



GIOVANNA TAVARES PETRUCELLI

**MARCADORES MOLECULARES EM AVES SOB
CONDIÇÕES DE ESTRESSE**

**LAVRAS – MG
2019**

GIOVANNA TAVARES PETRUCELLI

MARCADORES MOLECULARES EM AVES SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal de
Lavras, como parte das exigências do
Curso de Zootecnia, para a obtenção do
título de Bacharel.

Prof^ª Dra. Ana Paula Peconick
Orientadora

**LAVRAS – MG
2019**

GIOVANNA TAVARES PETRUCELLI

MARCADORES MOLECULARES EM AVES SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE

MOLECULAR MARKERS IN POULTRY UNDER STRESS CONDITIONS

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal de
Lavras, como parte das exigências do
Curso de Zootecnia, para a obtenção do
título de Bacharel.

APROVADO em 21 de novembro de 2019.

Dra. Ana Paula Peconick UFLA

MSc. Lucas Januzzi Lara UFLA

Maria Cristina de Sousa Silva UFLA

Prof^ª Dra. Ana Paula Peconick
Orientadora

**LAVRAS – MG
2019**

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar esperanças para continuar a cada dia.

Ao meu pai, Nilton, e à minha mãe, Margarete, por serem os melhores do mundo, acreditarem na minha capacidade e estarem sempre comigo, mesmo que distantes.

Aos meus avós, que em nenhum momento mediram esforços para me ajudar e sempre me incentivaram.

À minha família como um todo, que contribuiu positivamente com a minha formação, em especial ao meu tio Ju.

A todos os meus amigos, principalmente os que fiz ao longo do curso, os quais participaram das minhas conquistas desde que esse sonho começou, até se tornar realidade, em especial às amigas Cecília, Jenifer, Maisa, Maria Cristina, Mariana e Victória.

À minha orientadora e amiga Prof^a Dra. Ana Paula Peconick, pela orientação e, principalmente, por ser um exemplo excepcional de professora e uma pessoa incrível.

Aos membros da banca de defesa, MSc. Lucas Januzzi Lara e Maria Cristina da Silva Souza, por todo o apoio, ensinamento e paciência que tiveram.

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Medicina Veterinária (DMV) e, em especial, ao Departamento de Zootecnia (DZO), por todas as oportunidades que me foram dadas.

Ao Laboratório de Epidemiologia Molecular da Universidade Federal de Lavras, por me dar a oportunidade de aprendizado através do estágio.

“Enquanto houver um louco, um poeta e um amante haverá sonho, amor e fantasia. E enquanto houver sonho, amor e fantasia, haverá esperança”.

(William Shakespeare)

RESUMO

O estresse pode ser definido por uma resposta do organismo frente às adversidades do meio. Para aves essa resposta pode estar atrelada a situações como restrição alimentar e hídrica, desconforto térmico, manejo inadequado dos animais, entre outros. Esse estresse pode causar danos à saúde do animal bem como trazer prejuízos econômicos ao produtor. Apesar das inúmeras pesquisas relacionadas ao estresse na avicultura, poucos são os estudos referentes à imunologia e marcadores moleculares das aves. Dessa forma fazem-se relevantes as pesquisas envolvendo marcadores moleculares em aves, onde futuramente esses estudos poderão auxiliar na identificação da persistência dos efeitos do estresse nesses animais, havendo assim uma possibilidade de prevenção. O estágio supervisionado como disciplina obrigatória do curso de Zootecnia, foi realizado no Laboratório de Epidemiologia Molecular (LEM), durante o primeiro semestre de 2019, com o objetivo de acompanhar técnicas como, extração do RNA total, síntese de cDNA por RT-PCR e reação em cadeia de polimerase com cDNA, as quais estão envolvidas na busca por marcadores moleculares em aves submetidas ao estresse térmico por alta temperatura. Ao final desse estágio foi possível associar a importância que esses marcadores têm no campo da Zootecnia por estarem relacionados com a identificação de pontos críticos de manejo na produção animal como um todo.

