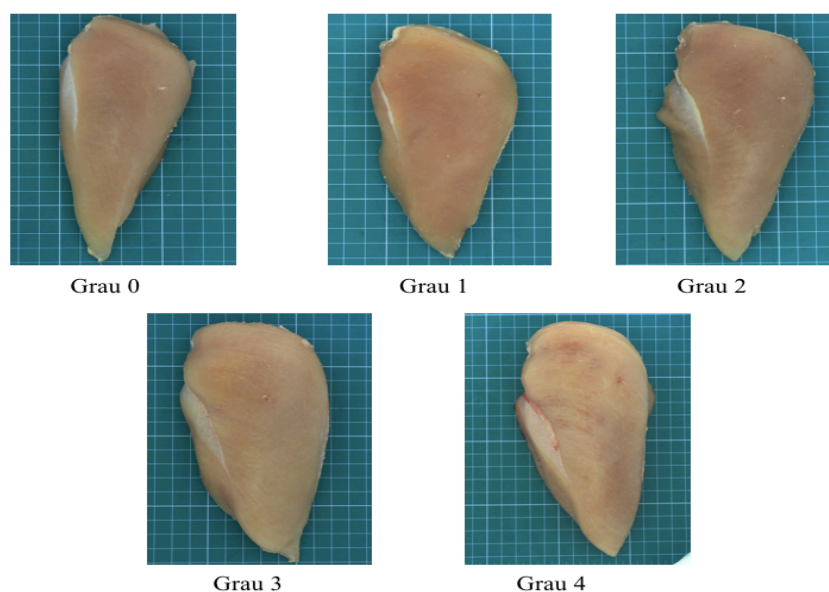
Programas de restrição alimentar também foram avaliados, com uma frequência menor de lesões degenerativas da fibra muscular no período de restrição (80% entre os 13 e 21 dias de idade), porém não se obteve um efeito residual após a re-alimentação, sem diferenças na ocorrência de lesões a partir dos 35 dias de idade entre os animais dos grupos *ad libitum* e os restritivos (TROCINO *et al.*, 2015; RADAELLI *et al.*, 2017).

De acordo com Zambonelli *et al.* (2017), há uma alteração nas vias de expressão dos genes nos filés afetados com WS/WB, sendo estas relacionadas ao desenvolvimento muscular, processos no metabolismo de polissacarídeos, síntese de proteoglicanos, inflamação e vias de sinalização de cálcio, tendo os autores classificados estas miopatias como de etiologia multifatorial e complexa.

2.3.1 *Wooden Breast*

Nos últimos anos, foi descrito uma nova miopatia associada à qualidade da carne de peito de frango, chamada *wooden breast*. Macroscopicamente, estas alterações estão restritas ao músculo *Pectoralis major* e são caracterizadas por áreas pálidas e com diversos níveis de rigidez aumentada (SIHVO *et al.*, 2014, VIEIRA *et al.*, 2017). A lesão é detectada manualmente, por meio da palpação, e acomete as aves a partir de 3 semanas de idade, podendo afetar mais de 50% de um lote (MUTRYN *et al.*, 2015).

Figura 2 – Classificação do músculo *Pectoralis major* de frangos de corte para a miopatia *wooden breast*. Grau 0 - peito normal; 1- leve endurecimento na região cranial do filé; 2 - moderado endurecimento na região cranial do filé; 3 – severo endurecimento do filé; 4 – severo endurecimento com presença de lesões hemorrágicas, aumento de volume e presença de fluido amarelado.



Fonte: Vieira *et al.* (2017)

Visualmente, pode-se observar extensa área pálida, rígida e com ondulações, além de material viscoso com petéquias ou pequenas hemorragias nos casos aonde o grau de severidade é maior, concomitante com lesões de *white striping* (SIHVO *et al.*, 2014). Microscopicamente, observa-se degeneração multifocal e necrose caracterizadas pela perda das estriações e por ser infiltrado de células inflamatórias, principalmente macrófagos e heterófilos. As áreas afetadas apresentam espessamento difuso do interstício com quantidade variada de tecido conjuntivo, tecido de granulação ou fibrose separando as fibras musculares (SIHVO *et al.*, 2014).

A prevalência e etiologia desta miopatia ainda é desconhecida. Há indícios de maior expressão gênica à hipóxia e ao estresse oxidativo em aves acometidas, porém não está claro se é primária ou secundária a doença (MUTRYN *et al.*, 2015).

Os mesmos autores, objetivando caracterizar a miopatia *wooden breast* através de expressão gênica, verificaram que muitos genes envolvidos na reparação celular foram expressos nos peitos de frangos acometidos e que provavelmente estejam ligados com a *wooden breast* em um esforço para compensar os danos musculares. Além disto, os

autores notaram que genes envolvidos no sistema de coagulação não estavam expressos significativamente no músculo, dificultando a associação com a doença (MUTRYN *et al.*, 2015).

