

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

ALISSON RODRIGO DE OLIVEIRA

**EXPRESSÃO DE MMP-2, MMP-9 E MT1-MMP DURANTE O DESENVOLVIMENTO
MUSCULAR DE PEITO EM EMBRIÕES DE GALINHAS**

PONTA GROSSA

2025

ALISSON RODRIGO DE OLIVEIRA

**EXPRESSÃO DE MMP-2, MMP-9 E MT1-MMP DURANTE O DESENVOLVIMENTO
MUSCULAR DE PEITO EM EMBRIÕES DE GALINHAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito para a obtenção do título de mestre em Ciências Biomédicas, área de concentração em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. José Rosa Gomes
Coorientadora: Prof. Dra. Maria Albertina

PONTA GROSSA

2025

O48 Oliveira, Alisson Rodrigo de
Expressão de MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP Durante o Desenvolvimento Muscular de Peito em Embriões de Galinhas / Alisson Rodrigo de Oliveira. Ponta Grossa, 2025.
51 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas - Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. José Rosa Gomes.
Coorientadora: Profa. Dra. Maria Albertina de Miranda Soares.

1. Músculo. 2. Proteases. 3. Desenvolvimento. I. Gomes, José Rosa. II. Soares, Maria Albertina de Miranda. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Biologia Celular e Molecular. IV.T.

CDD: 610.28

ALISSON RODRIGO DE OLIVEIRA

EXPRESSÃO DE MMP-2, MMP-9 E MT1-MMP DURANTE O DESENVOLVIMENTO
MUSCULAR DE PEITO EM EMBRIÕES DE GALINHAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito para a obtenção do título de mestre em Ciências Biomédicas, área de concentração em Biologia Celular e Molecular.

Ponta Grossa, 14 de fevereiro de 2025.



Prof. Dr. José Rosa Gomes - Orientador
Doutor em Biologia Buco-Dental
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Documento assinado digitalmente
 CLAUDIA DOS SANTOS MERMELSTEIN
Data: 20/02/2025 15:40:36-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dra. Claudia dos Santos Mermelstein
Doutora em Ciências Biológicas – Biofísica
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Documento assinado digitalmente
 MICHELE DIETRICH MOURA COSTA
Data: 20/02/2025 23:45:56-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dra. Michele Dietrich Moura Costa
Doutora em Biologia Celular e Molecular
Universidade Estadual de Ponta Grossa

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por me conceder discernimento para as escolhas corretas durante minha vida, pela força e tranquilidade ao enfrentar momentos de dificuldades.

Aos meus queridos orientadores Prof. Dr. José Rosa Gomes e Prof. Dra. Maria Albertina de Miranda Soares pelas oportunidades concedidas e inestimável conhecimento compartilhado.

À minha mãe Selma Obinger por toda dedicação, carinho e apoio durante minha caminhada.

Ao meu companheiro Gabriel Antunes Sarafim por todos os momentos de apoio e incentivo que me permitiram enfrentar e superar todos os desafios durante a realização deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas de curso que, ao trocar experiências e conhecimentos, me permitiram aprender mais.

Aos demais professores que não medem esforços ao passarem seus conhecimentos das mais variadas áreas.

Àqueles não citados nestes parágrafos, mas que de alguma forma colaboraram em alguma medida para a realização deste trabalho.

Por fim, sou imensamente grato à Universidade Estadual de Ponta Grossa por todas as oportunidades que fizeram parte de minha formação, não só como pesquisador, mas também como ser humano, e à CAPES pela bolsa que me permitiu me dedicar inteiramente à pesquisa e desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Em vertebrados, os músculos estriados esqueléticos se originam a partir das bordas epiteliais do dermomiótomo, uma região dos somitos, a partir da diferenciação de mioblastos mononucleados. Os mioblastos se fusionam formando miotubos multinucleados que começam a expressar proteínas específicas de músculo. Embora se saiba que as metaloproteinases estão envolvidas durante a morfogênese de diferentes órgãos e tecidos, há poucos estudos *in vivo* demonstrando sua expressão durante a formação do músculo estriado esquelético. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi verificar se há expressão de metaloproteinases 2, 9 e MT1-MMP durante o desenvolvimento do músculo peitoral em galinhas nos tempos de E11, E15 e E19 dias de incubação. Para isso, foram utilizados ovos fertilizados, doados pela Granja Econômica Avícola LTDA (Carambeí-PR), mantidos em incubadora por 11, 15 e 19 dias. Nos tempos analisados, os embriões foram dissecados e parte do músculo peitoral retirado foi mantido em cultivo por 24h em meio DMEM condicionado (sem soro fetal bovino) e parte foi fixado. As amostras foram submetidas a métodos de coloração por Tricômico de Masson, imunofluorescência para beta-actina, zimografia, incluindo testes de inibição e imuno-histoquímica para as MMPs. A coloração com Tricômico de Masson evidenciou as fases morfológicas da diferenciação, a partir dos mioblastos até a formação das fibras musculares. A imunofluorescência demonstrou mudanças no padrão de distribuição da actina no citoplasma das células, ao longo dos estágios analisados. A zimografia mostrou bandas de atividade proteolítica acima de 55 kDa sugestivas de MMP-2 e confirmadas pelos testes de inibição de proteases que, além de MMP-2, mostraram haver expressão de serino proteases nas amostras. A imuno-histoquímica detectou a expressão de MMP-2 e MT1-MMP em todos os tempos, não evidenciando a presença de MMP-9. Conclui-se, portanto, que as proteases MMP-2, MT1-MMP e serino proteases são expressas durante as fases de diferenciação muscular em embriões de galinha.

Palavras-chave: músculo; proteases; desenvolvimento.

ABSTRACT

In vertebrates, striated skeletal muscles originate from the epithelial borders of the dermomyotome, a region of the somites, through the differentiation of mononucleated myoblasts. The myoblasts fuse to form multinucleated myotubes that begin to express muscle-specific proteins. Although it is known that metalloproteinases are involved in the morphogenesis of different organs and tissues, there are few *in vivo* studies demonstrating their expression during the formation of striated skeletal muscle. Thus, the aim of this study was to verify whether there is expression of metalloproteinases 2, 9 and MT1-MMP during the development of the pectoral muscle in chickens at E11, E15 and E19 days of incubation. For this purpose, fertilized eggs donated by Granja Econômica Avícola LTDA (Carambeí-PR) were used and kept in an incubator for 11, 15 and 19 days. At the analyzed times, the embryos were dissected and part of the removed pectoral muscle was kept in culture for 24h in conditioned DMEM medium (without fetal bovine serum) and part was fixed. The samples were subjected to Masson's Trichome staining, immunofluorescence for beta-actin, zymography, including inhibition tests and immunohistochemistry for MMPs. Masson's Trichome staining evidenced the morphological phases of differentiation, from myoblasts to the formation of muscle fibers. Immunofluorescence demonstrated changes in the actin distribution pattern in the cytoplasm of the cells, throughout the analyzed stages. Zymography showed bands of proteolytic activity above 55 kDa suggestive of MMP-2 and confirmed by protease inhibition tests that, in addition to MMP-2, showed expression of serine proteases in the samples. Immunohistochemistry detected the expression of MMP-2 and MT1-MMP at all time points, but did not show the presence of MMP-9. It is therefore concluded that the proteases MMP-2, MT1-MMP and serine proteases are expressed during the muscle differentiation phases in chicken embryos.

Keywords: muscle; proteases; development.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Fibras musculares estriadas esqueléticas.....	14
Figura 2 Representação da estrutura de um sarcômero	15
Figura 3 Representação das etapas da miogênese em galinhas	17
Figura 4 Esquema da Estrutura de MMPs.....	19
Figura 5 Coloração com Tricômico de Masson	32
Figura 6 Imunofluorescência para β -actina.....	33
Figura 7 Análise do perfil proteico em SDS-PAGE relevado com prata.....	34
Figura 8 Zimografia	35
Figura 9 Testes de inibição de proteases	36
Figura 10 Imuno-histoquímica.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3,4-DCI	3,4-Dicloroisocumarina
AgNO ₃	Nitrato de Prata
Arg	Arginina
ATP	Adenosina Trifosfato
BMP	Proteína Morfogenética Óssea
BSA	Albumina do Soro Bovino
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
Cys	Cisteína
DAB	3,3 Diaminobenzidina
DAPI	4,6-Diamidino-2-fenilindol
DFP	Diisopropilfluorofosfato
DMEM	Meio Eagle Modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto
HCN	Cianeto de Hidrogênio
His	Histidina
KCl	Cloreto de Potássio
kDa	Quilodaltons
KH ₂ PO ₄	Fosfato de Potássio Monobásico
MMPs	Metaloproteinases
MRFs	Fatores de Regulação Miogênica
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de Sódio Dibásico
NaOH	Hidróxido de Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NEM	N-Etil-Maleimida
NH ₄ OH	Hidróxido de Amônio
PBS	Salina Tamponada com Fosfato

PCMB	p-clorimercuriobenzoato
Phe	Fenilalanina
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonila
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio
Ser	Serina
Shh	Sonic Hedgehog
TIMPs	Inibidores Teciduais de Metaloproteinase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVOS.....	12
2.1 OBJETIVO GERAL	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
3.1 HISTOLOGIA DA CÉLULA MUSCULAR ESTRIADA ESQUELÉTICA DIFERENCIADA.....	13
3.2 MORFOGÊNESE DO TECIDO MUSCULAR EM VERTEBRADOS.....	15
3.3 PROTEASES	17
3.4 METALOPROTEINASES	18
3.5 METALOPROTEASES E MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO.....	21
4 MATERIAL E MÉTODO	23
4.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS OVOS	23
4.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	23
4.2.1 Cálculo do tamanho amostral.....	23
4.2.2 Tempos avaliados.....	24
4.2.3 Coleta das amostras.....	24
4.3 CULTIVO DAS AMOSTRAS DE MÚSCULO	25
4.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL DO MEIO DE CULTIVO	25
4.5 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....	26
4.6 COLORAÇÃO POR TRICÔMICO DE MASSON	26
4.7 IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA B-ACTINA	27
4.8 GEL DE PROTEÍNA SDS-PAGE.....	28
4.8.1 Coloração do gel de proteína SDS-PAGE por prata	28

4.9 ZIMOGRRAFIA.....	29
4.10 TESTE DE INIBIÇÃO DE PROTEASES	29
4.11 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA MMP-2, 9 E MT1.....	30
5 RESULTADOS	31
5.1 COLORAÇÃO POR TRICÔMICO DE MASSON	31
5.2 IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA B-ACTINA	32
5.3 GEL DE PROTEÍNA SDS-PAGE.....	33
5.4 ZIMOGRRAFIA.....	34
5.5 TESTES DE INIBIÇÃO	35
5.6 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA MMP-2, MMP-9 E MT1-MMP	36
6 DISCUSSÃO.....	38
7 CONCLUSÕES.....	44
REFERÊNCIAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

O músculo estriado esquelético é um tecido formado por células alongadas e especializadas, cuja principal função é a contração (Mukund; Subramaniam, 2019). Em galinhas, a literatura mostra que os músculos se originam a partir de somitos, que se formam ao lado da notocorda e tubo neural com 20 horas de incubação e que logo se subdividem em duas regiões: o esclerótomo e o dermomiótomo (Porquié, 2004; Scaal; Marcelle, 2018). A diferenciação muscular em vertebrados ocorre em várias etapas morfolologicamente já definidas, separadas em duas fases: uma fase embrionária, que ocorre entre os dias E3 e E7 em galinhas, e uma fase fetal, que ocorre a partir do dia E8 em galinhas (Chal; Pourquié, 2017). A primeira fase se inicia quando células do dermomiótomo se diferenciam em mioblastos mononucleados. Os mioblastos se fusionam para formar os miotubos multinucleados e por fim, uma segunda fase de fusão celular (também chamada de fase fetal) ocorre entre novos mioblastos mononucleados e miotubos multinucleados, resultando no crescimento dos miotubos e diferenciação em células ou fibras musculares (Costa; Jurberg; Mermelstein, 2021). Durante o desenvolvimento embrionário, metaloproteínases têm sido relacionadas com processos importantes como os de remodelação e morfogênese de tecidos (Duong; Erickson, 2004). Metaloproteínases (MMPs) são enzimas responsáveis pela degradação de componentes da matriz extracelular, permitindo a remodelação tecidual, de forma que possibilitam aos tecidos realizarem processos como proliferação, diferenciação, apoptose, angiogênese, reparo de tecidos e resposta imune, processos que resultam na morfogênese funcional dos sistemas (Cui; Hu; Khalil, 2017). Porém, ainda existem poucos estudos *in vivo* demonstrando a possível expressão dessas proteases durante as diferentes fases da morfogênese do tecido muscular estriado esquelético em galinhas, o que justifica o presente estudo, no qual se analisou a expressão de MMPs em amostras do músculo peitoral de embriões de galinhas nos tempos de 11 (E11), 15 (E15) e 19 (E19) dias de incubação, durante a fase secundária, ou fetal, da miogênese, escolhidos com base na literatura.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar se há expressão de MMP-2, MMP-9 e MT1-MMPs durante a diferenciação do músculo peitoral *in vivo* durante o estágio secundário, ou fetal, do desenvolvimento de embriões de galinhas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a morfologia das células musculares, nos diferentes tempos de incubação, a fim de identificar as etapas de diferenciação muscular por coloração de Masson;
- Verificar a distribuição da proteína β -actina durante as fases de diferenciação muscular utilizando imunofluorescência;
- Detectar MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP no músculo do peito de embrião de galinha nos tempos de 11, 15 e 19 dias de desenvolvimento por zimografia e imunohistoquímica;
- Correlacionar os eventos da morfogênese de músculo esquelético em galinhas com a expressão das metaloproteinases nos tempos avaliados.

