

# Atividades de creatina quinase e lactato desidrogenase na identificação de frangos com estresse e filés PSE (*pale, soft, exudative*)

## Creatine kinase and lactate dehidrogenase activities for stress animal identification and chicken PSE (*pale, soft, exudative*) Meat

Denis Fabricio Marchi<sup>1</sup>; João Carlos Santilli<sup>2</sup>; Adriana Lourenço Soares<sup>3</sup>; Gleice Rocha dos Santos<sup>4</sup>; Alexandre Oba<sup>5</sup>; Massami Shimokomaki<sup>6\*</sup>; Elza Iouko Ida<sup>3</sup>

### Resumo

PSS do inglês *Pork Stress Syndrome* (Síndrome do Estresse Suíno) é uma anormalidade que ocorre em suínos. Animais PSS são sensíveis ao anestésico halotano, apresentam maior atividade das enzimas Creatina Quinase (CK) e Lactato Desidrogenase (LDH) e são predispostos ao desenvolvimento de carnes PSE (*Pale, Soft, Exudative*), comprometendo sua qualidade. Em frangos, pouco se conhece sobre a relação entre a sensibilidade ao halotano e alterações nas atividades destas enzimas com a ocorrência de carnes PSE. O objetivo deste trabalho foi determinar as atividades das enzimas CK e LDH em frangos sensíveis e não sensíveis ao halotano para identificação da susceptibilidade ao estresse e ao desenvolvimento de carnes PSE. As aves foram expostas ao halotano na concentração de 3,0% em oxigênio puro por 5 min. Posteriormente, foram classificadas como sensível ao halotano (HAL<sup>+</sup>), quando ocorreu o enrijecimento dos membros inferiores e não sensível (HAL<sup>-</sup>), quando houve ausência de enrijecimento. Após 3 h e 48 h da realização do teste de sensibilidade ao halotano, o sangue foi coletado da veia branquial da asa e o soro foi extraído e armazenado à -22 °C até as determinações das atividades de CK e LDH. Não foram observadas diferenças ( $p \geq 0,05$ ) na atividade de CK entre os frangos HAL<sup>+</sup> e HAL<sup>-</sup>. Entretanto, diferenças ( $p \leq 0,05$ ) foram verificadas nas atividades de LDH nos tempos de 3 h e 48 h, sendo 44,2% e 66,1% respectivamente maiores para o grupo HAL<sup>+</sup>. A atividade da CK não foi eficaz para identificar os frangos sensíveis ao anestésico halotano, enquanto que a medida de atividade de LDH pode ser utilizada para identificar animais sensíveis ao estresse, com conseqüente problema na qualidade da carne.

**Palavras-chave:** Halotano, enzimas glicolíticas, qualidade da carne

### Abstract

Porcine Stress Syndrome (PSS) is a syndrome that occurs in pigs. PSS animals are sensitive to the anesthetic halothane, have higher activities of Creatine Kinase (CK) and Lactate Dehydrogenase (LDH) and are predisposed to the development of PSE (Pale, Soft, Exudative) meat, compromising the meat quality. In chickens, little is known about the relationship between sensitivity to and halothane changes in the activities of these enzymes with the occurrence of PSE meat. The aim of this study was to

<sup>1</sup> Doutorando do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, PR. E-mail: dfmarhi@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Pesquisador Laboratório Oswaldo Cruz de Londrina, Londrina, PR. E-mail: joao@oswaldocruz-lab.com.br

<sup>3</sup> Prof<sup>as</sup> Dr<sup>as</sup> do Dept<sup>o</sup> de Ciência e Tecnologia de Alimentos, UEL, Londrina, PR. E-mail: adri.soares@uel.br; elida@uel.br

<sup>4</sup> Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, UEL, Londrina, PR. E-mail: gleice\_quimica@hotmail.com

<sup>5</sup> Prof. Dr. do Dept<sup>o</sup> de Zootecnia, UEL, Londrina, PR. E-mail: oba@uel.br

<sup>6</sup> Prof. Dr. da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, Campus Londrina, Londrina, PR. E-mail: mshimo@sercomtel.com.br

\* Autor para correspondência

evaluate the CK and LDH activities in sensitive and non-sensitive halothane chickens and for stress susceptibility identification and PSE meat development. Birds were exposed to halothane at a 3.0 % concentration in pure O<sub>2</sub> for 5 min. Afterwards, they were classified into groups: sensitive to halothane (HAL+) (stiffening of the lower limbs) and Non-sensitive (HAL-) (no hardening). After 3 h and 48 h to the test, blood was collected from the wing vein gill, serum extracted and stored at -22 °C until analysis of CK and LDH. No differences were observed ( $p \geq 0.05$ ) in CK activity for HAL+ and HAL- groups. However, differences ( $p < 0.05$ ) were observed the LDH activity at 3 h and 48 h, and 44.2 % and 66.1 % higher for the group HAL+, respectively. The determination of lactate dehydrogenase activity indicates to be an alternative to identify animals susceptible to stress thus prone to produce PSE meat.