Neste contexto, estudos demonstram a mudança no metabolismo glicolítico de aves selecionadas geneticamente, através da diminuição da capilaridade em relação ao número de fibras (SOSNICKI; WILSON, 1991). Segundo Mudalal *et al.* (2015), a seleção genética para ganho de peso e para rendimento de peito é a hipótese com maior suporte e os fatores que apresentam maior influência no aparecimento dessa anormalidade.

Além da aparência e da coloração da carne, a *wooden breast* afeta a qualidade da carne refrigerada ou marinada. A carne de peito se apresenta endurecida, com diminuição na absorção da salmoura e maior perda por cocção que peitos afetados por *white striping* ou normais (sem miopatia). O fator principal na redução da qualidade decorrente dos peitos amadeirados é a diminuição da capacidade de retenção de água o que pode estar associada a dureza e aspecto de “madeira” (MUDALAL *et al.*, 2015).

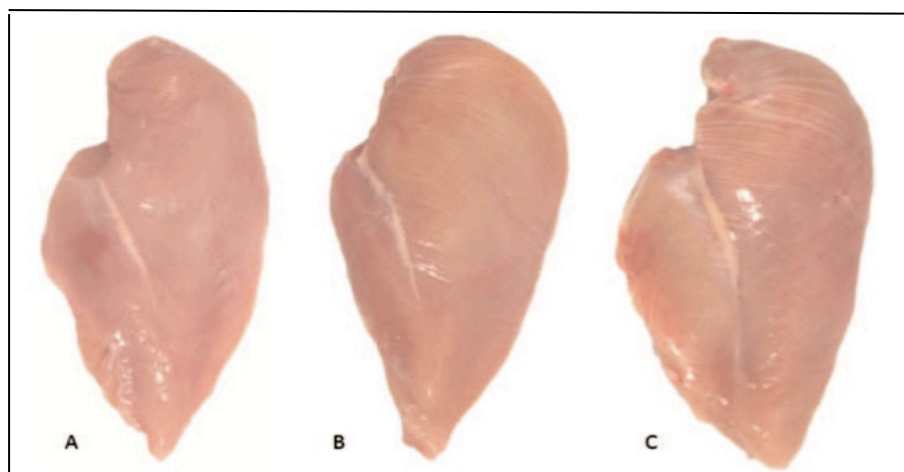
Com relação as características tecnológicas dos filés afetados, observa-se um aumento nos valores de pH, perda por gotejamento, perda por cocção e valores de b* (tom de amarelo) com uma diminuição na capacidade de retenção de água e maciez (PETRACCI *et al.*, 2013; MUDALAL *et al.*, 2015; SOGLIA *et al.*, 2015; TIJARE *et al.*, 2016; KUTTAPPAN *et al.*, 2017). As composições proximais destes filés demonstraram aumentos no conteúdo de lipídios, cálcio, sódio e umidade, com reduzidos valores de proteína (PETRACCI *et al.*, 2014; SOGLIA *et al.*, 2015; MAZZONI *et al.*, 2015; BALDI *et al.*, 2018),

2.3.2 *White Striping*

A miopatia *white striping* caracteriza-se pelo aparecimento de vários graus de estrias esbranquiçadas na superfície do músculo *Pectoralis major* de frangos de corte as quais seguem a direção da fibra muscular (BAUERMEISTER *et al.*, 2009; KUTTAPPAN *et al.*, 2009).

Macroscopicamente, categoriza-se esta condição de acordo com o grau de estriações presentes no músculo peitoral em: normal (NORM), sem estriações aparentes; moderado (MOD), estriações visíveis no músculo e inferiores a um (1) mm de espessura, e severo (SEV), com estriações superiores a um (1) mm e facilmente observadas na superfície do músculo (KUTTAPPAN *et al.*, 2009) (Figura 3).

Figura 3 – Classificação de *white striping* no músculo *Pectoralis major* de frangos de corte. A) normal (NORM); B) moderado (MOD), e C) severo (SEV).



Fonte: Kuttappan *et al.* (2012a)

Estudos anteriores mencionaram a presença de estrias esbranquiçadas no músculo peitoral de frangos de corte e, ocasionalmente, no músculo da perna, semelhante às descritas na ocorrência de *white striping*, entretanto, esta alteração foi associada à condição de distrofia muscular induzida pela deficiência nutricional de vitamina E na dieta das aves (DAM; PHANG; SONDERGAARD, 1952; SCOTT *et al.*, 1955; MACHLIN; SHALKOP, 1956; MACHLIN; PEARSON, 1956; NESHEIM; LEONARD; SCOTT, 1959; FERGUSON *et al.*, 1964; BUNYAN *et al.*, 1967; NETKE *et al.*, 1969; KLASING, 2008).