3 REVISÃO DE LITERATURA

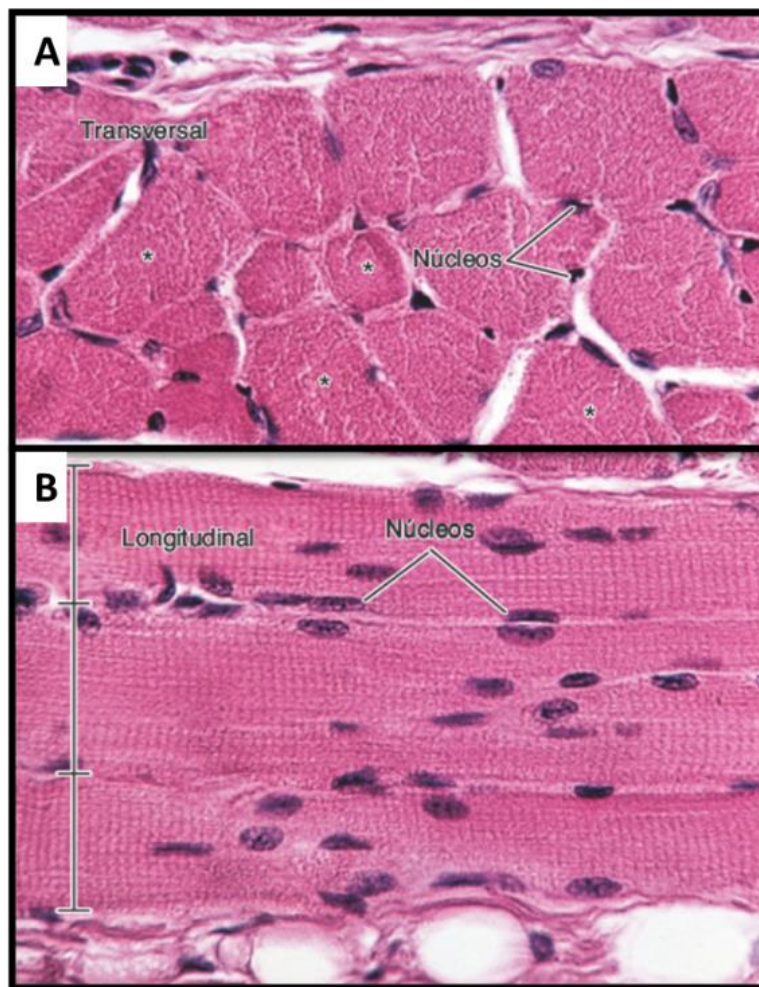
3.1 HISTOLOGIA DA CÉLULA MUSCULAR ESTRIADA ESQUELÉTICA DIFERENCIADA

O tecido muscular estriado esquelético é formado por um conjunto de células multinucleadas alongadas, dispostas em arranjos paralelos, responsáveis pela contração muscular. As células que compõem o músculo estriado esquelético são também denominadas de fibras musculares (figura 1). Os núcleos dessas células são elípticos e localizados na periferia das células (Mukund; Subramaniam, 2019).

O músculo estriado esquelético é envolvido por uma camada de tecido conjuntivo denso composto basicamente por fibras colágenas por onde passam vasos e nervos denominado de epimísio, do qual partem septos que formam o perimísio, separando os feixes de células musculares. Cada célula muscular é envolvida por uma delicada camada de tecido conjuntivo denominada de endomísio. O tecido conjuntivo presente no músculo tem como função unir as células musculares e transmitir a força gerada pela contração muscular, além de conter capilares sanguíneos e nervos (Exeter; Connell, 2010). As células do tecido muscular estriado esquelético possuem estriações transversais que, quando observadas em microscópio de polarização, se apresentam como faixas claras e escuras. As faixas escuras são anisotrópicas e recebem o nome de bandas A (predominam os filamentos de miosina II), enquanto as faixas claras são isotrópicas e são denominadas de bandas I (filamentos de actina). Estas estriações ocorrem devido à presença de milhares de filamentos cilíndricos denominados de miofibrilas presentes nas células musculares. Cada miofibrila é composta por uma unidade repetida, denominada de sarcômero (figura 2). Os sarcômeros são constituídos de filamentos de actina (filamentos delgados) e filamentos de miosina II (filamentos espessos), além de outras proteínas estruturais e regulatórias, como, por exemplo, titina, tropomiosina, troponina, tropomodulina e nebulina. Os sarcômeros são delimitados por discos, ou linhas, Z, onde se ancoram os filamentos de actina. A região central dos sarcômeros é denominada de banda H, sendo formada por filamentos espessos que estão presos

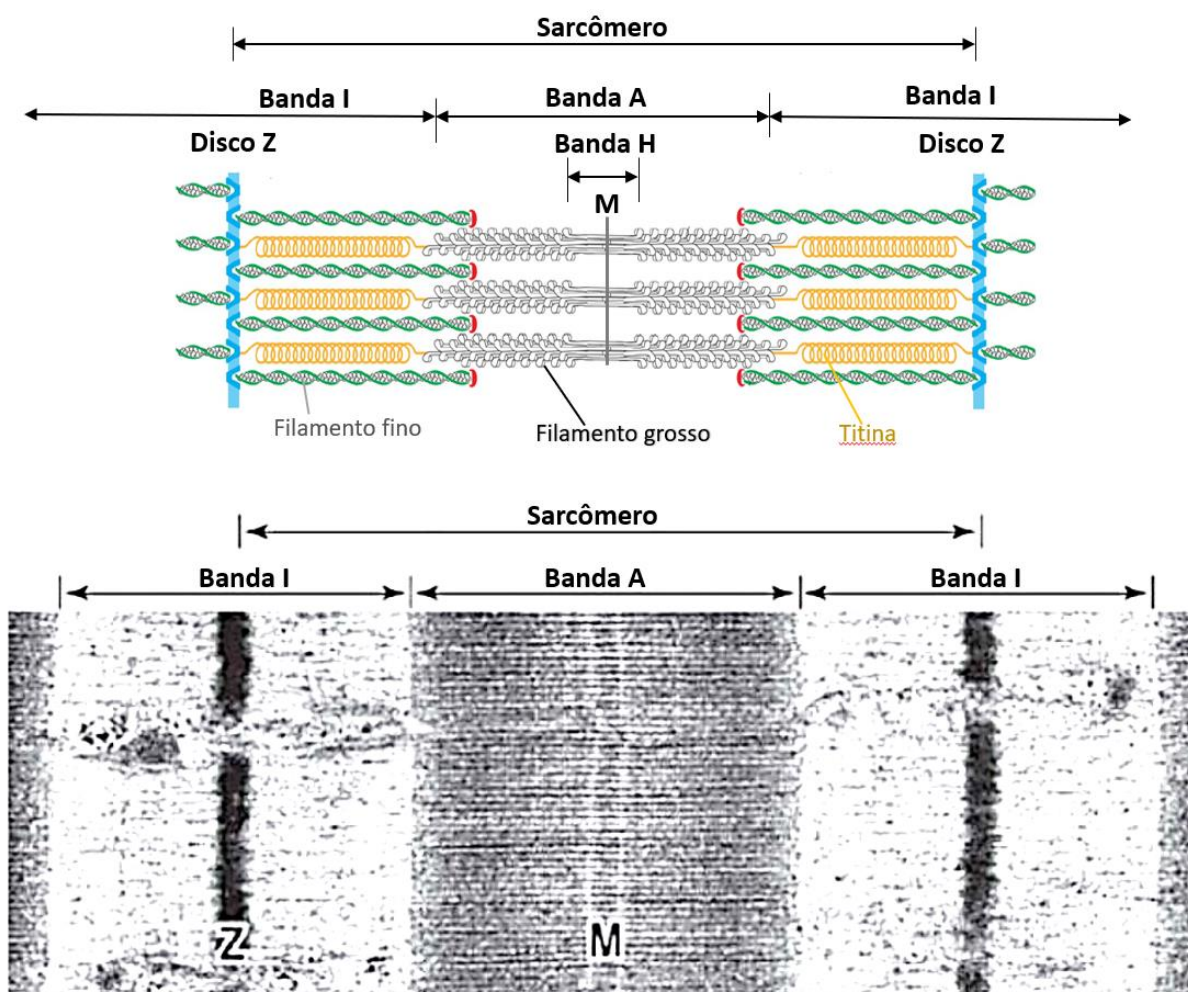
entre si por conjuntos de proteínas que formam o disco, ou linha, M (Henderson *et al.*, 2017).

Figura 1 Fibras musculares estriadas esqueléticas



Legenda: Cortes representativos de fibras musculares estriadas esqueléticas coradas por Hematoxilina e eosina. **A:** corte transversal, onde as fibras estão indicadas por asteriscos (*), os núcleos são dispostos na periferia das células. **B:** corte longitudinal, onde as fibras estão indicadas por barras. Também é possível visualizar as estrias transversais das fibras.
Fonte: adaptado de Junqueira e Carneiro (2023).

Figura 2 Representação da estrutura de um sarcômero



Legenda: **A:** Representação esquemática de um sarcômero ilustrando os principais sistemas de filamentos: Filamentos finos de actina (cinza), filamentos grossos de miosina II (branco). Os limites laterais do sarcômero são os discos Z. As bandas I localizam-se em ambos os lados do disco Z e são regiões onde os filamentos finos não se sobrepõem aos filamentos grossos. A região da banda A contém filamentos finos e grossos. A banda M se localiza dentro da banda H. **B:** Eletromicrografia de sarcômero do músculo estriado esquelético.

Fonte: adaptado de Henderson *et al.* (2017); Alberts *et al.* (2017).

3.2 MORFOGÊNESE DO TECIDO MUSCULAR EM VERTEBRADOS

Os músculos esqueléticos de vertebrados se originam dos somitos, que são estruturas formadas a partir do mesoderma paraxial (Scaal; Marcelle, 2018).

Em galinhas, os somitos se formam bilateralmente, ao lado do tubo neural e notocorda, a partir do mesoderma intraembrionário paraxial, após 20 horas de

incubação. Os somitos são formados periodicamente aos pares a cada 90 minutos de incubação. Do dia 1 ao dia 5 de desenvolvimento, 52 pares de somitos são formados (Porquié, 2004). Após a sua formação, os somitos se subdividem em duas porções: o compartimento ventral mesenquimal denominado de esclerótomo, que dá origem ao esqueleto axial (coluna vertebral), e o compartimento dorsal mesenquimal denominado de dermomiótomo, que origina os músculos esqueléticos (Scaal; Marcelle, 2018).

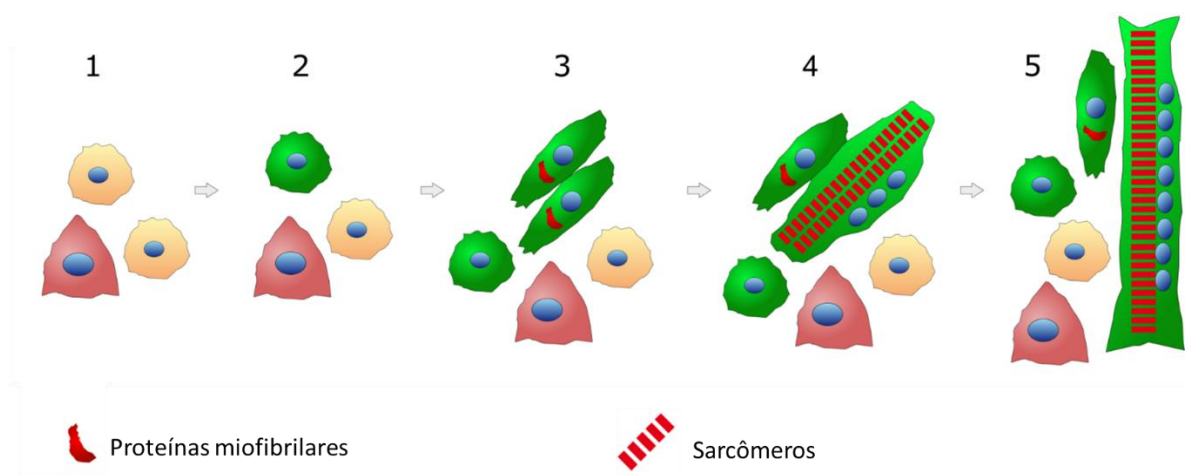
O dermomiótomo possui duas regiões, uma dorsomedial e uma ventrolateral. Os músculos epaxiais, que se localizam nas costelas e vértebras, são originados da região dorsomedial, enquanto que os músculos hipaxiais, que se localizam nos membros, surgem da região ventrolateral (Scaal; Marcelle, 2018).

Durante a morfogênese muscular, as células que surgem das bordas do dermomiótomo respondem a moléculas de vias de sinalização, como Wnt/Beta-Catenina, Sonic Hedgehog (Shh), Proteína Morfogenética Óssea (BMP) e Notch, produzidas pelas células que formam o tubo neural, o ectoderma superficial, a notocorda e o mesoderma da placa lateral. Essas vias de sinalização ativam, nas células do dermomiótomo, genes como MyoD e Myf5, que em conjunto com Myogenin e MRF4 são conhecidos como fatores reguladores miogênicos (MRFs). Essas moléculas são responsáveis por controlar a diferenciação do músculo esquelético, assim como a expressão de proteínas musculares e miofibrilares (Costa; Jurberg; Mermelstein, 2021).