**Key words:** Halothane, glycolitic enzymes, meat quality

## Introdução

Carnes PSE são caracterizadas pelo seu aspecto pálido, flácido, exudativo e uma baixa Capacidade de Retenção de Água (CRA). O desenvolvimento desta anomalia é causado pela desnaturação das proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas, provenientes de um acelerado declínio do pH, enquanto a carcaça do animal ainda encontra-se quente ( $\pm 35^\circ\text{C}$ ), comprometendo as propriedades funcionais da carne (CANDEK-POTOKAR et al., 1998; BREWER; McKEITH, 1999, BARBUT et al., 2008, SOARES et al., 2003). A taxa de glicólise *post mortem* acelerada pode ser observada tanto em suínos como em aves, o que resulta em um pH próximo de 5,8 com 45 minutos *post mortem* em suínos e 15 minutos em aves (OLIVO et al., 2001, SOARES et al., 2003).

A ocorrência de PSE pode ser originada de diversos fatores que comprometem a homeostase do animal. Segundo Anthony (1998), a intensa seleção genética dos frangos, com o objetivo de acelerar o ganho de massa muscular dos animais pode ter resultado em anormalidades bioquímicas no músculo *Pectoralis major*. Em suínos, a principal causa do PSE já é conhecida e está associada a uma mutação nos canais liberadores de Ca<sup>2+</sup> do Retículo Sarcoplasmático (RS). Esta mutação torna o animal extremamente sensível ao estresse, o que resulta em uma síndrome denominada de *Porcine Stress Syndrome* (PSS) (FUJII et al., 1991). Suínos portadores desta síndrome são sensíveis ao anestésico halotano, o qual foi utilizado até a década de 90 para selecionar os animais PSS (MITCHELL; HEFFRON, 1982; BERTOL, 2005).

Além da sensibilidade ao halotano, os suínos PSS apresentam alterações nas atividades das enzimas Creatina Quinase (CK) e Lactato Desidrogenase (LDH) (MITCHELL; HEFFRON, 1982; POSO; PUOLANNE, 2005). A CK é uma enzima encontrada no citoplasma de músculos cardíacos e esqueléticos e sensível na indicação de lesões musculares e em situações estressantes, tendo sua atividade elevada, como ocorre em animais PSS (MITCHELL; HEFFRON, 1982; MITCHELL; SANDRECOCK; COOKE, 2003). A enzima CK é responsável por catalisar a via mais rápida de produção de energia na forma de Adenosina Tri-Fosfato (ATP) pela conversão de fosfocreatina à creatina com liberação de grupamentos fosfatos (MITCHELL; HEFFRON, 1982). A LDH é uma enzima da classe das oxi-redutases, em que seu sítio ativo é formado pelos resíduos arginina 171 e histidina 195. Estes aminoácidos englobam a molécula de piruvato, produto da glicólise e promovem a sua redução pela adição de hidreto fornecido pelo cofator Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NADH), produzindo lactato, responsável pelo declínio do pH muscular (VOET; VOET, 2009). Quando a atividade desta enzima está elevada, como é o caso de suínos PSS, o declínio do pH é mais acelerado, dando origem às carnes PSE (MITCHELL; HEFFRON, 1982, PUOLANNE, 2002).

A ação do halotano em frangos foi investigada pelo nosso grupo de pesquisa (SOARES et al., 2007; MARCHI et al., 2009; ZIOBER et al., 2009) e foi observado uma relação entre a sensibilidade ao halotano e ocorrência de carnes PSE (MARCHI et al., 2009). Porém, em frangos ainda não foi

esclarecido se as atividades das enzimas CK e LDH estão relacionadas com a sensibilidade ao halotano. Assim, objetivo deste trabalho foi determinar as atividades das enzimas CK e LDH em frangos sensíveis e não sensíveis ao halotano para identificação da susceptibilidade ao estresse e ao desenvolvimento de carnes PSE.