Porém, em pesquisa realizada por Kuttappan *et al.* (2012c), estudou-se a similaridade da aparência entre animais acometidos com *white striping* e distrofia muscular nutricional ocasionada pela deficiência de vitamina E, concluindo que o nível de vitamina E na dieta não está associado com a ocorrência de *white striping* no músculo peitoral de frangos de corte.

Petracci *et al.* (2013a), estudando a incidência desta miopatia em criações comerciais de frangos de corte na Itália, analisaram 28.000 aves oriundas de 56 lotes e encontraram uma incidência total de 12% de frangos acometidos com *white striping*, sendo 8,9% classificados com grau moderado e 3,1% de grau severo.

Com o objetivo de estudar a relação entre a severidade de *white striping* e o crescimento de frangos de corte, Bauermeister *et al.* (2009) verificaram aumento da incidência e da severidade desta miopatia com o aumento do peso vivo e do peso dos filés

de peito, tendo também aumentado a severidade nos animais abatidos com oito semanas de idade quando comparados aos abatidos com seis semanas.

As causas da formação de *white striping* são desconhecidas, mas avaliações histológicas demonstraram que esta alteração é usualmente associada à degeneração muscular e alterações miopáticas abaixo da área com estriação, como perda das estriações transversais, variabilidade no tamanho da fibra, degeneração flocular/vacuolar e lise das fibras, mineralização moderada, regeneração, infiltração de células mononucleares, lipidose, inflamação intersticial e fibrose (KUTTAPPAN *et al.*, 2011 e 2013b; PETRACCI *et al.*, 2013b). De acordo com Kuttappan *et al.* (2011), há um significativo aumento de lesões degenerativas e necróticas, além de fibrose e lipidose, a medida em que o grau de *white striping* aumenta, tendo os autores classificado as alterações apresentadas como um caso de distrofia muscular idiopática.

Conforme Kuttappan *et al.* (2012b), o aumento das taxas de crescimento resulta em maior incidência de frangos de corte acometidos com *white striping*, e os vários graus desta miopatia estão associados com alterações na composição química destes filés de peito. Corroborando com esta afirmativa, em outro trabalho, Kuttappan *et al.* (2013b) observaram acréscimo no teor de gordura muscular e decréscimo de proteína, conforme o aumento do grau de *white striping*, concluindo que estas alterações histopatológicas indicam uma miopatia degenerativa que pode estar associada com a taxa de crescimento das aves.

De acordo com Kuttappan *et al.* (2012a), este fenômeno de etiologia desconhecida está afetando a aceitação do consumidor com relação à severidade da mesma no filé do peito. O estudo relata que 50% dos consumidores consultados não comprariam a carne que apresentasse filetes de estrias de graus moderado ou severo. Dentre os problemas relacionados à carne de aves, acredita-se que, similarmente a suínos, a incidência de problemas de coloração na carne ocorre em 5-40% das carcaças e compromete a aparência geral do produto final, atributo de grande valia para os europeus e para os consumidores mais exigentes.

Sendo assim, em razão do pouco conhecimento a respeito destas miopatias e por afetar o aspecto visual de um dos cortes de maior valor comercial da carne de frangos, torna-se de suma importância um maior aprofundamento destas.

2.4 Métodos de diagnóstico de lesão muscular e suas consequências para qualidade da carne

Apesar da taxa de crescimento, da conversão alimentar e da quantidade de musculatura terem aumentado em razão dos programas de seleção para frangos de corte, a qualidade da carne foi alterada (DRANSFIELD; SOSNICKI, 1999), o que resultou na criação de condições que favoreçam a susceptibilidade às alterações metabólicas e a mudanças na estrutura celular do músculo esquelético, tanto morfológicas como bioquímicas.

Existem dois tipos de métodos para analisar os danos musculares, os diretos e indiretos. Os métodos diretos são realizados através de análises por imagens ou por amostras musculares. Já os métodos indiretos são obtidos principalmente através de respostas das concentrações de enzimas plasmáticas, proteínas musculares e parâmetros físico-químicos. Através destes métodos torna-se, possível avaliar os efeitos das lesões musculares nas características de qualidade da carne.

2.4.1 Diagnóstico por imagem - Ultrassonografia

Exames por imagem podem ser úteis para auxiliar no diagnóstico de lesões com maior precisão (FERNANDES *et al.*, 2011). A ultrassonografia é uma técnica empregada para a obtenção de imagens, que se baseia no fenômeno de interação de som e tecidos, ou seja, a partir da transmissão de onda sonora pelo meio, observando-se as propriedades mecânicas dos tecidos (MOLNÁR; CERRI, 2004).