Palavras-chave: Avicultura. Imunologia. Biotecnologia. PCR. Bem-Estar Animal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Setor de Medicina Veterinária Preventiva do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras.	15
Figura 2 - Salas do Laboratório de Epidemiologia Molecular (LEM)	16
Figura 3 - SV Total RNA Isolation System (Promega®).....	19
Figura 4 - Agitador vórtex	19
Figura 5 - Centrífuga Eppendorf refrigerada.....	20
Figura 6 - Extração do RNA total.....	20
Figura 7 - GoScript™ Reverse Transcription System for RT-PCR (Promega®)	21
Figura 8 – Eletroforese em gel de agarose	22
Figura 9 - Análise do gel de agarose	25
Figura 10 - Resultado da análise do gel de agarose.....	25

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Iniciadores utilizados como possíveis marcadores moleculares	22
Quadro 2 - Concentração de RNA mensageiro de fígado e intestino delgado de frangos de corte desafiados ao estresse térmico por fonte de calor.....	24

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 Sistema Imunológico das Aves	11
2.2 Bem-Estar na Avicultura	12
2.3 Estresse em Aves	13
2.4 Marcadores Moleculares.....	13
3 ESTÁGIO NO LABORATÓRIO DE EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR (LEM) DO DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS (UFLA)	14
3.1 Local e Período do Estágio.....	14
3.2 Caracterização do Laboratório de Epidemiologia Molecular – UFLA	15
3.3 Instalações do Laboratório de Epidemiologia Molecular – UFLA	15
4 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO LABORATÓRIO DE EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR - UFLA	17
4.1 Delineamento Experimental	17
4.2 Extração do RNA Total.....	18
4.3 Síntese de cDNA por RT-PCR.....	20
4.4 Reação em Cadeia de Polimerase com cDNA	21
5 DISCUSSÃO DAS ATIVIDADES	22
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	25
REFERÊNCIAS	26

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a avicultura de corte vem crescendo e se destacando de forma positiva no setor da produção animal, por conta da facilidade de criação desses animais, gerando cada vez mais empregos e contribuindo com a economia do país (OLIVEIRA et al., 2019). O Brasil tem mostrado grande potencial neste setor, sendo atualmente o maior exportador de carne de frango do mundo, responsável pela exportação de 3,687 milhões de toneladas no ano de 2018 (EMBRAPA, 2018).

Dentre as fontes proteicas de origem animal disponíveis para consumo no mercado brasileiro a que mais se destaca é a carne de frango, principalmente por questões econômicas (MORAES; CAPANEMA, 2012). Segundo a EMBRAPA a carne de frango foi a proteína mais consumida no país no ano de 2018, chegando a 42 kg de carne por pessoa. Associado ao aumento do consumo, vem o aumento das exigências por parte dos consumidores, que buscam uma carne de melhor qualidade, a qual está diretamente relacionada aos padrões de sanidade e bem-estar animal, levando o produtor a considerar as questões éticas de manejo e abate (RODRIGUES et al., 2016).

O estresse pode ser compreendido por uma reação desencadeada pelo organismo frente a uma situação, podendo esta ser ou não relacionada ao ambiente, com o objetivo de reestabelecer a homeostase (SILVA; GOULART; GUIDO, 2018). Esse estresse causado ao animal, pode ser tanto agudo quanto crônico, provocando danos à sua saúde, além de alterar a qualidade do produto final de maneira indesejável ao consumidor (ADZITEY; NURUL, 2011).

Em vista da importância do bem-estar e das perdas econômicas no setor produtivo de aves por conta do estresse, faz-se necessária a busca por novas tecnologias que visem identificar e amenizar esse problema, melhorando a qualidade de vida desses animais e minimizando as perdas sofridas pelo produtor (ALVES et al., 2016). Através de estudos relacionados à tecnologia do DNA, na década de 70, a biotecnologia vem sendo aproveitada com a finalidade de se adquirir informações genéticas com base no DNA (COUTINHO; ROSÁRIO; JORGE, 2010). A partir da análise de material genético aliado a essas tecnologias tornou-se possível o sequenciamento do genoma, que contribuiu para o desenvolvimento de uma série de marcadores moleculares (REGITANO; VENERONI, 2009).

Dessa forma, o estudo de marcadores moleculares se apresenta como linha de pesquisa recente e de grande relevância na avicultura, uma vez que existe pouco conteúdo que trata a respeito da influência contínua resultante do estresse ao longo da vida do animal (LARA, 2017). Nesse contexto, marcadores são relevantes em pesquisas, propiciando um rápido

reconhecimento do estresse nas aves e também o efeito que este exerce sobre as mesmas, permitindo que seja tomada uma medida para minimização do dano causado pelo mesmo.