## Material e Métodos

### *Animais*

Os frangos machos de linhagem comercial foram criados na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina até a realização do teste com o anestésico halotano.

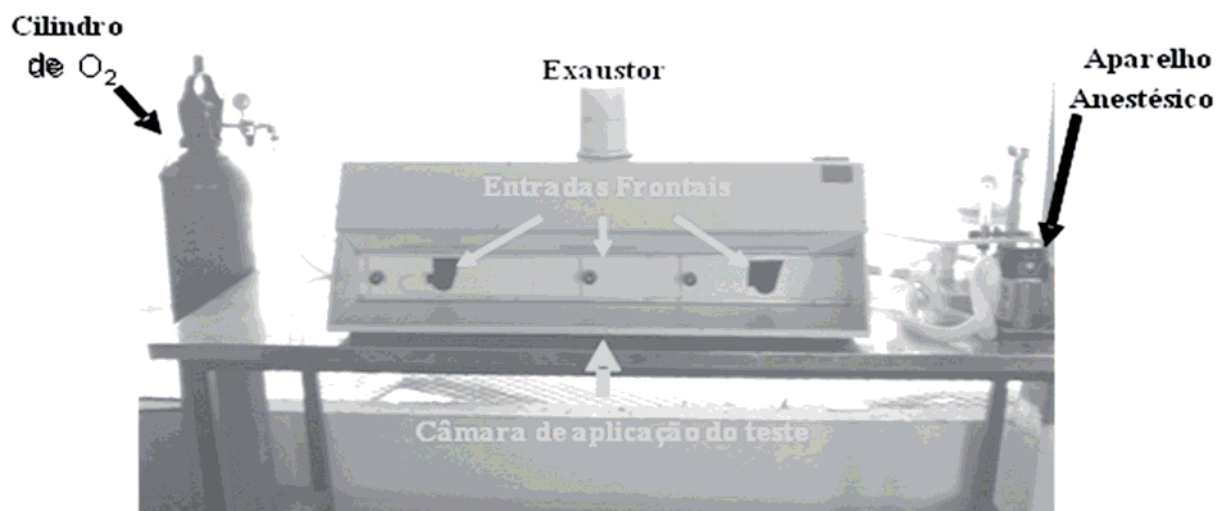
### *Teste de sensibilidade ao anestésico halotano*

Este teste foi realizado com o auxílio de uma câmara (Figura 1) desenvolvida por Marchi et al. (2009). Esta câmara apresenta dimensões internas de 12x12x100 cm e três entradas frontais para introdução das cabeças dos frangos. A câmara foi

interligada a um aparelho de anestesia veterinária acoplado a um cilindro de oxigênio.

Para aplicação do teste de sensibilidade ao anestésico halotano, o oxigênio foi liberado do cilindro, com uma vazão de 6 L.min.<sup>-1</sup>, até atingir o aparelho de anestesia veterinária, no qual foi misturado com o halotano a uma concentração de 3,0%, sendo então, enviado para a câmara e inalado pelos frangos por um período de 5 min. (MARCHI et al., 2009). Durante a inalação, os frangos foram avaliados quanto à sensibilidade ao halotano, através da observação do enrijecimento dos membros inferiores dos animais realizada por três julgadores aleatórios e um julgador fixo. Assim, os frangos foram classificados conforme descrito por Marchi et al. (2009) em sensíveis ao halotano (HAL<sup>+</sup>), em que ocorre o enrijecimento de um ou dois membros inferiores e não-sensíveis ao halotano (HAL<sup>-</sup>), com ausência de enrijecimento. Após a realização do teste de sensibilidade ao halotano, os frangos permaneceram desacordados por aproximadamente 2 a 3 min., confirmando o efeito anestésico. Em seguida, os frangos foram divididos em HAL<sup>+</sup> e HAL<sup>-</sup>.

Figura 1. Câmara para aplicação do teste com halotano.



Fonte: (MARCHI et al., 2009).

### Coleta de Sangue

Após 3 h e 48 h da aplicação do teste de sensibilidade ao halotano, cerca de 5 mL de sangue foram coletados da asa (Figura 2) dos frangos HAL<sup>+</sup> e HAL<sup>-</sup> (n=12 para cada grupo) com o auxílio de

uma seringa de 5 mL e agulha (0,7 x 2,5 mm). O sangue foi armazenado em tubos plásticos (12 x 75 mm) com tampa para posterior extração do soro sanguíneo.

**Figura 2.** Coleta de sangue da asa de frango realizada após 3 e 48 h da aplicação do teste de sensibilidade ao halotano.