As ondas ultrassônicas são produzidas e direcionadas para o interior do corpo até atingirem uma barreira tissular que irá refleti-las para o transdutor. As ondas produzidas atingem uma velocidade de cerca 1500m/s e, quando refletidas, são denominadas de ecos.

O transdutor é um cristal vibratório acionado eletricamente que tem a função de converter energia elétrica em energia ultrassônica, ele tanto envia quanto recebe as ondas de eco, agindo tanto como transmissor quanto receptor, convertendo as ondas em tensões elétricas novamente. Tal frequência não é transmissível em ar ou gás, apenas em sólidos e líquidos. As imagens são produzidas pela oscilação longitudinal contra a superfície do tecido. A intensidade das ondas são parcialmente refletidas pelo plano tecidual profundo, sendo parte delas recebidas pelo transdutor. Quanto maior a frequência nominal do

transdutor, menor a profundidade de penetração e melhor é a resolução espacial da imagem (BANDEIRA *et al.*, 2013)

O exame pode ser utilizado no diagnóstico de lesões musculares, detectando hematomas, abscessos e fibroses. Um sangramento agudo ou difuso pode ser difícil de ser localizado por ultrassom porque o sangue recém-coagulado é inicialmente ecogênico (KOFLEER; BUCHNER, 1995). Segundo Heppelmann *et al.* (2009), o fluido é o meio de transporte ideal para as ondas de ultrassom e é responsável pelas diferenças de impedância acústica, que é um pré-requisito para a diferenciação de tecidos. Processos inflamatórios sépticos são visualizados na ultrassonografia devido ao acúmulo de líquido nos tecidos durante a fase exsudativa. Lesões traumáticas edemaciadas de tecidos moles e avaliação da cicatrização de feridas são outras indicações para ultrassonografia.

O aumento da quantidade de gordura intramuscular e fibrose em um tecido muscular resulta no aumento da eco-reflexão e brilho da imagem do ultrassom (HECKMATT; PIER; DUBOVITZ *et al.*, 1988; PILLEN *et al.*, 2009). Embora ambas as avaliações de ultrassom qualitativos e quantitativos do músculo esquelético são eficazes na identificação de patologias musculares, a ultrassonografia quantitativa oferece superior confiabilidade e maior sensibilidade para detectar tais patologias (HECKMATT *et al.*, 1989; ZUBERI *et al.*, 1999; MAURITS *et al.*, 2003; PILLEN *et al.*, 2006).

A quantificação da quantidade de patologia músculo usando ultrassom fornece uma medida sensível, não invasiva e pode ser utilizada na classificação da gravidade das doenças como distrofias musculares (ZAIDMAN; HOLLAND; HUGHES, 2010; JANSEN *et al.*, 2011). Pillen (2009) encontrou uma significativa correlação entre a quantidade de tecido conjuntivo e a intensidade de ecogenicidade muscular em cães afetados com distrofia muscular.

Diferentes autores já propuseram a utilização do método para correlacionar imagens obtidas pelo ultrassom com o peso de peito e suas proporções em relação a carcaça em frangos de corte. Além disso, as imagens ultrassonográficas podem identificar a presença de diversas alterações teciduais, como edema, inflamação, acúmulo de gordura, fibrose e calcificação (MITTAL *et al.*, 2003; CASE *et al.*, 2012). Este método vem contribuir com pesquisas da área através do reconhecimento da miopatia no animal vivo, o que pode vir a ser um novo método de diagnóstico de miopatias, possibilitando o desenvolvimento de estratégias na seleção dos animais antes do abate.

2.4.2. Marcadores enzimáticos

A seleção genética para características de produção, como a taxa de crescimento, o peso de abate e a eficiência da conversão alimentar tem sido extremamente bem-sucedida na produção avícola. No entanto, em frangos de corte e perus, estas melhorias no desempenho produtivo podem estar associadas com alguns efeitos prejudiciais sobre o músculo esquelético (MITCHELL, 1999). Partindo deste princípio, pesquisas tem sugerido que mudanças em enzimas plasmáticas sejam um indicativo de dano no músculo esquelético de frangos de corte, pois estas alterações enzimáticas seriam consequência de uma modificação na permeabilidade da membrana de células musculares (MITCHELL; SANDERCOCK, 1995; YAN *et al.*, 2009).