A miogênese em galinhas pode ser separada em duas fases: embrionária ou fase primária, entre os dias E3 e E7, e fase fetal ou secundária, que ocorre a partir do dia E8. Em aves, a primeira fase da diferenciação muscular ocorre quando as células do dermomiótomo se diferenciam em mioblastos mononucleados, ou pré-mioblastos (figura 3), que, após proliferarem, saem do ciclo celular. Eles se alongam, formando mioblastos bipolares e se alinham de ponta a ponta uns aos outros e se fundem, formando miotubos multinucleados. Inicialmente, os núcleos dessas células localizam-se no centro e depois migram para a periferia. Uma segunda fase de fusão celular, também conhecida como fase fetal, ocorre entre novos mioblastos mononucleados e miotubos multinucleados que resulta no crescimento dos miotubos. Os miotubos iniciam a síntese das proteínas miofibrilares como actina, miosina, troponinas, tropomiosinas, alfa-actina, nebulina, desmina, miomesina e

tropomodulina, que se organizam em miofibrilas, o que caracteriza a célula muscular funcional (Chal; Pourquoié, 2017; Costa; Jurberg; Mermelstein, 2021; Scaal; Marcelle, 2018).

Figura 3 Representação das etapas da miogênese em galinhas



Legenda: Representação da miogênese esquelética em galinhas, mostrando as células possíveis de serem visualizadas em modelo de cultivo de músculo em desenvolvimento. **1:** Os pré-mioblastos, representados em amarelo, são células mononucleadas (núcleos representados em azul) arredondadas que não expressam proteínas miofibrilares. **2, 3:** Após sua retirada do ciclo celular (células representadas em verde), se alongam e começam expressar proteínas miofibrilares, se alinhando com outros mioblastos. **4:** Fusão dos mioblastos formando miotubos multinucleados com miofibrilas (formadas por sarcômeros). **5:** crescimento dos miotubos a partir de fusão de miotubos com mioblastos. Fibroblastos (células triangulares e vermelhas) também podem ser visualizados em todas as etapas da miogênese em culturas obtidas a partir de tecido muscular de galinhas.

Fonte: adaptado de Costa, Jurberg e Mermelstein (2021).

3.3 PROTEASES

As proteases, também conhecidas como peptidases ou enzimas proteolíticas, catalisam a hidrólise de ligações peptídicas em proteínas alvo (substratos), desempenhando diversas funções. Elas são classificadas de acordo com o resíduo de aminoácido reativo que atua dentro do sítio catalítico (serina, cisteína, aspartil, treonina ou glutamil proteases), ou de acordo com o cofator para a atividade catalítica (metaloproteínases). Elas podem, ainda, ser classificadas como endopeptidases, quando clivam ligações peptídicas em regiões internas da cadeia polipeptídica, ou como exopeptidases, quando a clivagem ocorre próxima das extremidades das

cadeias polipeptídicas. As proteases atuam em diferentes mecanismos biológicos por meio da regulação da localização e atividade de muitas proteínas, modulação das interações proteína-proteína, criação de novas moléculas bioativas e contribuindo para o processamento da informação celular na replicação e transcrição do DNA. Dessa forma, elas influenciam na proliferação e diferenciação celular, morfogênese e remodelação tecidual, angiogênese, neurogênese, ovulação, fertilização, reparo de feridas, coagulação sanguínea, inflamação, imunidade, autofagia, senescência, necrose e apoptose. A atividade das proteases é controlada por vários mecanismos, que incluem a regulação da expressão de seus genes, ativação de suas pró-formas (zimogênios), autocataliticamente ou por outras proteases, modificações pós-traducionais, como glicosilação e fosforilação, e atuação de inibidores e cofatores (López-Otín; Bond, 2008; Carroll *et al.*, 2021; Koistinen *et al.*, 2023).

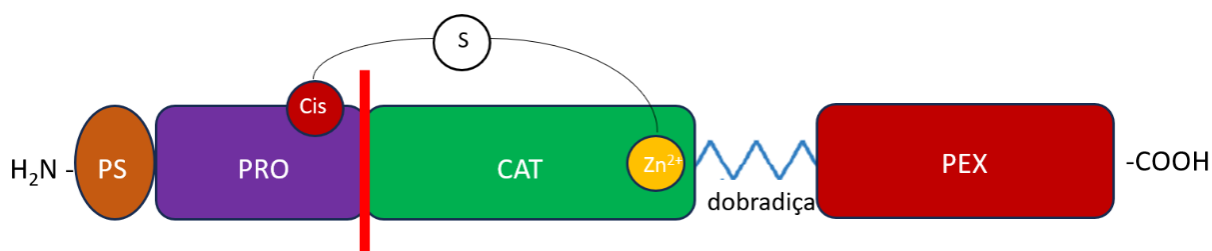
3.4 METALOPROTEINASES

Entre as famílias de proteases, as MMPs são endopeptidases dependentes de zinco, que possuem como principal função a degradação dos componentes da matriz extracelular, levando à remodelação dos tecidos. Essa remodelação dos tecidos permite que haja diferenciação celular, apoptose, angiogênese e reparo tecidual (Cui; Hu; Khalil, 2017).

Tipicamente, como ilustrado na figura 4, as MMPs são proteínas compostas, por um peptídeo sinal N-terminal, conhecido como pré-domínio, de comprimento variável; um pró-domínio, que consiste em cerca de 80 resíduos de aminoácidos, que mantém as MMPs inativas até ser removido; um domínio catalítico dependente de zinco que consiste de 160 a 170 resíduos de aminoácidos; um peptídeo ligante flexível rico em prolina, conhecido como região de dobradiça, que consiste entre 14 e 69 aminoácidos; e um domínio semelhante à hemopexina de cerca de 200 a 210 resíduos. O pró-domínio das MMPs possui um grupo cisteína sulfidríla responsável por quelar o zinco no sítio ativo, mantendo as MMPs em sua forma zimogênica (pró-MMPs). Um íon zinco se liga ao sítio ativo do domínio catalítico por três resíduos de histidina e três íons cálcio. O ácido glutâmico adjacente ao primeiro resíduo de histidina é essencial para o processo catalítico. Um segundo íon zinco encontrado no

domínio catalítico possui função estrutural, mantendo a conformação da proteína. A região de dobradiça é responsável pela estabilidade enzimática, influenciando a atividade colagenolítica da enzima (Radzki *et al.*, 2024).

Figura 4 Esquema da Estrutura de MMPs



Legenda: Representação esquemática da estrutura das MMPs. **PS** – peptídeo sinal (pré-domínio); **PRO** – pró-domínio; **CAT** – domínio catalítico; **Região de dobradiça** – sítio do peptídeo ligante flexível. **PEX** – domínio semelhante à hemopexina; **Cis** – grupo cisteína sulfidríla; **S** – interruptor de cisteína; **Zn²⁺** - sítio de ligação ao zinco; **Linha vermelha vertical**: região de clivagem. Fonte: adaptado de RADZKI *et al.* (2024).

A ativação das MMPs pode ocorrer de diversas maneiras, por exemplo, quando o resíduo de cisteína é clivado por outras enzimas proteolíticas (como serino proteases, endopeptidase furina e plasmina), levando à liberação do pró-domínio e consequente ativação da MMP. Além disso, uma MMP também pode ser ativada por outras MMMPs, como as MMPs contendo furina, como MMP-11, 21, 28 e MT-MMPs (metaloproteinases transmembranares) que têm uma sequência de reconhecimento de pró-proteína convertase semelhante à furina no C-terminal do pró-peptídeo (Corcoran *et al.*, 1996; Cui; Hu; Khalil, 2017).

MT-MMPs sofrem ativação intracelular pela furina e depois ativam outras MMPs. As MMPs também podem ser ativadas por vários agentes físico-químicos, como calor, baixo pH, agentes modificadores de tiol, como acetato de 4-aminofenilmercúrio, cloreto de mercúrio, N-etilmaleimida, glutatona oxidada e dodecilsulfato de sódio. A maioria desses ativadores interrompe a coordenação cisteína-Zn²⁺. Outros ativadores de MMPs incluem a plasmina, que ativa a MMP-9. Além disso, tanto a MMP-3 quanto o ácido hipocloroso ativam a MMP-7, a qual ativa a MMP-1 (Corcoran *et al.*, 1996; Cui; Hu; Khalil, 2017).

A regulação da atividade das MMPs envolve inibidores teciduais de

metaloproteinase (TIMPs). Os TIMPs consistem de peptídeos com 184 a 194 aminoácidos. São compostos por um subdomínio N-terminal e um subdomínio C-terminal. Os domínios N-terminal e C-terminal contêm três ligações dissulfeto conservadas. O domínio N-terminal se dobra como uma unidade independente com atividade inibitória de MMP. Essa inibição ocorre pela ligação entre o domínio N-terminal e o sítio catalítico das MMPs, quelando o átomo de zinco (Nagase; Visse; Murphy, 2006). As MMPs também podem ser inibidas utilizando-se reagentes inibidores quelantes de íons metálicos como 1,10 – Fenantrolina (Beek *et al.*, 2012) e pelo EDTA (Rao; Tanksale; Ghatge; Deshpande, 1998).

As MMPs são classificadas com base em sua estrutura e especificidade de substrato. As collagenases incluem MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP-18. As gelatinases compreendem a MMP-2 e MMP-9, enquanto que as estromelinas incluem a MMP-3, MMP-10 e MMP-11. Entre as matrilisinas estão MMP-7 e MMP-26. As transmembranares são a MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 e MMP-25. Além disso, há grupos não classificados de MMPs, que incluem MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-23, MMP-27 e MMP-28 (Nagase; Visse; Murphy, 2006).

A metaloproteinase 2 (MMP-2) é também conhecida como gelatinase A. Esta protease é capaz de clivar um amplo espectro de substratos que incluem componentes da matriz extracelular, como colágenos do tipo I, IV, V, VII, X, XI, fibronectina e elastinas, além de mediadores metabólicos solúveis, como apolipoproteínas e citocinas (Duong; Erickson, 2004; Hardy; Hardy; Fernandez, 2018). A MMP-2 é expressa em uma ampla variedade de tipos celulares, como por exemplo em miócitos cardíacos, hepatócitos e células epiteliais (Solli *et al.*, 2013). No desenvolvimento, MMP-2 é descrita com função na morfogênese de vários órgãos e tecidos, como cerebelo (Verslegers *et al.*, 2015), coração (Cai *et al.*, 2000), ossos (Mosig *et al.*, 2007), pulmões (Fukuda *et al.*, 2000) rins (Lelongt *et al.*, 2001) e no músculo estriado esquelético (Carmeli *et al.*, 2004).

A metaloproteinase 9 (MMP-9) pertence à família de gelatinases, sendo conhecida como gelatinase B, participando da degradação de componentes da matriz extracelular. Ela é capaz de degradar colágenos do tipo IV, V, XI e XVI durante a remodelação tecidual. A MMP-9 é secretada por vários tipos de células como, por exemplo, células epiteliais, macrófagos, fibroblastos e neutrófilos (Mondal *et al.*, 2020). Da mesma forma, MMP-9 também já foi detectada durante o desenvolvimento

do coração (Ratajska; Cleutjens, 2002), cérebro (Ethell; Ethell, 2007) e pulmões (Hendrix; Kheradmand, 2017).

A metaloproteinase 14 (MMP-14), também conhecida por MT1-MMP, é uma collagenase ligada à membrana que é capaz de degradar colágeno tipo I, II e III, fibronectina, laminina-1, -2, -4 e 5, fibrina e proteoglicanos. A MMP-14 também participa da ativação da MMP-2 por clivar a ligação desta com sua molécula inibidora, a TIMP-2. A MMP-14 também pode clivar proteínas como EphA2, CD44 e integrinas, envolvidas na interação célula-célula e na adesão entre célula e matriz (Snyman; Niesler, 2015). Esta protease é expressa em vários tipos celulares, como por exemplo em osteoblastos, condrócitos e células tumorais (Attur *et al.*, 2020). Além disso, a MMP-14 já foi descrita durante o desenvolvimento dos sistemas nervoso e cardiovascular (Moracho *et al.*, 2021) e do intestino (Camargo *et al.*, 2016).

3.5 METALOPROTEASES E MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO

Em relação ao músculo estriado esquelético, as MMPs regulam processos como reparo de lesões e inflamações, sendo essenciais para a regeneração das células musculares. Além disso, as MMPs e seus inibidores, as TIMPs, podem servir como biomarcadores para vários distúrbios musculares (Kumar *et al.*, 2022).

As metaloproteinases também estão relacionadas a doenças que afetam o tecido muscular como a distrofia muscular de Duchenne, sendo fundamentais na remodelação da matriz extracelular em pacientes com esta doença, que causa necrose e fibrose, levando à fraqueza muscular e aumento da rigidez. Esta doença é causada pela ausência da proteína distrofina. Em cães com distrofia muscular, foi demonstrado que a MMP-9 está relacionada com processos inflamatórios durante a degeneração muscular, enquanto que a MMP-2, ativada no endomísio de grupos de fibras em regeneração, está associada à remodelação da matriz extracelular durante a regeneração muscular e crescimento das fibras (Fukushima *et al.*, 2007; Chen; Li, 2009). Além disso, foi demonstrado em camundongos com distrofia muscular de Duchenne, em diferentes músculos, durante as fases de degeneração muscular (4 semanas nestes animais) e regeneração muscular (12 semanas nestes animais) a atividade de MMP-2 e MMP-9 relacionadas a remodelação e reparo tecidual que

ocorre nos músculos afetados por esta doença (Gaglianone et al., 2020; Gaglianone et al., 2021).

No músculo esquelético de ratos, em que os músculos sóleo e extensor longo dos dedos foram lesionados, foi demonstrada a expressão de MMP-2 e 9 durante o processo de regeneração muscular. Entretanto, a expressão de MMP-2 e MMP-9 depende do tipo do músculo e da fase de regeneração muscular (Zimowska et al., 2008).