O estágio no LEM foi realizado com o objetivo de aprender procedimentos e técnicas envolvidos na busca por marcadores moleculares de aves, através do acompanhamento da rotina de laboratório e práticas referentes às pesquisas do doutorando responsável pelo projeto de “Determinação de marcadores moleculares na resposta imunológica de aves submetidas ao estresse térmico pelo calor”.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Sistema Imunológico das Aves

O sistema imunológico é responsável por evitar e controlar infecções no indivíduo através de respostas, sendo estas classificadas como resposta imune inata e resposta imune adaptativa (ABBAS; LICHTMAN, 2007). A imunidade inata pode ser entendida como a primeira linha de defesa do organismo frente a patógenos, sem que anteriormente tenha havido algum contato com agentes infecciosos (CRUVINEL et al., 2010). Por outro lado, a imunidade adquirida é um tipo de imunidade específica que atua sobre organismos invasores específicos e toxinas, havendo a formação de anticorpos e/ou linfócitos ativados (GUYTON; HALL, 2006).

Nas aves, é considerado órgão linfoide primário o timo e a bursa de Fabricius (parte da cloaca das aves) onde ocorre o amadurecimento dos linfócitos T e B respectivamente, e como órgão linfoide secundário, o baço. Ao longo do trato gastrointestinal (TGI) existem estruturas linfoides que atuam como uma barreira contra patógenos (RUTZ et al., 2002). Essas estruturas linfoides do trato gastrointestinal são de suma importância no sistema imunológico das aves, pois na luz do tubo digestivo pode haver inúmeros patógenos. Como estruturas do trato gastrointestinal podemos citar as placas de Peyer, tonsilas cecais, divertículo de Meckel e o tecido linfoide associado ao tecido intestinal, conhecido como sistema GALT (GERTNER; SANTIN; SAAD, 2008).

A principal defesa do sistema imune no TGI de frangos de corte é o GALT, este é capaz de desencadear respostas a patógenos como bactérias, vírus e parasitas que acometem o TGI desses animais (MAST, 1999; KLIPPER et al., 2000). Além do GALT, outra linha de defesa eficaz do sistema imune na defesa do organismo é a síntese de imunoglobulinas.

As imunoglobulinas têm papel importante na imunologia das aves, são glicoproteínas sintetizadas por células B e podem ser divididas da seguinte forma: IgM, IgA e IgY. Em aves, a IgY atua na defesa contra infecções sistêmicas e também é responsável pelas reações anafiláticas, sendo produzidas após a resposta secundária, IgMs são produzidas na resposta primária, sendo imunoglobulinas de fase aguda e as IgAs são imunoglobulinas efetoras na mucosa (2002 citado por MACARI et al.; FERNANDES et al., 2013, p. 137).

2.2 Bem-Estar na Avicultura

A qualidade de vida dos animais é caracterizada pelo conceito de bem-estar, o qual compreende as “cinco liberdades”, onde estão presentes as condições as quais os animais não devem estar sujeitos durante o período de criação, de acordo com esses fundamentos, os animais devem estar livres de medo e angústia, livres de dor, sofrimento e doenças, livres de fome e sede, livres de desconforto e livres para expressar seu comportamento natural (ARAÚJO, 2018).

Nos últimos anos o conforto e bem-estar dos animais de produção vem se destacando no setor agropecuário, o qual tornou-se uma exigência dos consumidores e, conseqüentemente, levado inúmeros produtores a tomarem medidas com a finalidade de propiciar bem-estar a esses animais, possibilitando, assim, atender a este mercado consumidor mais consciente (CEBALLOS; SANT'ANNA, 2018).

Os animais, no geral, são influenciados diretamente pelo ambiente no qual estão inseridos e através do conhecimento de seus comportamentos e de sua fisiologia é possível identificar se este encontra-se ou não em condições de bem-estar. Em frangos de corte, por exemplo, é possível observar a influência do ambiente através do consumo de água e ração, onde, em situações de estresse térmico por calor o consumo de água aumenta enquanto que o consumo de ração diminui (MOURA et al., 2010).

Além do estresse térmico, durante o período pré-abate as aves passam por condições de desconforto, como a restrição alimentar e hídrica, altas densidades no transporte e em alguns casos são submetidas a longas viagens para chegar ao destino final. Tais situações comprometem o bem-estar das mesmas, a qualidade do produto final e podem levar a morte dos animais (DA SILVA BRAGA et al., 2018). Dessa forma o bem-estar no sistema avícola é fundamental, uma vez que, prioriza a saúde dos animais, conferindo-lhes condições adequadas até o momento do abate e como resultado permite que o consumidor adquira uma carne de boa qualidade e dentro dos padrões éticos.