A atividade enzimática é utilizada na rotina como um marcador de detecção em patologias em animais, porém em frangos de corte ainda há pouca informação sobre os níveis enzimáticos. Porém, Gee *et al.* (1981) recomenda o uso das enzimas aspartato aminotransaminase (AST), creatina quinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH) como indicadores de lesão em tecido muscular para patologias em aves. Elevações acentuadas na atividade de CK no plasma foram reportadas em várias condições patológicas musculares em frangos, incluindo miopatias (MITCHELL *et al.*, 1992; MITCHELL; SANDERCOCK, 1994, 1995) e distrofia muscular congênita no músculo esquelético (STEWART *et al.*, 2004).

De acordo com Mitchell *et al.* (1999), o aumento do crescimento muscular compromete a integridade da membrana do músculo esquelético, o que provoca alterações a nível enzimático sérico, tais como mudanças quantitativas na atividade de LDH, de CK e de AST. Em razão de estas moléculas serem citoplasmáticas e não terem a capacidade de atravessar a barreira da membrana sarcoplasmática, o aumento da concentração sérica dessas moléculas livre na circulação sanguínea é utilizado como indicativo de dano na membrana muscular e em outras estruturas teciduais (BROWN; CHILD; DONNELLY, 1997).

Segundo Szabó *et al.* (2005), a atividade de CK no soro aumenta em paralelo com o peso corporal total ou massa muscular, colocando como hipótese de causa o aparecimento de uma hipertrofia peitoral ou até mesmo danos na membrana muscular, e apresentando como base desta interpretação o aumento de mais de uma de magnitude no soro sanguíneo. Partindo deste princípio, Mahon *et al.* (1995) e Mills *et al.* (1998) relataram que extensivos estudos histológicos, principalmente em perus comerciais, têm

obtido resultados afirmativos ao comparar a elevada atividade plasmática de marcadores enzimáticos intracelulares, como CK, com o aumento da incidência de anormalidades da estrutura muscular conforme a o acréscimo da idade.

Há inúmeros mecanismos, através dos quais o cálcio pode induzir uma disfunção metabólica, incluindo alterações na integridade da membrana muscular (MITCHELL, 1999). Altas elevações descontroladas e sustentada de cálcio intracelular causam dano muscular, sendo característica de muitas doenças e patologias musculares. Está bem claro que estes aumentos prolongados podem ativar vários processos degenerativos intracelulares, o que resulta na quebra estrutural e funcional de células de músculo esquelético (JONES *et al.*, 1984; DUNCAN; JACKSON, 1987; JACKSON, 1993). Acredita-se que o extravasamento de CK a partir de células musculares esqueléticas nestas situações seja uma consequência de alterações na integridade da membrana da célula muscular (sarcolema) induzida por elevações de cálcio intramuscular (SANDERCOCK; MITCHELL, 1998; SANDERCOCK *et al.*, 2001).

Com relação ao perfil hematológico e sorológico dos frangos de corte acometidos com *white striping*, Kuttappan *et al.* (2013c) não encontraram diferenças em vários parâmetros hematológicos, porém foram observados aumentos nos níveis séricos de creatina quinase, alanina transaminase, aspartato aminotransferase e lactato desidrogenase nos animais cujos músculos foram classificados como de grau severo. Estes resultados, segundo os autores, sugerem que não há infecção sistêmica ou inflamatória associada ao grau severo de *white striping*. O aumento do nível sérico das enzimas confirma uma lesão muscular associada com miopatia degenerativa nos animais de grau severo.

Guetchom *et al.* (2012), avaliando o efeito da suplementação de vitamina E sobre a integridade muscular do peito de frangos de corte e sobre os marcadores enzimáticos, verificaram que a adição de vitamina E na dieta convencional aumentou os níveis plasmáticos de vitamina E e ligeiramente diminuiu o número de fibras danificadas no músculo peitoral de frangos de corte jovens (28 dias). A atividade da enzima CK não foi um indicador bioquímico confiável de degeneração muscular leve em frangos de corte.

2.4.3 Morfometria do peito e qualidade de carne

A seleção para altas taxas de crescimento nos frangos de corte promove alterações estruturais e metabólicas nos músculos e altera a qualidade da carne. A produção de filés de peito com especificações rígidas de peso, comprimento e espessura para produção de produtos pós-processados ou para consumo em restaurantes de comidas rápidas, possui implicações econômicas importantes para rentabilidade das integrações (MADEIRA, 2008).

O comprimento, espessura e peso do filé de peito de frangos de corte são afetados pela linhagem, sexo e idade das aves. Filés mais longos, espessos e pesados são produzidos pelas aves mais velhas e por machos (ROBINSON *et al.*, 1996b). O aumento na massa peitoral se deve, principalmente, ao aumento na espessura do músculo *Pectoralis major* (LUBRITZ, 1997). A espessura da parte mais larga do *Pectoralis major*, próximo à inserção das asas, varia de acordo com a linhagem; o mesmo não ocorre com a ponta mais fina do músculo (ROBINSON *et al.*, 1996b; MADEIRA, 2008).