Em camundongos, MMP-13 também apresenta importância na regeneração muscular, regulando a migração de células satélites após danos no tecido (Smith et al., 2020). Em ratos, durante o desenvolvimento embrionário, estudos *in vitro* correlacionaram a presença de algumas MMPs com a miogênese. Estes estudos correlacionam o envolvimento de diferentes MMPs, como MMP-7, MMP-2 e MT1-MMP, com a fusão de mioblastos (Alameddine, 2012). Além disso, estudos demonstraram que MMP-2 e MT1-MMP são coexpressos em linhagens de mioblastos de camundongos, porém somente MMP-2 é secretada e ativada no ambiente extracelular, enquanto que MMP-9, analisada em células musculares humanas e células de linhagem C2C12, é secretada apenas por mioblastos antes da formação de miotubos (Carmeli et al., 2004).

Belichenko et al (2009) demonstraram, por meio de método fluorométrico, a atividade de metaloproteinases na diferenciação do músculo esquelético em embriões de galinha com 10-11, 14-15 e 18-19 dias de incubação, porém não identificaram quais delas estariam envolvidas nesse processo, o que abre possibilidade de aprofundamento nos estudos das MMPs durante a morfogênese muscular. Conclui-se que os estudos envolvendo as metaloproteinases demonstram a relevância dessas enzimas em diferentes processos como crescimento, regeneração muscular, migração celular, organogênese, dentre outros. Contudo, embora os estudos *in vitro* forneçam informações importantes sobre as fases morfológicas da diferenciação muscular, ainda há poucos estudos *in vivo* demonstrando a expressão das MMPs, considerando a diversidade de músculos que formam o corpo dos vertebrados.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS OVOS

Ovos fertilizados de galinhas, *Gallus Gallus domesticus* (linhagem ROSS, lote 238-B Steklain), foram obtidos por meio de doação feita pela Granja Econômica Avícola Ltda, situada na cidade de Carambeí, PR. Após higienização com álcool etílico 70%, os ovos foram mantidos em incubadora automática (Eclo), com temperatura constante de 37,8°C e umidade de 60%, no Laboratório de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Bloco M, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), até o momento da eutanásia. Os experimentos foram realizados após a aprovação do Comitê de Ética Animal – CEUA – da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Processo CEUA/UEPG - 23.000028800-9).

4.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

4.2.1 Cálculo do tamanho amostral

O cálculo foi feito baseado em um trabalho anterior, no qual foi medida a altura de 30 vilosidades do intestino delgado de três fetos de galinha nas idades de 16 e 17 dias de vida intra-ovo. Essas medidas foram feitas por Araújo *et al.* (2024) usando o programa Image J (domínio público), sendo expressas em μm depois da calibração em pixel a partir de uma barra de 20 μm . As medidas foram importadas para o programa de domínio público Bioestat 5.3 (<http://www.mamiraua.org.br/downloads/programas/>). As medidas foram primeiramente testadas quanto à normalidade usando o teste de Shapiro-Wilk e posteriormente transformadas em raiz quadrada. Após, foram obtidos valores de estatística descritiva, os quais foram submetidos ao teste Z de duas amostras para obtenção dos dados amostrais de média e desvio padrão. Na sequência, essas informações foram submetidas ao teste *t* de amostras independentes para se chegar ao cálculo do

tamanho da amostra para cada tempo avaliado. Considerando as médias e desvios padrão da altura das vilosidades dos tempos avaliados, a bilateralidade do teste, a relação entre as amostras de 1:1, o poder do teste de 80% e o nível alfa de 0.05 de confiabilidade, o tamanho da amostra obtida foi de 3 animais/galinhas para cada tempo a ser avaliado, totalizando 9 animais.

4.2.2 Tempos avaliados

Os animais foram eutanasiados nos tempos de E11, E15 e E19 dias de desenvolvimento embrionário. Estes tempos foram escolhidos com base nos trabalhos de Possidonio *et al.* (2014), Belichenko *et al.* (2009) e na experiência a partir de trabalhos já realizados no laboratório de Biologia Celular e do Desenvolvimento (Camargo *et al.*, 2016; Paiva *et al.*, 2019). Todos os ovos, antes de serem colocados na incubadora, foram avaliados quanto a integridade da sua casca. Além disso, foram avaliados rotineiramente, durante o tempo de incubação, para verificar se os embriões estavam em crescimento ou morreram. Para isso, foi utilizado um ovoscópio. Os ovos cujos embriões estavam mortos foram substituídos.

4.2.3 Coleta das amostras

Os embriões foram removidos dos ovos dentro do fluxo laminar a partir da câmara de ar do ovo, após a casca ser quebrada. Eles foram transferidos para placa de petri e banhados em solução de PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 4,3 mM; KH₂PO₄ 1,47 mM, pH 7,4) estéril para retirada dos tecidos externos. Esse procedimento foi feito até que o embrião estivesse totalmente limpo. Na sequência, foram eutanasiados através de decapitação com o uso de tesoura cirúrgica (RESOLUÇÃO Nº 1000, DE 11 DE MAIO DE 2012: dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências; Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais - Conceitos e Procedimentos Recomendados) por serem animais que pesam menos de 100 gramas. Depois, os embriões foram dissecados utilizando material cirúrgico. Parte das amostras coletadas do músculo

peitoral foi cultivada em meio de cultivo, que foi utilizado para determinar a concentração de proteína total para posterior análise proteica por eletroforese SDS-PAGE e de proteases por zimografia. Parte das amostras do tecido coletado seguiu ainda para os métodos de imuno-histoquímica, imunofluorescência e coloração de Masson, conforme os procedimentos descritos a seguir.

4.3 CULTIVO DAS AMOSTRAS DE MÚSCULO

Fragmentos de músculo peitoral de três embriões nos diferentes tempos avaliados foram coletados e, após o tecido ser dissociado mecanicamente utilizando um bisturi, foram incubados por 24h em meio de cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) sem soro fetal bovino em placas de cultivo de 24 poços a 37° C (Gomes *et al.*, 2011). As amostras de cada animal, de cada tempo, foram incubadas em triplicata. Após, foi coletado 500 µL de meio de cultivo de cada poço, contendo fragmento de músculo peitoral, centrifugado por 1 minuto, a 6000 RPM e a porção líquida de cada amostra de meio, dos mesmos tempos, foi misturada em um microtubo de 2 mL.

4.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL DO MEIO DE CULTIVO

As amostras foram submetidas ao teste de Bradford (1976) para quantificação de proteína total. A curva padrão foi feita usando amostras de Albumina de Soro Bovino (BSA) nas concentrações de 0,015; 0,031; 0,062; 0,125; 0,25; 0,5 e 1 mg/mL em placas de cultivo de 96 poços. 20 µL das diferentes concentrações de BSA e das amostras do meio de cultivo nos diferentes tempos avaliados foram colocados em cada poço (em triplicata) e 200 µL do reagente de Bradford foi adicionado. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. Os valores de absorbância obtidos foram importados para o software Excel 2019 e a curva padrão e equação da reta foram geradas através dos valores obtidos pela absorbância das amostras de BSA. Utilizando a equação da reta gerada, foi estimada

a concentração de proteína total por μL do meio de cultivo onde estavam os fragmentos de músculo que posteriormente foi avaliado por eletroforese.

4.5 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Fragmentos de músculo foram coletados e imersos em Paraformaldeído 2% por 48h. As amostras foram então desidratadas em soluções com concentração crescente de álcool etílico (70% a 100%), por 60 minutos em cada solução, em temperatura ambiente. Foram então diafanizadas em Xilol, por 2 vezes, 30 minutos cada, em temperatura ambiente. Os fragmentos foram incluídos em Paraplast por 3 banhos de 1h cada e emblocados em Paraplast. De cada animal, cortes seriados de 7 μm foram obtidos e montados em seis lâminas silanizadas para imunofluorescência e imuno-histoquímica e duas lâminas foscas comuns para coloração de Masson, contendo três cortes por lâmina, de cada embrião e tempo avaliado.

4.6 COLORAÇÃO POR TRICÔMICO DE MASSON

Para coloração por Tricômico de Masson, os cortes foram desparafinizados em Xilol, 3 vezes, por 5 minutos cada, e reidratados em soluções decrescentes de álcool etílico (100% a 70%). Em seguida os cortes foram lavados em água destilada, 2 vezes cada. Em seguida foram banhados em Hematoxilina de Mayer por 5 minutos e lavados em água corrente por 5 minutos. Os cortes foram então banhados no corante Rouge (Fucsina ácida 0,3%; Orange G 0,1%; Ácido acético 1%) por 2 minutos e lavados em água destilada por 2 vezes. Em seguida, os cortes foram banhados em Ácido Fosfomolibdico 10% por 10 minutos e lavados em água destilada por 2 vezes. Os cortes foram banhados em Azul de Anilina 1% por 5 minutos e lavados em água destilada por 2 vezes. Os cortes então foram desidratados em estufa a 37°, imersos em Xilol e montados usando Permout e uma lamínula. As lâminas foram visualizadas em microscópio Olympus DP72, utilizando o programa CellSens para a captura das imagens. As análises foram feitas de forma visual, comparando as imagens obtidas.

4.7 IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA B-ACTINA

Os cortes foram desparafinizados em Xilol, 3 vezes, por 5 minutos cada, e reidratados em soluções decrescentes de álcool etílico (100% a 70%) por 2 minutos cada. Em seguida os cortes foram lavados em água destilada, 2 vezes, à temperatura ambiente. Foram então incubados em BSA 3%, por 1h, à temperatura ambiente, em câmara úmida. Em seguida, foram lavados em 1X PBS (NaCl 137mM; KCl 2,7mM; Na₂HPO₄ 4,3mM; KH₂PO₄ 1,47 mM, pH 7,4) por 3 vezes à temperatura ambiente. Após o bloqueio, os cortes foram incubados com anticorpo monoclonal anti β -actina de camundongo (BA3R, ThermoFisher Scientific, Cat. N° MA5-15739), na concentração de 1:500, preparado com 1XPBS/Triton X-100 0,1%, por 16h a 4° C, em câmara úmida. Em seguida, os cortes foram lavados em 1XPBS, 3 vezes, à temperatura ambiente. Os cortes foram incubados com anticorpo anti-imunoglobulinas de camundongo conjugado com Alexa488 (Life Technologies, Brasil, Cat. No A11059, Lote No 1832425), na concentração de 1:1000, preparado em BSA 1%, por 1 hora, à temperatura ambiente, em câmara úmida, no escuro. Em seguida, os cortes foram lavados em 1XPBS, 3 vezes, por 5 minutos cada, à temperatura ambiente, no escuro. O núcleo das células foi corado com DAPI (2 μ g/mL, Sigma-Aldrich, USA), por 30 minutos, à temperatura ambiente, em câmara úmida, no escuro. Os cortes foram lavados em 1XPBS, 3 vezes, à temperatura ambiente, e montados com lamínulas usando Fluorescence Mounting Medium (DAKO, USA), no escuro. O controle negativo da marcação por imunofluorescência foi feito utilizando-se 1XPBS em vez de anti β -actina no primeiro corte de cada lâmina. As demais condições da imunofluorescência não foram alteradas. As lâminas foram visualizadas em fotomicroscópio de epifluorescência (Leica, China), com filtros de excitação e emissão para a faixa de comprimento de onda do DAPI (461 nm - azul) e do Alexa488 (520 nm - verde), utilizando-se o software Leica Application Suite para a obtenção das imagens. As análises foram feitas de forma visual, comparando as imagens obtidas.

4.8 GEL DE PROTEÍNA SDS-PAGE

Um total de 0,5 µg de proteína total de cada amostra foi misturada em tampão Laemmli não reduzido (Tris HCl 0,25 M pH 6,8; SDS 8%; Glicerol 30%; azul de bromofenol 0,2%) e foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. A corrida eletroforética foi realizada a 4 °C. Inicialmente, a corrida foi realizada a 80 V por aproximadamente 15 minutos até as amostras chegarem ao gel de corrida. Depois disso, a tensão foi aumentada para 120 V para a realização da corrida por aproximadamente 2h e 30 min. Posteriormente, os géis foram corados com prata, conforme descrito adiante, até que as bandas de proteínas pudessem ficar visíveis. Os géis foram escaneados para registro da identificação da altura da atividade das proteases tendo como comparação um padrão de peso molecular *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Fermentas SM0671).

4.8.1 Coloração do gel de proteína SDS-PAGE por prata

Após a corrida eletroforética, os géis foram mantidos em metanol 50% sob agitação por 1h em temperatura ambiente. Em seguida, os géis foram banhados em solução de nitrato de prata preparado da seguinte forma: em um béquer foi dissolvido 0,8g de nitrato de prata (AgNO_3). Esta solução foi lentamente gotejada sobre uma solução de hidróxido de sódio e hidróxido de amônio (21 mL de NaOH 0,36%; 1,4 mL NH_4OH 30%) preparada previamente e o volume final da solução resultante foi completado para 100 mL com água destilada. Os géis foram banhados nesta solução por 20 minutos sob agitação lenta em temperatura ambiente. Em seguida os géis foram lavados em água destilada 4 vezes por 5 minutos cada. As bandas foram reveladas em solução de formaldeído (0,5 mL de ácido cítrico 1% e 50 µL de formaldeído PA em 100 mL de água destilada) até ficarem visíveis, em agitação lenta. Por fim, os géis foram lavados em água destilada e mantidos em solução de metanol 50%.

4.9 ZIMOGRRAFIA

Foram misturados 0,5 µg de proteína total de cada amostra em tampão Laemmli não reduzido e foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, contendo 5% de gelatina. A corrida eletroforética foi realizada a 4 °C. Inicialmente, a corrida foi realizada a 80 V por aproximadamente 15 minutos até as amostras chegarem ao gel de corrida. Depois disso, a tensão foi aumentada para 120 V para a realização da corrida por aproximadamente 2h e 30 min. Após a eletroforese, os géis foram lavados duas vezes (30 minutos cada) em 2% de Triton X-100 sob agitação e, em seguida foram imersos em tampão de ativação de enzimas (CaCl₂ 2M; Tris-HCl 1M) durante 16h a 37° C. Os géis foram então corados com Coomassie Blue até que as bandas de degradação de gelatina pudessem ser detectadas. Os géis foram escaneados para registro da identificação da altura da atividade das proteases tendo como comparação o padrão de peso molecular *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Fermentas SM0671). O controle positivo, para o qual foi utilizado amostra de intestino de rato de 25 dias após o nascimento, foi preparado conforme descrito por Reis, Soares e Gomes (2019) da seguinte forma: a amostra foi homogeneizada em tampão de extração (Tris-HCl 50mM pH 7,5, CaCl 5mM e NaCl 0,9%), centrifugada a 15.000g por 15min a 4°C e o sobrenadante coletado foi utilizado para a zimografia. Segundo os autores citados, o intestino de rato de 25 dias após o nascimento expressa metaloproteinase 9, na altura de 90 kDa.