Fonte: Elaboração dos autores.

### Obtenção do soro sanguíneo

Os tubos plásticos contendo o sangue coletado foram mantidos em repouso por 2 a 4 h para a dessoração sanguínea e consequente obtenção do soro. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 2500 rpm por 10 min. O soro (sobrenadante) foi armazenado em tubos plásticos com tampa e congelados à  $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$  por um período máximo de 3 meses para análises enzimáticas.

### Análises das atividades das enzimas CK e LDH

As análises das atividades das enzimas CK e LDH foram realizadas no auto analisador bioquímico da marca Bayer, modelo ADVIA 1650 através de kit enzimáticos. A atividade de CK foi determinada segundo metodologia descrita por Oliver (1955) e Rosalki (1967), modificada por Tietz (1986). A N-acetil-L-cisteína (NAC) foi incluída na reação

para assegurar a total ativação da CK no soro. A atividade de CK foi expressa em U.L<sup>-1</sup>. A atividade de LDH foi determinada pela conversão de piruvato a lactato na presença de NADH e a oxidação do NADH foi medida no espectrofotômetro a 405 nm. A atividade de LDH foi expressa em U.L<sup>-1</sup>.

### Análise estatística

O teste t-Student a 5% de probabilidade foi aplicado para comparação dos resultados entre os grupos HAL<sup>+</sup> e HAL<sup>-</sup> utilizando o programa *STATISTICA for Windows* versão 7.0.

### Resultados e Discussão

A Tabela 1 apresenta as atividades de CK e LDH, ambas realizadas no soro sanguíneo dos frangos submetidos ao teste com o anestésico halotano.

**Tabela 1.** Atividades de Creatina Quinase (CK) e Lactato Desidrogenase (LDH) em frangos Sensíveis (HAL<sup>+</sup>) e Não-sensíveis ao halotano (HAL<sup>-</sup>), coletados após 3 e 48 h da aplicação do teste com o anestésico halotano a 3% por 5 min.

Enzima	Tempo de Coleta	HAL <sup>+</sup>	HAL <sup>-</sup>
CK (U.L <sup>-1</sup> )	3h (n=12)	4606,8 <sup>aA</sup> ± 1291,1	4914,5 <sup>aA</sup> ± 1172,8
	48h (n=12)	3847,2 <sup>aA</sup> ± 1625,9	4051,3 <sup>aA</sup> ± 1693,1
LDH (U.L <sup>-1</sup> )	3h (n=12)	2004,9 <sup>aA</sup> ± 472,10	1390,6 <sup>bA</sup> ± 515,4
	48h (n=12)	2081,0 <sup>aA</sup> ± 782,0	1253,0 <sup>bA</sup> ± 519,1

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste *t-student* a 5,0% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna, entre as mesmas análises, diferem entre si pelo teste *t-student* a 5,0% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ).

± Desvio-padrão.

**Fonte:** Elaboração dos autores.

A coleta de sangue 48 h após o teste do halotano foi destinada para avaliação do efeito de possíveis fatores ambientais comuns nas práticas de manejo pré-abate. Segundo Mitchell (1999), que investigaram os efeitos da exposição de aves ao halotano, este anestésico promove, independente da positividade das aves ao teste, aumentos significativos nas atividades de CK e LDH permanecendo por no máximo 48 h.

A atividade da enzima CK, não foi significativamente diferente ( $p \geq 0,05$ ) tanto entre os grupos HAL<sup>+</sup> e HAL<sup>-</sup> quanto entre os diferentes tempos de coleta do soro (Tabela 1). A similaridade entre os valores obtidos pode estar relacionada com o elevado desvio-padrão encontrado, originando um elevado coeficiente de variação superior a 20% em todos os grupos. Embora estudos relacionem a atividade de CK com a PSS e também com estresse de origem não genética (MITCHELL; HEFFRON, 1982; MITCHELL; SANDRECOCK; COOKE, 2003) alguns autores já demonstraram dificuldades em se encontrar diferenças significativas entre a atividade de CK em suínos normais e susceptíveis ao estresse devido à alta variabilidade dos resultados encontrados, sem conclusões quanto a sua causa (NELSON et al., 1974; FÀBREGA et al., 2004).