Esta alta taxa de crescimento morfológico do peito promove maior diâmetro das fibras musculares, maior proporção de fibras glicolíticas e menor proteólise muscular. Estas alterações proporcionam o *rigor mortis* mais rápido, aumentando a palidez da carne e diminuindo a capacidade de retenção de líquidos, piorando a qualidade dos produtos processados. A diminuição da proteólise muscular aumenta a dureza das carnes de aves (DRANSFIELD; SOSNICKI, 1999). O efeito da seleção para ganho de peso apresenta aumento da área transversal das fibras (ABERLE *et al.*, 1979; IWAMOTO *et al.*, 1993; BURKE; HENRY, 1997; SCHEUERMANN, 2004) e indica a possibilidade de inclusão desta variável nos programas de seleção. (MADEIRA, 2008).

Dentre os principais atributos avaliados na carne para determinar sua qualidade destacam-se cor, capacidade de retenção de água e textura. A cor é um dos fatores mais importantes na percepção do consumidor quanto à qualidade da carne, pois é uma característica que influencia tanto a escolha inicial do produto pelo consumidor como a aceitação no momento do consumo (FLETCHER, 1999).

De acordo com OLIVO *et al.* (2001), a cor observada na superfície das carnes é o resultado da absorção seletiva da luz pela mioglobina e por outros importantes componentes, como as fibras musculares e suas proteínas, sendo também influenciada pela quantidade de líquido livre presente na carne. Os parâmetros utilizados na avaliação da cor da carne utilizados baseiam-se no sistema colorimétrico denominado CIELab e

suas coordenadas cromáticas (luminosidade, representada por L^* , teor de vermelho, representado por a^* e teor de amarelo, representado por b^*).

A capacidade de retenção de água é um termo originalmente usado para descrever a capacidade do músculo e dos produtos cárneos em manter a água ligada a si (FENNEMA, 1990). A água no músculo é retida em sua maior parte intracelularmente e também entre as miofibrilas (OFFER; KNIGHT, 1988). A capacidade de retenção de água está entre as propriedades funcionais mais importantes da carne (ANADÓN, 2002), pois influencia seu aspecto, sua palatabilidade e está diretamente relacionada às perdas de água antes e durante o cozimento (BRESSAN, 1998).

Trocino *et al.* (2015) verificaram que peitos de frangos acometidos com *White striping* exibiram pequenas diferenças nos valores pH final e cor, e os acometidos com *wooden breast* demonstraram valores similares de pH e cor porém perderam mais água e exibiram maiores forças de cisalhamento quando comparados com peitos normais ou com *white striping*.

A textura é outro fator bastante importante na percepção do consumidor quanto à qualidade da carne (BRESSAN, 1998). A textura da carne, determinada por sua força de cisalhamento, está intimamente relacionada à quantidade de água intramuscular e, portanto, à capacidade de retenção de água da carne, de modo que quanto maior o conteúdo de água fixada no músculo, maior a maciez da carne (ANADÓN, 2002).

Avaliando as características físico-químicas de filés de peito de aves acometidas com *white striping*, Kuttappan *et al.* (2013a) aferiram as dimensões dos filés (comprimento, largura, espessura cranial e caudal), o pH, a cor (L^* [luminosidade], a^* [tom de vermelho] e b^* [tom de amarelo]), a perda de peso por cocção e a força de cisalhamento e concluíram que o grau de *white striping* não influenciou ($P > 0,05$) os valores de pH, L^* , a^* , perda de peso por cocção e força de cisalhamento. Entretanto, nas amostras consideradas de grau severo de *white striping* foram observados aumentos significativos na espessura cranial e no tom de amarelo (b^*), o que pode comprometer a qualidade estética do produto comercializado.

Dalle Zotte *et al.* (2014) avaliaram as características físico-químicas do peito de frangos acometidos com *wooden breast* e verificaram valores de pH mais elevados, cor mais clara e valores de L^* , a^* e b^* mais elevados quando comparados com peitos considerados normais (sem miopatia). Além disto, os peitos acometidos apresentaram menor capacidade de retenção de água e maiores perdas de rendimento de corte pós-

congelamento e pós-cocção. Em contrapartida, os valores de força de cisalhamento não apresentaram diferença significativa.

Mazzoni *et al.* (2015) constataram que o grau de miodegeneração do músculo peitoral de frangos de corte refletiu em uma ampla modificação da composição química e uma deficiência notável na capacidade de processamento da carne.