2.3 Estresse em Aves

A conversão de alimentos em proteína animal vem avançando consideravelmente na avicultura, onde produz-se mais em menos tempo, contudo, essa alta eficiência tem ocasionado às aves inúmeros problemas metabólicos e de manejo, dentre eles destaca-se o estresse calórico. À medida que as aves saem de seu conforto térmico, a dissipação de calor diminui, aumentando assim sua temperatura corporal e conseqüentemente prejudicando seu desempenho (BORGES; MAIORKA; SILVA, 2003).

As aves também sofrem durante o manejo pré-abate por conta do micro e macro climas ao qual são submetidas durante o transporte e pelo tempo de espera até o momento do abate, situações essas que também causam estresse a esses animais (BAYLISS; HINTON, 1990). O desconforto causado às aves afeta as condições de bem-estar e o estresse por conta do manejo na captura até o final do transporte altera o comportamento das mesmas, tornando-as suscetíveis a lesões que comprometem sua saúde (MITCHELL, 2009).

Em situação de exposição ao estresse calórico, por exemplo, há um retardo na síntese da maioria das proteínas. Contudo, as proteínas de choque térmico (HSP) são altamente conservadas, sendo rapidamente sintetizadas (AL-AQIL; ZULKIFLI, 2009). Essas proteínas são de grande relevância na sobrevivência de células submetidas ao estresse (GABAI et al., 1997). Estudos em que se relaciona as proteínas do choque térmico ao estresse em aves concluíram que nessas condições há secreção de HSP70, a qual tem efeito significativo na proteção intestinal das mesmas (GU; TANG; YANG, 2012; GU; HAO; WANG, 2012).

2.4 Marcadores Moleculares

Marcador molecular pode ser entendido como um segmento específico de DNA localizado em um loco, também conhecido como marcador genético. Como os marcadores moleculares são considerados estáveis e estão presentes em todos os tecidos, tornam-se mais eficientes que avaliações baseadas em características fenotípicas, uma vez que essas podem ter influências externas, como por exemplo, a influência ambiental (AGARWAL; SHRIVASTAVA; PADH, 2008).

Podemos classificar em duas categorias as técnicas básicas de marcadores moleculares, sendo elas: técnicas não baseadas em PCR e técnicas baseadas em PCR. A primeira não é muito usual por demandar tempo, ter custo mais elevado, necessitar de reagentes tóxicos e DNA

genômica de alta qualidade, além de ter uma metodologia mais complexa. Já a segunda, é comparativamente mais simples de ser executada e tem alta probabilidade de sucesso (AGARWAL; SHRIVASTAVA; PADH, 2008).

Esses marcadores podem ser úteis nas tomadas de decisão referentes ao manejo e criação dos animais, também são significativos na predição do estresse em aves, possibilitando a implementação de medidas a fim de reduzir perdas econômicas no sistema de produção e manter o bem-estar dos animais. O constante avanço na área da biotecnologia tem contribuído para a melhora da saúde dos animais em sistemas de criação, conseqüentemente trazendo benefícios ao produtor (SINGH et al., 2014).

3 ESTÁGIO NO LABORATÓRIO DE EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR (LEM) DO DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS (UFLA)

3.1 Local e Período do Estágio

O estágio foi realizado no Laboratório de Epidemiologia Molecular (LEM), localizado no Setor de Medicina Veterinária Preventiva (FIGURA 1), inserido no Departamento de Medicina Veterinária (DMV) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), na cidade de Lavras - MG. O período de realização do estágio foi de 01 de abril de 2019 a 08 de julho de 2019, de Segunda à Sexta-Feira, no horário de 07h00 às 12h00, totalizando 340 horas. O estágio teve como supervisora a Prof^ª Dra. Ana Paula Peconick, graduada em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), mestre e doutora pela UFV e atualmente professora associada na UFLA, responsável pela área de Imunologia.

Figura 1 - Setor de Medicina Veterinária Preventiva do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras.



Fonte: Do autor (2019).

3.2 Caracterização do Laboratório de Epidemiologia Molecular – UFLA

O Laboratório de Epidemiologia Molecular da UFLA desenvolve trabalhos relacionados à saúde animal e coletiva, pesquisas de doenças e patógenos de interesse tanto no âmbito acadêmico bem como de interesse à comunidade. O laboratório também realiza análises para o Hospital Veterinário da UFLA, clínicas particulares e abrigo de animais, além de promover cursos e palestras para estudantes e profissionais da área.