4.10TESTE DE INIBIÇÃO DE PROTEASES

A fim de confirmar a presença de MMPs nos géis obtidos, testes de inibição foram realizados com adição ao tampão de ativação, de 1,10-Fenantrolina 0,5mM (inibidores de MMPs); Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) 0,5 mM (inibidor de MMPs); Fluoreto de Fenilmetilsulfonilo (PMSF) 2 mM (inibidor de serino proteases); Benzamidina 2 mM (inibidor de serino proteases do tipo tripsinas e quimiotripsinas) e N-Etil-Maleimida (NEM) 0,5 mM (inibidor de cisteíno proteases). As amostras foram mantidas no tampão de ativação com os inibidores por 16h a 37°C.

4.11 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA MMP-2, 9 E MT1

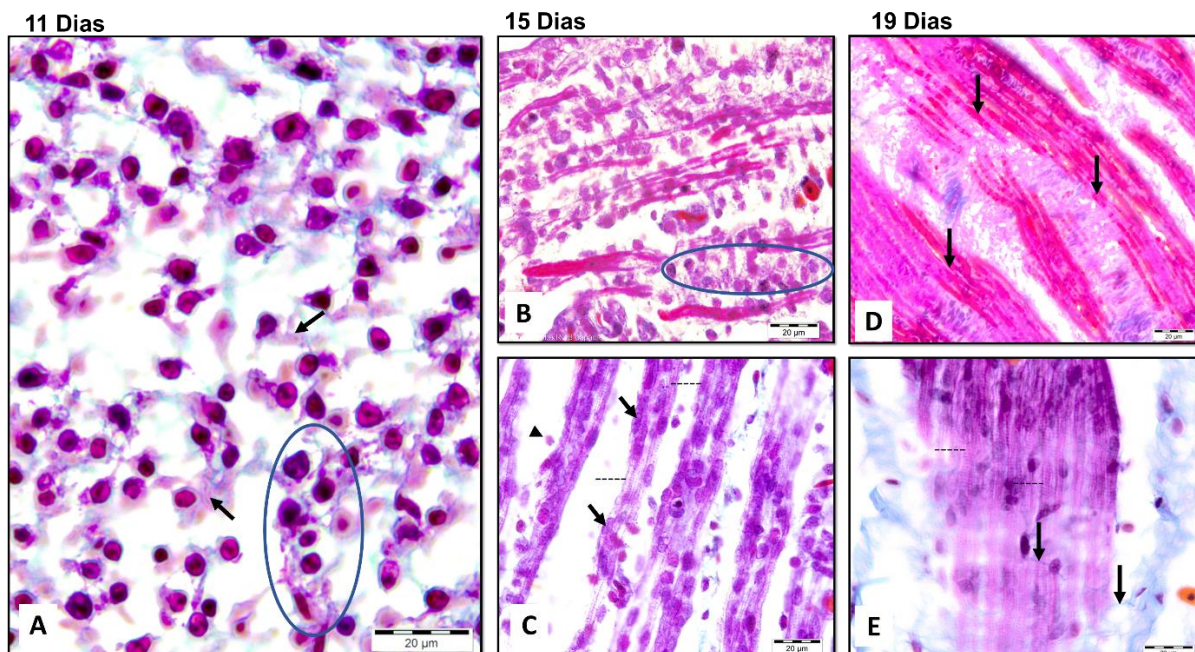
Os cortes foram desparafinizados em Xilol, 3 vezes, por 5 minutos cada, e reidratados em soluções decrescentes de álcool etílico (100% a 70%). Em seguida foram lavados em água destilada, 2 vezes, à temperatura ambiente. Para a recuperação antigênica, os cortes foram banhados em Ácido Cítrico 10 mM por 20 minutos a 95 °C, seguido por banho de água corrente por 5 minutos e dois banhos de água destilada. Para inibição da peroxidase endógena, os cortes foram banhados 3 vezes por 10 min cada em peróxido de hidrogênio 20 volumes. Em seguida foram lavados em água corrente por 5 minutos, seguido de banho em água destilada. Os cortes foram então incubados em BSA 3% por 1h, à temperatura ambiente, em câmara úmida para bloqueio de ligações inespecíficas. Em seguida, foram lavados em 1X PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 4,3 mM; KH₂PO₄ 1,47 mM, pH 7,4) por 3 vezes à temperatura ambiente. Após o bloqueio, os cortes foram incubados com anticorpo monoclonal anti MT1-MMP (Milipore MAB3317); com anticorpo monoclonal anti MMP-2 (Milipore MMP-2 MAB3308 lote: LV1482696) e com anticorpo monoclonal anti MMP-9 (Neomarkers MMP-9 AB-8 Mouse MAB MS – 820 – P lote: 820P403C) todos na concentração de 1:200 por 16h em câmara úmida à 4 °C. Os cortes foram então lavados em 1X PBS e incubados com anticorpo secundário usando o kit universal DAKO LSAB, por 30 minutos, a 37 °C. Foram então lavados novamente em 1XPBS e a marcação foi revelada por meio de incubação com um substrato da peroxidase, o 3,3 Diaminobenzidina (DAB) 3% (Sigma-Aldrich) preparado em 1XPBS/H₂O₂ 1,25%/DMSO 1,25%, por 5 minutos, à temperatura ambiente. Os cortes foram lavados em água destilada e contra-corados com Hematoxilina de Mayer por 1 minuto. Após a coloração, os cortes foram desidratados em estufa à 37 °C, imersos em Xilol e montados em lâminulas usando Permount. De cada lâmina, do primeiro corte, foi substituído o anticorpo primário por 1XPBS (controle negativo). Como controle positivo para MMP-9, foram utilizadas lâminas com cortes de cerebelo e de dente incisivo de rato. As lâminas foram visualizadas em microscópio Olympus DP72, utilizando o programa CellSens para a captura das imagens. As análises foram feitas de forma visual, qualitativa, comparando as imagens obtidas.

5 RESULTADOS

5.1 COLORAÇÃO POR TRICÔMICO DE MASSON

Na coloração com Tricômico de Masson (Figura 5), são demonstradas as fases morfológicas da diferenciação das células musculares. Em E11 (Figura 5 A), é possível observar agrupamentos de mioblastos com núcleo esférico (elipse) iniciando um estabelecimento intercelular através de projeções celulares (setas). Em E15 (Figuras 5 B, C), observa-se células com vários núcleos elípticos formando uma estrutura em forma de sincício (elipse). Observa-se também miotubos formados. Os núcleos dos miotubos se apresentam com uma morfologia elíptica (setas). Em algumas regiões do citoplasma podem ser detectadas estrias transversais evidentes (linhas tracejadas). Além disso, ainda podem ser observados mioblastos com núcleo arredondado (pontas de setas). Como pode ser visto nas figuras 5 D, em E19 dias de desenvolvimento, os miotubos se apresentam mais espessos, quando comparados com 15 dias, com regiões em forma de bastão no citoplasma com coloração vermelha mais forte (setas), indicando miofibrilas nascentes. A figura 5 E mostra estrias transversais (linhas tracejadas) assim como finas estruturas coradas de azul ramificando-se sobre células musculares (setas), que podem ser ramificações de fibras nervosas.

Figura 5 Coloração com Tricômico de Masson



Legenda: Coloração com Tricômico de Masson. **A:** E11 dias de incubação. As setas mostram as projeções celulares dos mioblastos, enquanto a elipse mostra mioblastos com núcleo esférico. **B:** E15 dias de incubação, a elipse mostra mioblastos em fusão formando um sincício. **C:** E15 dias de incubação. As setas mostram os núcleos elípticos, as linhas tracejadas mostram as estrias transversais e a ponta de seta mostra um mioblasto. **D:** E19 dias de incubação. As setas mostram a coloração vermelha onde se encontram as miofibrilas nascentes. **E:** E19 dias de incubação. As linhas tracejadas mostram estrias transversais, enquanto as setas podem mostrar extensões de fibras nervosas crescendo nas células musculares. Barra de escala: 20 µm.

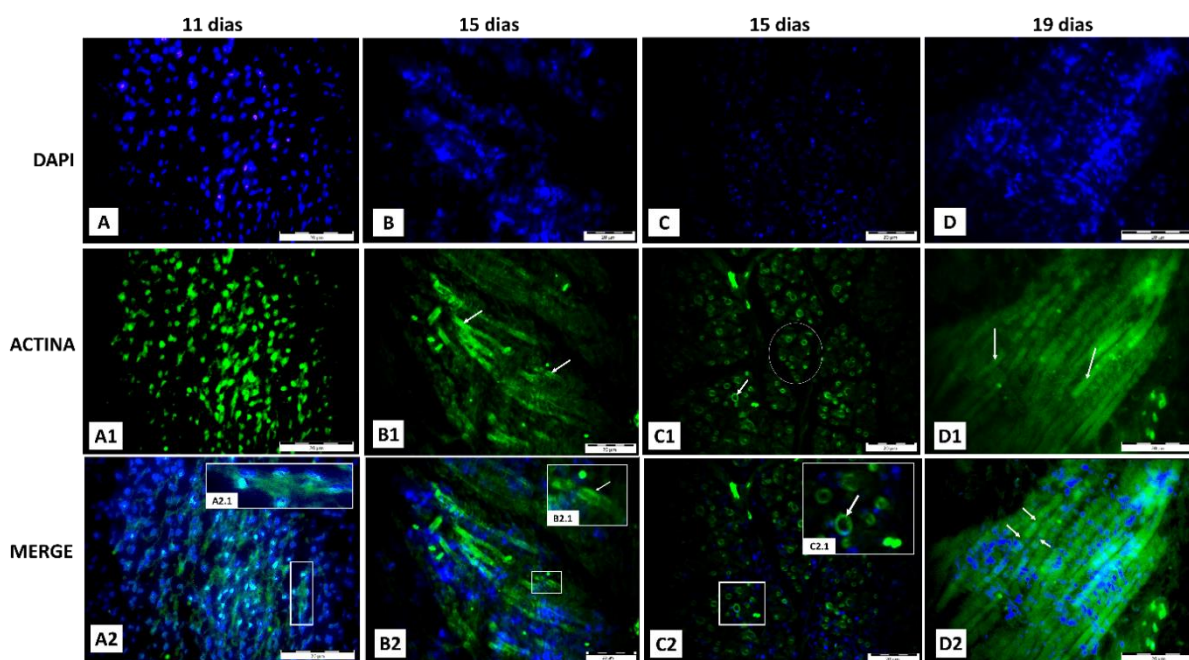
Fonte: o autor.

5.2 IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA B-ACTINA

A figura 6 representa os resultados obtidos para a imunofluorescência para β -actina demonstrada em verde. No dia E11, a actina aparece distribuída no citoplasma dos mioblastos (Figura 6 A1). Em E15, a marcação para actina é mais evidente (forte) em regiões específicas dos miotubos, conforme se observa na figura 6 B1 em um corte longitudinal, indicado pelas setas e na figura 6 C1 em um corte transversal, indicado pelo círculo e pela seta, onde a forte marcação para actina aparece na forma de um anel delimitando uma região central menos marcada, que pode ser interpretada como uma marcação nas regiões próximas à membrana das fibras. Em E19 dias, em corte longitudinal das células musculares, apontada pelas setas brancas, a marcação para actina aparece nas mesmas regiões ao longo da célula (figura 6 D1). Além disso,

a marcação para actina não é contínua nesta estrutura, sendo interrompida por pequenos espaços escuros, conforme representado pelas setas brancas na figura 6 D2.

Figura 6 Imunofluorescência para β -actina



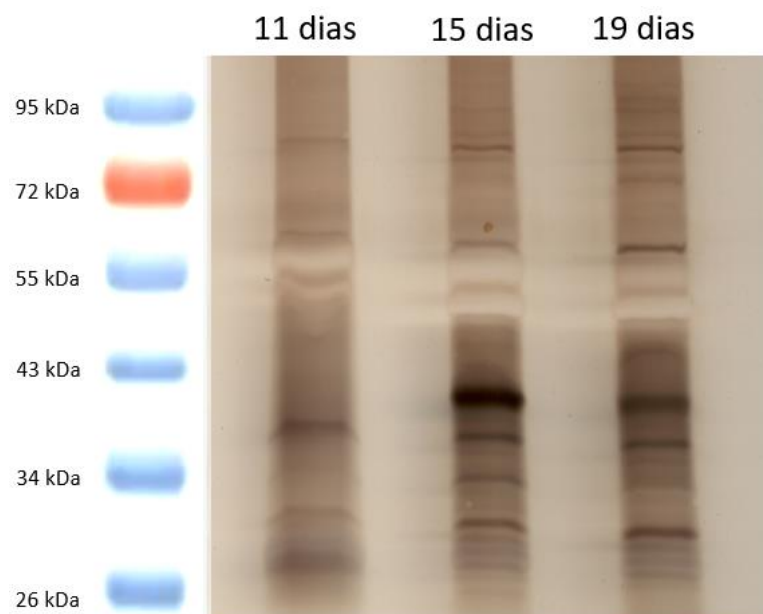
Legenda: Imunofluorescência para β -actina em células musculares de embriões de galinha. **A, A1, A2:** E11 dias. **A2.1:** detalhe mostrando a distribuição da β -actina nos mioblastos. **B, B1, B2:** E15 dias em corte longitudinal. **B2.1:** detalhe mostrando a distribuição da β -actina nos miotubos. **C, C1, C2:** E15 dias, em corte transversal. O círculo mostra a organização dos miotubos e as setas indicam a marcação para β -actina nas células musculares. **C2.1:** detalhe mostrando a distribuição da β -actina em forma de anel nas células musculares; **D, D1, D2:** E19 dias. As setas mostram a presença da actina nas células musculares. Barra de escala: 20 μ m.