2.5 Restrição nutricional na prevenção de miopatias

Em sistemas de produção de carne, o conhecimento dos fatores que determinam o crescimento e desenvolvimento dos tecidos e do organismo como um todo é fundamental para a adequação de programas de melhoramento, de manejo nutricional, ambiência e definição da idade de abate, para melhorar a qualidade e a quantidade de carne produzida. Para que isso ocorra é necessário que o sistema digestório apresente características funcionais estruturais para a digestão e a absorção de nutrientes (FURLAN, 2014).

O método atualmente utilizado para formulação de dietas para frangos de corte baseia-se em tabelas de exigências nutricionais que somente leva em conta as diferentes fases de crescimento das aves. A utilização de uma exigência mínima fixa impossibilita a determinação do efeito sobre o crescimento, consumo ou composição de carcaça (GOUS, 1998; POPHAL, 2004).

A seleção genética para carne magra, os grandes músculos do peito e as rápidas taxas de crescimento fazem com que as aves domésticas particularmente como frangos de corte sejam suscetíveis ao estresse oxidativo (SIHVO *et al.*, 2013).

Diversos estudos sobre programas de manejo que restringem o rápido crescimento têm mostrado que a prática da restrição alimentar é uma proposta viável a ser explorada.

A restrição alimentar pode ser realizada em termos qualitativos ou quantitativos, porém no primeiro caso a ração utilizada possui um menor nível proteico ou energético, com isso as aves tendem a ingerir maiores quantidades de ração na tentativa de equilibrar suas necessidades, levando a um consumo desequilibrado de alguns nutrientes tais como, aminoácidos, minerais e vitaminas. Na restrição quantitativa, a ração fornecida contém os níveis recomendados de nutrientes, variando apenas a quantidade fornecida ou tempo de acesso aos alimentos (RAMOS, 2007).

Uma das preocupações com relação à introdução da técnica de restrição alimentar está associada ao ganho compensatório, pois o peso de abate é um parâmetro importante para a comercialização (FURLAN *et al.*, 2002).

A restrição alimentar diminui o crescimento das aves no período da limitação da ingestão do alimento, que pode ser compensado durante o período de realimentação, denominado período de ganho compensatório (YU *et al.*, 1990). No entanto, alguns estudos, como os de Plavinik e Hurwitz (1985), mostraram que o ganho compensatório ocorre somente após curto período de restrição.

De acordo com Gonzales (1992), a restrição alimentar (50%) em frangos de corte deve ser seguida de pelo menos três semanas de realimentação, período necessário para que as aves apresentem ganho compensatório e, conseqüentemente, peso final semelhante ao dos frangos com consumo à vontade. Entretanto, Moran Jr. (1992), sugere que seriam necessárias seis semanas de realimentação para que as aves consigam recuperar a perda de peso ocasionada pela restrição alimentar precoce. Outros autores, no entanto, não encontraram os mesmos resultados, ficando os animais com perdas no peso corporal após a restrição alimentar e, sugeriram que o ganho compensatório não existe (MOLLINSON *et al.*, 1984; CABEL; WALDROUP, 1990; YU *et al.*, 1990 *apud* RAMOS, 2007).

Togashi (2004), avaliando a restrição quantitativa em frangos de corte, observaram que os diferentes programas alimentares não influenciaram ($P > 0,05$) os ganhos de peso dos animais aos 21 dias de idade, já aos 45 dias de idade, a mesma autora verificou que houve diferença para o ganho de peso dos animais avaliados, onde os animais submetidos aos programas alimentares alcançaram peso vivo inferior aos do tratamento que recebeu ração à vontade. No entanto, Camacho *et al.* (2004), ao avaliarem o efeito da idade e da restrição alimentar e da suplementação com microelementos, indicaram que a restrição quantitativa, iniciada no 7º dia de idade com a suplementação levou a redução da mortalidade, dos problemas de patas e permitiu o crescimento compensatório aos 49 dias de idade. Da mesma forma, Sugeta (2002) evidenciou que a restrição alimentar mais severa (70% do consumo diário, do 8º até 14º dia de idade) afetou de forma negativa o desempenho das aves.

Furlan *et al.* (2001) e Leone *et al.* (2001), ao estudarem o desempenho produtivo de frangos de corte submetidos a diferentes programas de restrição alimentar, observaram que o ganho de peso, o peso vivo e o consumo de ração não foram influenciados estatisticamente pelos programas aplicados. Por outro lado, FURLAN *et al.* (2002) indicaram que a forma de arraçãoamento por 12 horas, tanto diurna quanto noturna, não se

mostrou satisfatória no manejo diário, uma vez que houve prejuízo no desempenho produtivo com menor peso vivo das aves.

Rosa *et al.* (1994) citam redução significativa do peso vivo nos grupos de aves que sofreram a restrição, mas estes programas não influenciaram no rendimento de carcaça e na composição química.