Mitchell e Heffon (1982) atribuem a elevada variabilidade da atividade de CK em suínos a três fatores: 1) variação diurna que pode ter um aumento de até 50%, 2) relação com a atividade muscular e

3) idade do animal, que segundo os autores seria a mais importante, pois a atividade máxima de CK está relacionada com o pico do anabolismo protéico, que ocorre entre 11 e 28 semanas de idade, tornando difícil a distinção das atividades de CK em suínos nessa faixa de idade. Em relação às medidas da atividade de LDH, diferenças ( $p < 0,05$ ) foram observadas entre os grupos HAL<sup>+</sup> e HAL<sup>-</sup>, tanto para o tempo de 3 h quanto para o tempo de 48 h após o teste. A atividade desta enzima mostrou-se 44,2% e 66,1% superior nas aves do grupo HAL<sup>+</sup> nos tempos de 3 e 48 h, respectivamente. A elevada atividade desta enzima em frangos sensíveis ao anestésico demonstra que a conversão de piruvato a lactato é acelerada nestes animais (PUOLANNE, 2002). Assim, a rápida produção de lactato leva a um acentuado declínio do pH muscular, o qual pode originar as carnes PSE. Segundo Marchi et al. (2009), frangos HAL<sup>+</sup> apresentam maior propensão ao desenvolvimento de carnes PSE, e consequentemente qualidade inferior da sua carne (OLIVO; SHIMOKOMAKI, 2006). Dessa forma, a avaliação da atividade enzimática da LDH poderia ser utilizada previamente para verificar a propensão de um animal apresentar sua carne com qualidade comprometida em decorrência do desenvolvimento desta anomalia. Estes resultados são semelhantes aos evidenciados pela literatura (MITCHELL; HEFFRON, 1982; PUOLANNE, 2002), onde os autores afirmaram que a atividade de LDH

é aumentada em resposta a ações estressantes e também em suínos com maior susceptibilidade ao estresse. Portanto, estes resultados indicam que o halotano é um agente identificador e desencadeador de estresse em frangos, em decorrência das maiores atividades observadas tanto no tempo de 3 h quanto no de 48 h após a aplicação do teste do halotano.

Em conclusão, a creatina quinase (CK) não se mostrou eficaz na identificação de frangos sensíveis ao anestésico halotano (HAL<sup>+</sup>), enquanto que o uso da lactato desidrogenase (LDH) pode ser uma ótima alternativa para identificar animais sensíveis ao estresse, com conseqüente problema na qualidade da sua carne.

## Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq/MCT pelo financiamento desta pesquisa (Proc# 475503/2009-0). DFM à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES/MEC pela bolsa de Doutorado. MS e EII são bolsistas Produtividade do CNPq.

## Referências

- ANTHONY, N. B. A review of genetic practices in poultry: efforts to improve meat quality. *Journal of Muscle Foods*, Trumbull, v. 9, n. 1 p. 25-33, 1998.
- BARBUT, S.; SOSNICKI, A. A.; LONERGAN, S. M.; KNAPP, T.; CIOBANU, D. C.; GATCLIFFE, L. J.; HUFF-LONERGAN, E.; WILSON, E. W. Progress in reducing the pale, soft and exudative (PSE) problem in pork and poultry meat. *Meat Science*, Amsterdam, v. 79, n. 1, p. 46-63, 2008.
- BERTOL, T. M. Effects of dietary supplementation with L-carnitine and fat on blood acid-base responses to handling in slaughter weight pigs. *Journal Animal Science*, Madison, v. 83, n. 7, p. 75-81, 2005.
- BREWER, M. S.; McKEITH, F. K. Consumer-rated quality characteristics as related to purchase intent of fresh pork. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 64, n. 1, p. 171-174, 1999.

CANDEK-POTOKAR, M.; ZLENDER, B.; FEFAUCHER, L.; BONNEAU, M. Effects of age and/or weight at slaughter on *longissimus dorsi* muscle: biochemical traits and sensory quality in pigs. *Meat Science*, Amsterdam, v. 48, n. 3-4, p. 287-300, 1998.

FÀBREGA, E.; MANTECA, X.; FONT, J.; GISPERT, M.; CARRION, D.; VELARDE, S.; RUIZ-DE-LA TORRE, J. L.; DIESTRE, A. A comparison of halothane homozygous negative and positive pietrain sire lines in relation to carcass and meat quality, and welfare traits. *Meat Science*, Amsterdam, v. 66, n. 4, p. 777-787, 2004.

FUJII, J.; OTSU, K.; ZORATO, F.; DELEON, S.; KHANNA, V. K.; WEILER, J.; O'BRIEN, P. J.; MACLENNAN, D. H. Identification of a mutation in the porcine ryanodine receptor that is associated with malignant hyperthermia. *Science*, Washington, v. 253, n. 2, p. 448-451, 1991.