Fonte: o autor.

5.3 GEL DE PROTEÍNA SDS-PAGE

A figura 7 mostra o resultado da eletroforese do gel de proteínas totais corado com prata. O padrão de bandas obtido no gel mostra a integridade das proteínas com peso molecular variando de 26 a 95 kDa, sendo elas mais evidentes em 15 e 19 dias e menos evidentes em 11 dias.

Figura 7 Análise do perfil proteico em SDS-PAGE relevado com prata

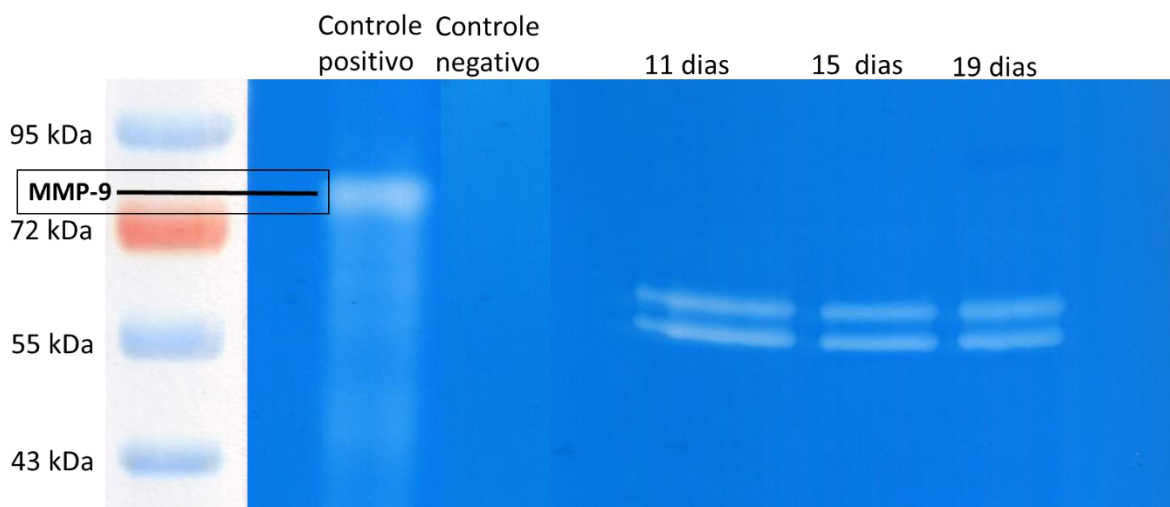


Legenda: Análise do perfil proteico das amostras de meio de cultivo de células musculares de peito de embrião de galinha nos tempos de incubação de 11, 15 e 19 dias em SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10%. Para cada tempo foi aplicado 0,5 ug de proteína total e o gel foi corado com prata. Fonte: o autor.

5.4 ZIMOGRAFIA

A figura 8 mostra o resultado da zimografia para as amostras de meio de cultivo após incubação por 24h a 37 °C. O controle positivo, para o qual foi utilizada uma amostra de intestino de rato, mostra uma banda na altura de 90 kDa, que é definida como sendo de metaloproteinase 9 (Reis; Soares; Gomes, 2019). O Controle negativo representa uma amostra de meio de cultivo DMEM, sem soro fetal bovino. Em E11, E15 e E19 dias, onde foi aplicado 0,5 µg de proteína total, são visíveis duas bandas de atividade proteolítica com pesos moleculares entre 55 kDa e 72 kDa.

Figura 8 Zimografia



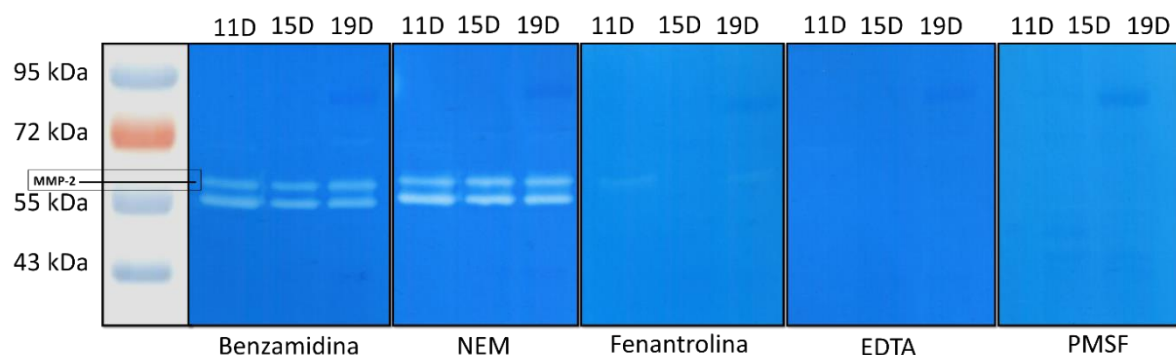
Legenda: Zimograma de amostras de meio condicionado de células musculares do peito de embrião nos tempos de incubação de 11, 15 e 19 dias. **Controle positivo:** amostra de intestino de embrião de rato, que mostra uma banda de MMP-9 em 90 kDa (Reis; Soares; Gomes, 2019). **Controle negativo:** meio de cultivo não condicionado.

Fonte: o autor.

5.5 TESTES DE INIBIÇÃO

A figura 9 mostra os testes de inibição de proteases com 0,5 µg de proteína total para cada tempo de desenvolvimento avaliado. A Benzamidina (inibidor de tripsinas e quimiotripsinas), aplicada em concentração de 2 mM, não inibiu a atividade proteolítica nas amostras. O NEM (inibidor de cisteíno proteases), aplicado a 0,5 mM, não inibiu a atividade das proteases. A Fenantrolina (inibidor de metaloproteinasas), aplicado a 0,5 mM, inibiu totalmente a segunda banda em 11 e 19 dias, assim como todas as bandas em 15 dias reduzindo também, mas parcialmente, a primeira banda em 11 e 15 dias. O EDTA (inibidor de metaloproteinasas), aplicado a 0,5 mM e o PMSF (inibidor de serino proteases) aplicado a 2 mM, inibiram totalmente a atividade proteolítica das amostras.

Figura 9 Testes de inibição de proteases

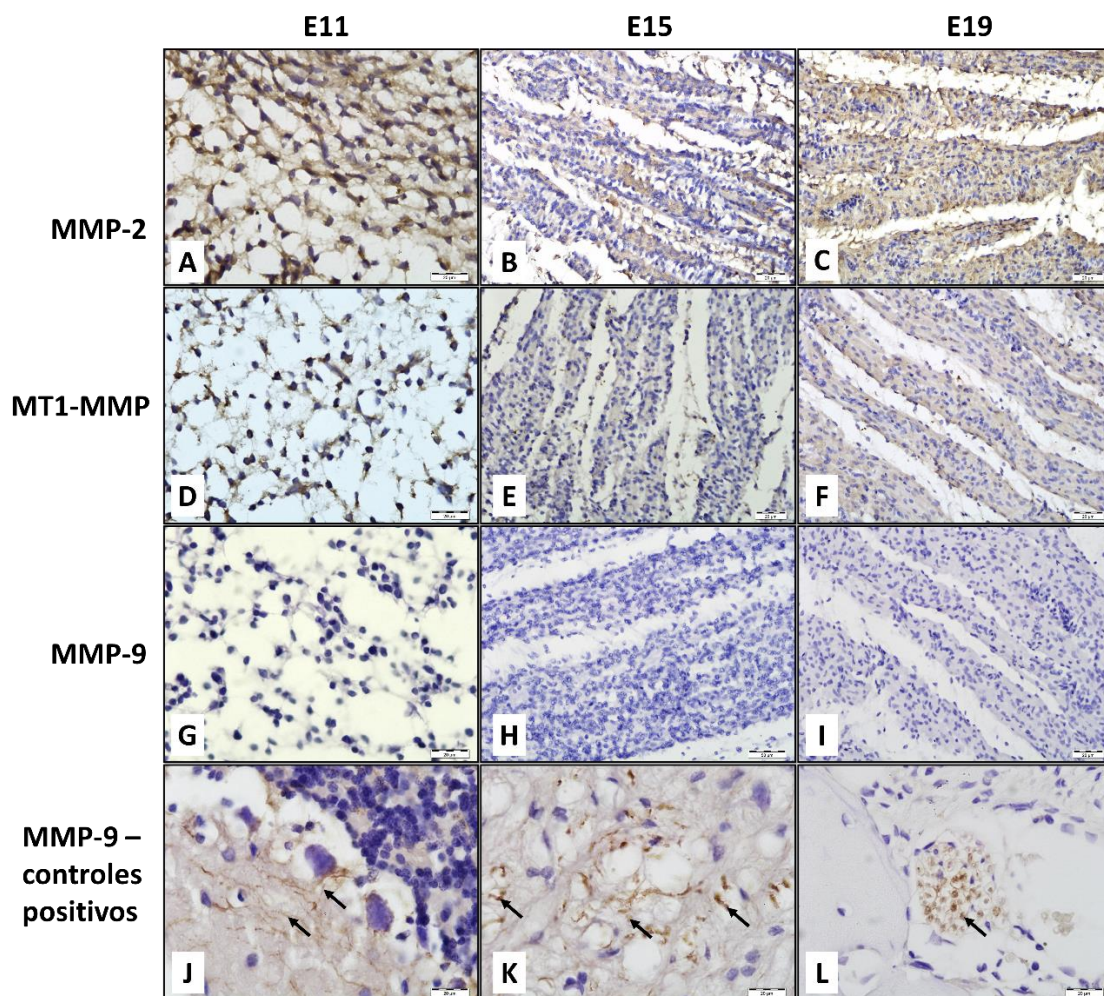


Legenda: Testes de inibição de proteases para os tempos de 11, 15 e 19 dias de incubação, onde foi adicionado ao tampão de ativação Benzamidina 2 mM (inibidor de serino proteases do tipo tripsinas e quimiotripsinas); NEM 0,5 mM (inibidor de cisteíno proteases); Fenantrolina 0,5mM (inibidor de MMPs); EDTA 0,5 mM (inibidor de MMPs) e PMSF 2 mM (inibidor de serino proteases).
Fonte: o autor.

5.6 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA MMP-2, MMP-9 E MT1-MMP

Os resultados da imuno-histoquímica para MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP são apresentadas na figura 10. Em E11, E15 e E19 dias houve detecção da MMP-2 (Figura 10 A, B, C) e MT1-MMP (Figura 10 D, E, F) com distribuição visível tanto nos mioblastos no tempo de 11 dias como nos miotubos com 15 e 19 dias, sendo a MMP-2 mais evidente quando comparada com a MT1-MMP. Em nenhum dos tempos de desenvolvimento avaliados houve marcação para MMP-9 (Figuras 10 G, H, I). As figuras 10 J, K e L representam controles positivos da imuno-histoquímica para MMP-9 sendo representados por cortes da camada molecular (J) e substância branca (K) de cerebello e nas fibras nervosas de cortes de incisivos de ratos (L). A marcação é apontada pelas setas.

Figura 10 Imuno-histoquímica



Legenda: Imuno-histoquímica do músculo do peito de embriões de galinha nos dias E11 (A,D,G) , E15 (B,E,H) e E19 (C,F,I) para MMP-2, MT1-MMP e MMP-9, durante o processo de diferenciação das células musculares. MMP2 e MT1-MMP foram marcadas em todos os dias de desenvolvimento, enquanto que MMP-9 não apresentou imunodeteção em nenhum dos dias. Os controles positivos para MMP-9 são demonstrados pelas setas na camada molecular (J) e substância branca (K) no cerebelo e nas fibras nervosas (L) das secções dos incisivos de ratos. Barra de escala: 20 µm.

Fonte: o autor.

6 DISCUSSÃO

A literatura demonstra, que em desenvolvimento de galinhas, o período compreendido entre o dia embrionário 3 (E3) ao dia embrionário 7 (E7) é conhecido como estágio embrionário da miogênese, quando os mioblastos começam migrar do miótomo para as diferentes partes do corpo. Neste período, os mioblastos sofrem fusão para formar células musculares primárias, também chamadas miotubos. A partir de E8, inicia-se a fase fetal da miogênese marcada pela segunda onda de diferenciação de mioblastos, onde os miotubos (as células musculares primárias) aumentam integrando novos mioblastos em sua estrutura. Durante a fase muscular secundária as células produzem diferentes isoformas de proteínas musculares que se organizam em miofibrilas (Stockdale, 1992; Kahane; Cinnamon; Bachelet; Kalcheim, 2001; Chal; Pourquié, 2017).

Nesse contexto, os processos de diferenciação muscular são extensivamente estudados, com a maioria dos achados provenientes de estudos *in vitro* usando culturas primárias ou linhagens celulares estabelecidas, como as células C2C12 de camundongos. Estes estudos são uma abordagem importante para entender o papel de diferentes moléculas que podem estar envolvidas durante a diferenciação sem a interferência do metabolismo geral do corpo (Hirst; Marcelle, 2015; Chal; Pourquié, 2017; Nguyen *et al.*, 2023; Nejad *et al.*, 2024; Scaal; Marcelle, 2018; Costa *et al.*, 2021; Malila *et al.*, 2022).