Trabalhando com diferentes programas de restrição alimentar Figueiredo *et al.* (1998) constataram diminuição do rendimento da carcaça dos frangos de corte em relação aos alimentados à vontade. Em contrapartida, Sugeta *et al.* (2002), estudando a restrição alimentar na segunda semana de vida das aves (8º ao 14º dia), relataram que frangos restritos a 30% do consumo diário dos animais alimentados à vontade não diferiram ($P > 0,05$) dos animais do tratamento que recebeu ração *ad libitum*. Já os frangos restritos em 70% do consumo diário, tiveram um peso de carcaça significativamente inferior ($P < 0,01$) ao dos outros dois tratamentos (restrito em 30% e *ad libitum*), evidenciando, assim, que a qualidade da carcaça foi influenciada negativamente, por esse programa ser muito severo (RAMOS, 2007).

No trabalho de Trocino *et al.* (2015) os animais que receberam restrição alimentar no período de 13 a 21 dias de idade apresentaram ganho compensatório no período de re-alimentação o que ocasionou redução na diferença de peso vivo e conversão alimentar quando comparados aos animais sem restrição. Entretanto, a restrição alimentar aumentou em 10% a ocorrência de *white striping*.

Dietas de baixa energia reduzem tanto a taxa de crescimento como a ocorrência de miopatias, similarmente a restrição alimentar pode reduzir a incidência de miopatias e doenças metabólicas por controle do crescimento inicial (DE JONG *et al.*, 2012; SAHRAEI, 2012; BUTZEN *et al.*, 2013).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

O presente trabalho teve como objetivos validar uma metodologia para diagnóstico *in vivo* da miopatia *wooden breast* através de análises de imagens ultrassonográficas, determinar o processo de crescimento, degeneração e regeneração celular do músculo *Pectoralis major*, bem como determinar o efeito de programas de restrição alimentar sobre a ocorrência das miopatias *wooden breast* e *white striping* em frangos de corte abatidos em diferentes idades e as consequências na qualidade da carne.

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1. Experimento 1

Avaliar o efeito das dietas com restrição alimentar (quantitativa e qualitativa) no desempenho zootécnico de frangos de corte

Determinar a ocorrência das miopatias peitorais (*wooden breast* e *white striping*) em frangos de corte submetidos a programas de restrição alimentar.

Correlacionar as medidas ultrassonográficas (ecogenicidade e profundidade) do peito com a severidade da miopatia *wooden breast* em frangos de corte e, assim, propor uma metodologia para diagnóstico *in vivo* desta lesão.

Analisar as características da qualidade da carne (pH, cor, capacidade de retenção de água, força de deformação, perda por cocção e força de cisalhamento) de peitos de frangos de corte acometidos com diferentes graus da miopatia *wooden breast* submetidos a programas de restrição alimentar.

3.2.2. Experimento 2

Avaliar o processo de crescimento, degeneração e regeneração do músculo *Pectoralis major* de frangos de corte de rápido crescimento.

Analisar as medidas histomorfométricas de diâmetro e densidade da fibra muscular, espessura do endomísio e perimísio, densidade de pequenos vasos e volume parcial do

tecido muscular em frangos de corte aos 21 e 49 dias de idade, com diferentes graus de severidade da miopatia *wooden breast*.

Avaliar os marcadores bioquímicos séricos de lesão muscular ALT, AST, CK e LDH de frangos de corte aos 21 e 49 dias de idade acometidos com a miopatia *wooden breast*.

3.2.3. Experimento 3

Analisar a população das células miogênicas MyoD, Myf-5 e Pax7, ativas e não ativas envolvidas no processo de regeneração muscular em frangos de corte acometidos com a miopatia *wooden breast*.

Identificar e quantificar, através do uso de anticorpos imunomarcadores, a proliferação de colágeno no músculo *Pectoralis major* de frangos de corte com *wooden breast*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Para elaboração desta tese, foram realizados 2 experimentos.

O primeiro experimento foi conduzido entre os meses de setembro e outubro de 2016, gerando os artigos 1 e 2. O alojamento e abate dos animais foram realizados no Aviário de Ensino e Pesquisa e, as análises laboratoriais, no Centro de Ensino e Pesquisa em Tecnologia de Carnes, ambos localizados na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

O segundo experimento foi realizado durante o período de “Doutorado Sanduíche”, entre os meses de abril a setembro de 2017, na Auburn University – Auburn, Alabama, Estados Unidos, no Poultry Science Department, sob supervisão da Dra. Jéssica Starkey, o qual gerou o terceiro artigo desta tese.

Os referidos artigos foram redigidos de acordo com as normas da revista Poultry Science, cujas normas para publicação encontram-se em anexo.