MARCHI, D. F.; OBA, A.; ZIOBER, I. L.; SOARES, A. L.; IDA, E. I.; SHIMOKOMAKI, M. Development of a gas chamber for detecting broiler chicken halothane sensitivity and PSE (Pale, soft, exudative) meat formation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, v. 52, p. 189-194, 2009. Especial.

MITCHELL, G.; HEFFRON, J. J. A. Porcine stress syndromes. *Advances in Food Research*, New York, v. 28, p. 167-230, 1982.

MITCHELL, M. A. Skeletal muscle damage following halothane anaesthesia in the domestic fowl: plasma biochemical responses. *Research in Veterinary Science*, Oxford, v. 67, n. 1, p. 59-64, 1999.

MITCHELL, M. A.; SANDRECOCK, D. A.; COOKE, V. E. Seleção para rendimento de carne e indução de miopatia idiopática: implicações para o bem-estar de frangos. In: CONFERÊNCIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, APINCO, 2003, Campinas. *Anais...* Campinas: Premio Lamas, 2003. p. 217-233.

NELSON, T. E.; JONES, E. W.; HENRICKSON, R. L.; FALK, S. N.; KERR, D. D. porcine malignant hyperthermia: observations on the occurrence of pale, soft, exudative muscle among susceptible pigs. *American Journal of Veterinary Research*, Washington, v. 35, n. 3 p. 347-350, 1974.

OLIVER, I. T. A spectrophotometric method for the determination of creatine phosphokinase and myokinase. *Biochemical Journal*, San Diego, v. 61, n. 1, p. 116, 1955.

OLIVO, R.; SHIMOKOMAKI, M. Carnes PSE em aves. In: SHIMOKOMAKI, M.; OLIVO, R.; TERRA, N. N.; FRANCO, B. D. G. M. *Atualidades em ciência e tecnologia de carnes*. São Paulo: Varela, 2006, p. 95-103.

- OLIVO, R.; SOARES, A. L.; IDA, E. I.; SHIMOKOMAKI, M. Dietary vitamin e inhibits poultry PSE and improves meat function properties. *Journal of Food Biochemistry*, Trumbull, v. 25, n.4, p. 271, 2001.
- POSO, A. R.; PUOLANNE, E. Carbohydrate metabolism in meat animals. *Meat Science*, Amsterdam, v. 70, n. 3, p. 423-434, 2005.
- PUOLANNE, E. J. Lactic acid in muscle and its effects on meat quality. In: RECIPROCAL MEAT CONFERENCE, 55., 2002, Roma. *Proceedings...*Roma: ICOMST, 2002. p. 160.
- ROSALKI, S. B. An improved procedure for serum creatine phosphokinase determination. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, St Louis, v. 69, p. 696-705, 1967.
- SOARES, A. L.; IDA, E. I.; MIYAMOTO, S.; HERNÁNDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; OLIVO, R.; PINHEIRO, J.; SHIMOKOMAKI, M. Phospholipase A2 activity in poultry PSE, pale, soft, exudative, meat. *Journal of Food Biochemistry*, v. 27, n. 4, p. 309-320, 2003.
- SOARES, A. L.; SANTOS, T. N.; MARCHI, D. F.; OBA, A.; IDA, E. I.; SHIMOKOMAKI, M. Similaridades entre os sintomas da síndrome do estresse das aves (PtSS) e da síndrome do estresse suíno (PSS), originando as carnes PSE de frangos. *Revista Nacional da Carne*, São Paulo, v. 31, n.1, p. 69-74, 2007.
- TIETZ, N. W. Textbook of clinical chemistry, p. 52-53. In: TIETZ, N. W.; BURTIS, C. L.; ASHWOOD, E. R. *Textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. 4. ed. Philadelphia, PA: W. B. Saunders Co., 1986. p. 52-53.
- VOET, D.; VOET, J. G. Enzymes. In: VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. *Fundamentals of biochemistry*. 2. ed. Madrid, Espanha: Medica Panamericana S. A., 2009. p. 315-435.
- ZIOBER, I. L.; PAIAO, F. G.; MARIN, S. R. R.; MARCHI, D. F.; BINNECK, E.; NEPOMUCENO, A.; COUTINHO, L. L.; SHIMOKOMAKI, M. Molecular cloning of  $\alpha$ -RYR hotspot region 1 from broiler chicken. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, v. 52, p. 225-231, 2009. Especial.