Por outro lado, estudos *in vivo*, são necessários para confirmar os resultados obtidos *in vitro*. Embora as fases gerais de diferenciação sejam bem estabelecidas a partir de estudos *in vitro*, há poucos relatos sobre esse processo em músculos específicos, como o peitoral, por exemplo. Diante disso, no presente estudo, examinou-se *in vivo* a morfologia da diferenciação do músculo peitoral durante os dias E11, E15 e E19. Esses pontos de tempo são considerados como a fase fetal do desenvolvimento miogênico das galinhas e, usando alguns métodos básicos de morfologia, alguns resultados diferem em comparação com os *in vitro* descritos na literatura.

Os resultados obtidos através da coloração de Masson mostram em E11 dias a presença de mioblastos sem presença de miotubos. Esse resultado contrasta com a maioria dos estudos comparativos que indicam que nesse tempo está ocorrendo a

segunda onda de diferenciação muscular (Stockdale, 1992; Picard *et al.*, 2010). No dia E11 podem ser observados mioblastos individuais, com núcleos esféricos, ou aglomerados de mioblastos com processos de membrana se tocando, indicando adesão ativa levando à sua fusão.

No dia E15, os mioblastos passaram ativamente pelo processo de fusão, formando estruturas sinciciais, enquanto outros apareceram como miotubos finos com vários núcleos ovais na periferia, sugestivos do início das células musculares primárias neste momento. Em E15, foi detectado em alguns miotubos, usando a coloração de Masson, a presença de finas bandas estriadas ao longo dessas células, indicando uma formação ativa de miofibrilas nascentes. Portanto, para o músculo peitoral observa-se em E15 uma morfologia de células em processo de diferenciação consistente com a fase primária de diferenciação muscular.

No dia E19, a coloração de Masson revelou miotubos com dimensões transversais mais espessas em comparação com o dia E15, mostrando extensa coloração vermelha citoplasmática. Isso se refere ao estágio fetal de diferenciação quando novas células musculares são produzidas e a formação de miofibrilas está em andamento para aumentar a espessura das células musculares. Portanto, para este estudo e para o músculo peitoral, descobriu-se que as células musculares primárias são produzidas no dia E15, e a diferenciação das células musculares secundárias ocorre mais tarde no dia E19. Considerando os resultados, embora demonstrem que o momento da fase primária e secundária da diferenciação celular no músculo peitoral difere do que tem sido relatado na literatura, os resultados morfológicos do presente trabalho suportam descrições anteriores de estágios de diferenciação celular obtidos *in vitro*, ou seja, agregação de mioblastos, fusão para formar miotubos e após, durante a segunda fase, o crescimento das células musculares (Sanger *et al.*, 2002; Picard *et al.*, 2010; Abmayr; Pavlath, 2012).

Durante a diferenciação muscular, muitas proteínas são produzidas e podem caracterizar esse processo. Dentre elas, está a actina, que além de compor a estrutura da miofibrila e entrar no processo de contração muscular, parece estar diretamente envolvida no alinhamento e fusão dos mioblastos. A dinâmica dessa proteína, como sua montagem em F-actina a partir de monômeros de G-actina, facilita o reconhecimento e a fusão dos mioblastos durante as interações célula-célula. Esse fenômeno é crucial para a formação dos miotubos multinucleados (Nguyen *et al.*,

2023).

Essa função da actina durante a orientação das células na formação dos miotubos é regulada pela via de sinalização do FGF (do inglês *Fibroblast Growth Factor*), onde essa via de sinalização regula a atividade do citoesqueleto de actina levando a alterações que possibilitam a fusão dos mioblastos e o direcionamento das bordas do miotubo para os locais corretos de fixação muscular (Yang *et al.*, 2020).

Neste trabalho utilizou-se a técnica de imunofluorescência para detectar a β -actina, isoforma presente na maioria das células, inclusive nas células musculares (Madsen *et al.*, 2018), a fim de verificar a distribuição e organização desta proteína nestas células durante seu processo de diferenciação. Os resultados da imunofluorescência para β -actina no tempo de E11 dias, demonstraram que a actina está presente em todo o citoplasma dos mioblastos, indicando que nenhuma célula muscular primária foi observada neste momento. No entanto, em E15 e E19 dias a mesma aparece mais concentrada em pontos específicos do citoplasma, o que é mostrado pela intensidade da fluorescência maior nas regiões próximas à membrana das fibras, reforçando os resultados anteriormente obtidos através da coloração de Masson. É possível que a β -actina observada no tempo de 11 dias de desenvolvimento embrionário, como descrito por Nguyen *et al.* (2013), esteja envolvida na formação dos prolongamentos dos mioblastos observados em nosso estudo nesse tempo de incubação, possivelmente com regulação de FGF como demonstrado por Yang *et al.* (2020) enquanto que em 15 e 19 dias ela esteja envolvida também na formação da estrutura das fibras musculares.

Já em relação as proteases, sabe-se que essas enzimas estão envolvidas durante o desenvolvimento embrionário. Dentre elas, as metaloproteinases de matriz são as mais estudadas e demonstradas como participantes no processamento e renovação da matriz extracelular durante a morfogênese dos tecidos (Cai *et al.*, 2000; Fukuda *et al.*, 2000; Lelongt *et al.*, 2001; Ratajska; Cleutjens, 2002; Duong; Erickson, 2004; Mosig *et al.*, 2007; Verslegers *et al.*, 2015; Camargo *et al.*, 2016; Hendrix; Kheradmand, 2017; Moracho *et al.*, 2021). Assim, o presente estudo investigou a existência de proteases nas fases de diferenciação do musculo de peito de galinha, utilizando métodos como a zimografia, testes de inibição de proteases e imuno-histoquímica.

Para a detecção de atividade proteolítica nas amostras, foi utilizada a técnica de zimografia do sobrenadante do meio de cultivo DMEM na ausência de soro fetal bovino, onde as amostras de músculo esquelético do peito dos embriões foram incubadas por 24h à 37 °C. Esta é uma técnica sensível para verificar a atividade proteolítica em uma amostra biológica, onde pode-se obter a estimativa da massa molecular das proteases (Leber; Balkwill, 1997). Os resultados demonstram atividade de proteases nos três tempos avaliados através de duas bandas, acima de 55 kDa, que podem corresponder à MMP-2. Em zimografia de gelatina, bandas de MMP-2 em sua pró-forma e ativada correspondem a 72 kDa e 62 kDa, respectivamente, conforme demonstrado por Duong e Erickson (2004) em análises por zimografia do meio condicionado de células da crista neural de embriões de galinha. As bandas de zimografia foram posteriormente submetidas ao método de inibição das proteases, onde reagentes inibidores podem ser adicionados ao tampão de ativação e assim verificar se há ou não inibição da atividade proteolítica das amostras na gelatina adicionada ao gel podendo-se assim, com a zimografia, verificar a que classe de proteases as bandas observadas pertencem.

Neste trabalho, foram utilizados inibidores de proteases. O PMSF é um inibidor de serino proteases geralmente empregado para inibir reações de proteólise atuando por sulfonilação no resíduo de serina no sítio catalítico, obliterando o sítio ativo e levando à inibição irreversível da atividade catalítica em serino proteases (Rao *et al*, 1998; Sharma; Kishan, 2011). A Benzamidina é capaz de inibir alguns tipos de serino proteases que incluem tripsina e quimiotripsina (Chakravarthula; Zeng; Alves, 2022). Já as metaloproteinasas podem ser inibidas por quelantes de íons metálicos como 1,10 – Fenantrolina (Beek *et al.*, 2012) e pelo EDTA (Rao; Tanksale; Ghatge; Deshpande, 1998). A inibição de cisteíno proteases pode ser feita através do N-etilmaleimida (NEM) que reage com resíduos de cisteína levando à inibição dessas proteases (Liu; Levy; Chirico, 1996; Beyer *et al.*, 2013).

Os resultados dos testes de inibição demonstraram que a Benzamidina, que é um inibidor de serino proteases do tipo tripsina e quimiotripsina, não causou inibição, indicando que as bandas não eram desses tipos de serino proteases. O NEM, inibidor de cisteíno proteases, não causou inibição para as proteases nos três tempos avaliados, indicando que essas bandas não se tratavam da atividade de cisteíno proteases. Já na incubação com PMSF, inibidor de serino proteases, houve inibição

total das bandas indicando que se referem à serino proteases de outros tipos que não as tripsinas ou quimiotripsinas. Por outro lado, o EDTA, que é um inibidor de metaloproteinasas, também inibiu completamente a atividade proteolítica nos três tempos avaliados, demonstrando haver também a presença de metaloproteinasas nas amostras, confirmando a possibilidade das bandas apresentadas pela zimografia serem de MMP-2. Com relação à Fenantrolina, também inibidor de metaloproteases, houve inibição parcial da atividade proteolítica nos géis de zimografia nos tempos E11 e E19, e inibição total em E15. Isso nos permite sugerir que as bandas de atividade proteolítica apresentadas podem conter tanto metaloproteinasas quanto serino proteases nos tempos de E11 e E19 e que, dependendo do inibidor utilizado, como no caso do EDTA, pode ocorrer uma inibição completa. Isso pode sugerir que em um tecido em processo de diferenciação, as moléculas de proteases serino e metaloproteinasas talvez possam conter regiões sensíveis a ambos os inibidores que podem responder a concentrações diferentes dependendo do inibidor usado.

Entretanto, esse resultado abre a possibilidade de estudos com foco na estrutura molecular desses tipos de proteases que são expressas em tecidos em processo de diferenciação, como o observado em nossos resultados para o tecido muscular.

Belichenko *et al.* (2009) demonstraram através de método fluorométrico a presença de metaloproteinasas em amostras obtidas de músculo esqueléticos torácicos de embriões de galinhas nos tempos de 10-11, 14-15 e 18-19 dias de incubação. Contudo estes autores não demonstraram quais metaloproteinasas estavam presentes nessas amostras como neste trabalho que, além de mostrar, caracterizou o tipo dessas proteases nas fases de diferenciação muscular.

Ainda, os resultados de imuno-histoquímica confirmaram a presença de proteases observadas na zimografia, especialmente MMPs, que eram o interesse neste trabalho. De fato, a imuno-histoquímica revelou a presença de MMP-2 e MT1-MMP nos tempos de desenvolvimento embrionários E11, E15 e E19 dias. Mas demonstram não haver a expressão de MMP-9 durante os três tempos avaliados, o que confirma a inexistência dessa metaloproteínase anteriormente não detectada na zimografia.

A presença dessas MMPs e serino proteases detectadas neste estudo corroboram com alguns relatos encontrados na literatura que, embora em outras

condições experimentais, utilizaram células musculares. Stupka *et al.* (2013) demonstraram, em células em cultivo de músculo dos membros de embriões de camundongos, que a degradação de componentes da matriz extracelular, como por exemplo, a degradação de Versican (um proteoglicano presente na matriz extracelular) por meio de proteases ADAMTS Versicanases, é um passo essencial para a fusão dos mioblastos e formação dos miotubos multinucleados. Ren, Lamb e Murphy (2019) demonstraram a presença de MMP-2 em tecido muscular de ratos e humanos jovens. Estes autores demonstraram que a maior parte da MMP-2 (70%) está localizada dentro das fibras musculares e apenas 30% está localizada na matriz extracelular e que a maior parte da MMP-2 intracelular é livremente difusível pelo citoplasma e o restante está ligada a proteínas estruturais e contráteis, participando da degradação de proteínas presentes nas células musculares.

Os resultados do presente estudo, *in vivo*, utilizando amostras de tecido muscular de embrião de galinha, demonstram que MMP-2 é expressa e é exportada para o meio de cultivo. Além disso, a imuno-histoquímica demonstrou a expressão também de MT1-MMP nos três tempos de desenvolvimento avaliados nas fases de diferenciação do músculo do peito de embrião de galinha. Sendo a MT1-MMP responsável pela ativação de MMP-2 (Murphy *et al.*, 1999), a detecção de ambas MMPs neste estudo nos tempos avaliados, seja por imuno-histoquímica no caso de MT1-MMP e zimografia para MMP-2, reforça a relação existente entre essas duas MMPs e corroboram com os resultados de Alameddine (2012) que, embora em ratos, mostraram o envolvimento de diferentes MMPs, como MMP-7, MMP-2 e MT1-MMP, durante a morfogênese de músculo esquelético de ratos, *in vitro*, indicando que estas enzimas atuam diretamente na migração, alinhamento e fusão de mioblastos.

Entretanto, neste estudo, diferente dos encontrados na literatura, mostramos por meio dos testes de inibição que, além de MMP-2 e MT1-MMP, são expressas por células musculares em diferenciação serino proteases, indicando também a participação dessas proteases no processo de diferenciação muscular que precisam ser melhor avaliadas no futuro.

7 CONCLUSÕES

- A morfologia da diferenciação dos mioblastos possui similaridade com o descrito *in vitro* na literatura, mas o tempo cronológico *in vivo* é diferente;
- A β -actina apresenta diferentes localizações em função das fases morfológicas de diferenciação muscular;
- MMP-2, MT1-MMP são expressas durante o desenvolvimento embrionário de galinhas nos tempos de 11, 15 e 19 dias de incubação enquanto que a MMP-9 não foi expressa em nenhum dos tempos de desenvolvimento avaliados;
- Existe uma relação entre a expressão de MMP-2 e MT1-MMP e as fases de diferenciação muscular, sendo aparentemente mais expressa a MMP-2;
- Além de MMPs, há expressão de serino proteases durante a diferenciação do músculo estriado esquelético.

REFERÊNCIAS

ABMAYR, Susan M.; PAVLATH, Grace K. Myoblast fusion: lessons from flies and mice. **Development**, v. 139, n. 4, p. 641-656, 15 fev. 2012.

ALAMEDDINE, H. S. Matrix metalloproteinases in skeletal muscles: friends or foes?. **Neurobiology Of Disease**, v. 48, n. 3, p. 508-518, dez. 2012.

ALBERTS, B. *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 1427 p.

ARAÚJO, G. A. T *et al.* Growth of intestinal villi and crypts of chickens and rats during embryonic and postnatal development. A comparative study using morphometric parameters. **Publicatio Uepg**: Ciencias Biologicas e da Saúde, Ponta Grossa, v. 29, n. 1, p. 6-20, out. 2024.

ATTUR, M. *et al.* Membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MMP-14) modulates tissue homeostasis by a non-proteolytic mechanism. **Iscience**, p. 1-42, 8 maio 2020.

BEEK, J. *et al.* Inhibitors of zinc-dependent metalloproteases hinder sperm passage through the cumulus oophorus during porcine fertilization in vitro. **Reproduction**, v. 144, n. 6, p. 687–697, dez. 2012.

BELICHENKO, V. M. *et al.* Activity of matrix metalloproteinases in skeletal muscle of chick embryos of different ages. **Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology**, v. 45, n. 3, p. 417–419, 2009.

BEYER, S. R. *et al.* Identification of cysteine residues in human cationic amino acid transporter hCAT-2A that are targets for inhibition by N-ethylmaleimide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 42, p. 30411–30419, 18 out. 2013.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248 – 254, 1976.

BUCKINGHAM, M. *et al.* The formation of skeletal muscle: from somite to limb. **J. Anat.** v. 202, n.1, p. 59 – 68, jan. 2003.

CAI, D. H. *et al.* MMP-2 expression during early avian cardiac and neural crest morphogenesis. **Anatomical Record**, v. 259, n. 2, p. 168–179, 1 jun. 2000.

CAMARGO, K. C. *et al.* MT1-MMP and its potential role in the vertebrate intestinal morphogenesis. **Acta Histochemica**, v. 118, n. 7, p. 729–735, 1 set. 2016.

CARMELI, E. *et al.* Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. **Muscle & Nerve**, v. 29, n. 2, p. 191-197, 2 jan. 2004.

CARROLL, E. L. *et al.* Trypsin-like proteases and their role in muco-obstructive lung diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, p. 5817, 29 maio 2021.

CERA, E.D. Serine proteases. **Iubmb Life**, v. 61, n. 5, p. 510-515, 29 jan. 2009.

CHAKRAVARTHULA, T. N; ZENG, Z; ALVES, N. J. Multivalent Benzamidine Molecules for Plasmin Inhibition: effect of valency and linker length. **Chemmedchem**, v. 17, n. 22, p. 1-6, 10 out. 2022.

CHAL, J.; POURQUIÉ, O. Making muscle: skeletal myogenesis in vivo and in vitro. **Development**, v. 144, n. 12, p. 2104-2122, 15 jun. 2017.

CHEN, X.; LI, Y. Role of matrix metalloproteinases in skeletal muscle. **Cell Adhesion & Migration**, v. 3, n. 4, p. 337-341, out. 2009.

CORCORAN, M. L. *et al.* MMP-2: expression, activation and inhibition. **Enzyme And Protein**, v. 49, n. 1-3, p. 7-19, 1996.

COSTA, M. L.; JURBERG, A. D.; MERMELSTEIN, C. The Role of Embryonic Chick Muscle Cell Culture in the Study of Skeletal Myogenesis. **Frontiers In Physiology**, v. 12, p. 1-15, 20 maio 2021.

CUI, N; HU, M; KHALIL, R. A. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. **Progress In Molecular Biology And Translational Science**, p. 1-73, 2017.

DUONG, T. D.; ERICKSON, C. A. MMP-2 Plays an Essential Role in Producing Epithelial-Mesenchymal Transformations in the Avian Embryo. **Developmental Dynamics**, v. 229, n. 1, p. 42–53, jan. 2004.

ETHELL, I. M.; ETHELL, D. W. Matrix metalloproteinases in brain development and remodeling: Synaptic functions and targets. **Journal of Neuroscience Research**, v. 85, n. 13, p. 2813-2823, 23 mar. 2007.

EXETER, D.; CONNELL, D. Skeletal Muscle: functional anatomy and pathophysiology. **Seminars In Musculoskeletal Radiology**, v. 14, n. 2, p. 097-105, 2010.

FUKUDA, Y. *et al.* Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in fetal rabbit lung. **American Journal Of Physiology-Lung Cellular And Molecular Physiology**, v. 279, n. 3, p. 555-561, 1 set. 2000.

FUKUSHIMA, K. *et al.* Activation and localization of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the skeletal muscle of the muscular dystrophy dog (CXMDJ). **Bmc Musculoskeletal Disorders**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 28 jun. 2007.

GAGLIANONE, R. B. *et al.* Comparative study of calcium and calcium-related enzymes with differentiation markers in different ages and muscle types in mdx mice. **Histology And Histopathology**, v. 35, n. 2, p. 203-216, fev. 2020.

GAGLIANONE, R. B. *et al.* Persistent mdx diaphragm alterations are accompanied by increased expression and activity of calcium and muscle-specific proteins. **Histology And Histopathology**, v. 36, n. 7, p. 775-783, jul. 2021.

GOMES, J. R. *et al.* Immunolocalization and activity of the MMP-9 and MMP-2 in odontogenic region of the rat incisor tooth after post shortening procedure. **Journal Of Molecular Histology**, v. 42, n. 2, p. 153-159, 10 fev. 2011.

HARDY, E.; HARDY, A.; FERNANDEZ, C. MMP-2: is too low as bad as too high in the cardiovascular system? **American Journal Of Physiology-Heart And Circulatory Physiology**, v. 315, n. 5, p. 1332-1340, 1 nov. 2018.

HENDERSON, C. A. *et al.* Overview of the muscle cytoskeleton. **Comprehensive Physiology**, v. 7, n. 3, p. 891–944, 1 jul. 2017.

HENDRIX, A. Y.; KHERADMAND, F. The Role of Matrix Metalloproteinases in Development, Repair, and Destruction of the Lungs. **Progress In Molecular Biology And Translational Science**, p. 1-29, 2017.

HIRST, C. E.; MARCELLE, C. The Avian Embryo as a Model System for Skeletal Myogenesis. **Results And Problems In Cell Differentiation**, p. 99-122, 17 set. 2014.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 14. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2023. 586p.

KAHANE, N.; CINNAMON.; BACHELET, I.; KALCHEIM, C. The third wave of myotome colonization by mitotically competent progenitors: regulating the balance between differentiation and proliferation during muscle development. **Development**, v. 128, n. 12, p. 2187-2198, 15 jun. 2001.

KOISTINEN, H *et al.* The roles of proteases in prostate cancer. **Iubmb Life**, v. 75, n. 6, p. 493-513, 4 jan. 2023.

KUMAR, L. *et al.* Role of Matrix Metalloproteinases in Musculoskeletal Diseases. **Biomedicines**, v. 10, n. 10, p. 1-16, 4 out. 2022.

LEBER, T. M.; BALKWILL, F. R. Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. **Analytical Biochemistry**, v. 249, n. 1, p. 24-28, jun. 1997.

LELONGT, B. *et al.* Do matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 (gelatinases) play a role in renal development, physiology and glomerular diseases? **Current Opinion In Nephrology And Hypertension**, v. 10, n. 1, p. 7-12, jan. 2001

LIU, Q.; LEVY, E. J.; CHIRICO, W. J. N-ethylmaleimide inactivates a nucleotide-free Hsp70 molecular chaperone. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 47, p. 29937–29944, 1996.

LÓPEZ-OTÍN, C.; BOND, J. S. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 283, n. 45, p. 30433-30437, nov. 2008.

MADSEN, A. B. *et al.* β -Actin shows limited mobility and is required only for supraphysiological insulin-stimulated glucose transport in young adult soleus

muscle. **American Journal Of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 315, n. 1, p. 110-125, 1 jul. 2018.

MALILA, Yuwares *et al.* Differential expression patterns of genes associated with metabolisms, muscle growth and repair in Pectoralis major muscles of fast- and medium-growing chickens. **Plos One**, v. 17, n. 10, p. 1-19, 3 out. 2022

MONDAL, S. *et al.* Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and its inhibitors in cancer: a minireview. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 194, p. 112260, maio 2020.

MORACHO, N. *et al.* Emerging roles of MT-MMPs in embryonic development. **Developmental Dynamics**, v. 251, n. 2, p. 240-275, 22 jul. 2021.

MOSIG, R. A. *et al.* Loss of MMP-2 disrupts skeletal and craniofacial development and results in decreased bone mineralization, joint erosion and defects in osteoblast and osteoclast growth. **Human Molecular Genetics**, v. 16, n. 9, p. 1113–1123, maio 2007.

MUKUND, K.; SUBRAMANIAM, S. Skeletal muscle: a review of molecular structure and function, in health and disease. **Wires Systems Biology And Medicine**, v. 12, n. 1, p. 1-46, 13 ago. 2019.

MURPHY, G. *et al.* Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. **Apmis**, v. 107, n. 1-6, p. 38-44, mar. 1999.

NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovascular Research**, v. 69, n. 3, p. 562-573, 15 fev. 2006.

NALLAN CHAKRAVARTHULA, T.; ZENG, Z.; ALVES, N. J. Multivalent Benzamidine Molecules for Plasmin Inhibition: Effect of Valency and Linker Length. **ChemMedChem**, v. 17, n. 22, 18 nov. 2022.

NEJAD, F. M. *et al.* Network visualization of genes involved in skeletal muscle myogenesis in livestock animals. **Bmc Genomics**, v. 25, n. 1, p. 1-13, 19 mar. 2024.

NGUYEN, M. T. *et al.* Role of Actin-Binding Proteins in Skeletal Myogenesis. **Cells**, v. 12, n. 21, p. 2523, 25 out. 2023.

PAIVA, N. H. *et al.* Spatial and temporal changes in cell proliferation in the chick jejunum during the folding of the ridges into zigzags. **Acta Histochemica**, v. 121, n. 3, p. 376–379, 1 abr. 2019.

PICARD, B. *et al.* Skeletal muscle proteomics in livestock production. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, v. 9, n. 3, p. 259–278, 20 mar. 2010.

POSSIDONIO, A. C. B. *et al.* Differences in the expression and distribution of flotillin-2 in chick, mice and human muscle cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 8 ago. 2014.

POURQUIÉ, O. Somite formation in the chicken embryo. **International Journal of Developmental Biology**, v. 62, n. 1–3, p. 57–62, 2018.

RADZKI, D *et al.* Matrix Metalloproteinases in the Periodontium—Vital in Tissue Turnover and Unfortunate in Periodontitis. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 25, n. 5, p. 2763, 27 fev. 2024.

RAO, M. B. *et al.* Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, set. 1998.

RATAJSKA, A; CLEUTJENS, J. P. M. Embryogenesis of the rat heart: the expression of collagenases. **Basic Research In Cardiology**, v. 97, n. 3, p. 189-197, 1 maio 2002.

REIS, C. A; SOARES, M. A. M; GOMES, J. R. Expression of the matrix metalloproteinases 2 and 9 in the rat small intestine during intrauterine and postnatal life. **The Anatomical Record**, v. 303, n. 11, p. 2839-2846, 15 nov. 2019.

REN, X.; LAMB, G. D.; MURPHY, R. M. Distribution and activation of matrix metalloproteinase-2 in skeletal muscle fibers. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 317, p. 613–625, 2019.

RIBEIRO, L.N.M *et al.* Chicken embryo: a useful animal model for drug testing? **European Review For Medical And Pharmacological Sciences**, v. 26, n. 13, p. 4828-4839, jul. 2022.

SANGER, Joseph W. *et al.* Myofibrillogenesis in Skeletal Muscle Cells. **Clinical Orthopaedics And Related Research**, v. 403, p. 153-162, out. 2002.

SCAAL, M.; MARCELLE, C. Chick muscle development. **International Journal of Developmental Biology**, v. 62, n. 1–3, p. 123–132, 2018.

SHARMA, A; KISHAN, K.V.R. Serine protease inhibitor mediated peptide bond re-synthesis in diverse protein molecules. **Febs Letters**, v. 585, n. 21, p. 3465-3470, 10 out. 2011.

SMITH, L. R. *et al.* Matrix metalloproteinase 13 from satellite cells is required for efficient muscle growth and regeneration. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 54, n. 3, p. 333–353, 2020.

SNYMAN, C.; NIESLER, C. U. MMP-14 in skeletal muscle repair. **Journal Of Muscle Research And Cell Motility**, v. 36, n. 3, p. 215-225, 30 maio 2015.

SOLLI, A. I. *et al.* Tissue- and Cell-Specific Co-localization of Intracellular Gelatinolytic Activity and Matrix Metalloproteinase 2. **Journal Of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 61, n. 6, p. 444-461, 12 mar. 2013.

STOCKDALE, Frank E. Myogenic cell lineages. **Developmental Biology**, v. 154, n. 2, p. 284-298, dez. 1992.

STUPKA, N. *et al.* Versican processing by a disintegrin-like and metalloproteinase domain with thrombospondin-1 repeats proteinases-5 and-15 facilitates myoblast fusion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 3, p. 1907–1917, 18 jan. 2013.

VERSLEGERS, M *et al.* MMP-2 mediates Purkinje cell morphogenesis and spine development in the mouse cerebellum. **Brain Structure and Function**, v. 220, n. 3, p. 1601–1617, 1 maio 2015.

YANG, S. *et al.* FGF signaling directs myotube guidance by regulating Rac activity. **Development**, v. 147, n. 3, p. 1-12, 1 fev. 2020.

ZIMOWSKA, M. *et al.* Distinct patterns of MMP-9 and MMP-2 activity in slow and fast twitch skeletal muscle regeneration in vivo. **International Journal of Developmental Biology**, v. 52, n. 2–3, p. 307–314, 2008.