Dessa forma o laboratório contribui tanto na área de pesquisa, com o desenvolvimento de atividades durante todo o ano, como na área de extensão, com a realização de eventos externos.

3.3 Instalações do Laboratório de Epidemiologia Molecular – UFLA

O laboratório apresenta estrutura física no Setor de Medicina Veterinária Preventiva localizado no Departamento de Medicina Veterinária (DMV) da UFLA.

A estrutura é composta por quatro salas (FIGURA 2):

- A. Primeira sala, é onde se encontra o depósito de materiais;
- B. Segunda sala, espaço para limpeza dos materiais, estufa, autoclave e capela;

C. Terceira sala, espaço para estudos com mesas e cadeiras, computador, equipamentos, microscópios e a área de proteômica.

D. Quarta e última sala, contém o freezer ultrafrio e as geladeiras.

O laboratório conta com dois professores de Imunologia e um de Epidemiologia, uma técnica graduada em Medicina Veterinária e mestre em ciência veterinária e alunos de graduação e pós-graduação das áreas de Biologia, Farmácia e Bioquímica, Medicina Veterinária, Nutrição e Zootecnia.

Nas salas há para usufruto dos graduandos, pós-graduandos e professores, mesas, bancadas, cadeiras, um computador, ar condicionado e armário para uso pessoal.

Figura 2 - Salas do LEM



Legenda: Salas do laboratório, sendo (A) Sala 1; (B) Sala 2; (C) Sala 3; (D) Sala 4;
Fonte: Do autor (2019).

4 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO LABORATÓRIO DE EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR - UFLA

4.1 Delineamento Experimental

No total, 72 frangos de corte foram divididos entre grupo controle (36 aves) e grupo estresse térmico (36 aves). Aos 14 dias de vida as aves foram desafiadas em túneis controlados para temperatura e umidade. Os animais do tratamento térmico foram desafiados a uma temperatura e umidade de 35°C e 35% enquanto o grupo controle foi desafiado a 25 graus e 60%, respectivamente. As eutanásias foram realizadas imediatamente após, 6 horas e 30 horas pós desafio e 28 dias pós desafio. O número de protocolo da Comissão Ética no Uso de Animais/UFLA é 043/2018.

Amostras de sangue, fígado, intestino, tonsilas cecais e baço foram coletadas e criopreservadas. Para a extração de proteína, foram utilizados kits comerciais padronizados e leitura com espectrometria de massa com o intuito de conseguir perceber a expressão e a quantidade do expresso proteico entre os grupos.

O período experimental foi de 42 dias, sendo que as aves foram mantidas no galpão experimental localizado no Setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia da UFLA e os túneis controlados localizados no Departamento de Engenharia Agrícola da mesma Universidade.

Ao chegarem, as aves foram divididas em dois grupos e mantidas no chão, em círculos de proteção, forrados com cama de pó maravalha e, aquecidas por meio de campânula a gás. A temperatura e umidade relativa do ar foram monitoradas por meio de termômetro digital espalhados de forma homogênea dentro do círculo de proteção e, esses parâmetros foram verificados a cada 3 horas para manter a integridade do manual da linhagem. O experimento teve início a partir do 14º dia de vida para que as aves pudessem se ambientar e para que houvesse diminuição do estresse pelo transporte e manuseio das mesmas, nessa fase a temperatura foi de $32 \pm 1^\circ\text{C}$.

As aves foram divididas e distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado, constituído por dois tratamentos com 12 aves por unidade experimental. A ração experimental foi basal para os dois tratamentos, respeitando as fases de vida e suas respectivas exigências nutricionais, sendo formulada à base de milho e farelo de soja, seguindo as recomendações descritas por Vilar et al. (2007) e a composição química dos ingredientes utilizados na formulação obtida nas tabelas brasileiras, conforme Rostagno et al. (2011).

A ração foi fornecida à vontade em comedouros tipo tubular e água fornecida à vontade em bebedouros tipo infantil (na primeira fase), e o tipo pendular (a partir da segunda semana de vida). Foi adotado um programa de iluminação de 23 horas diárias. Até o dia do desafio experimental as aves tiveram um controle de temperatura padrão para a linhagem com temperatura de $32 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade de 80%, a partir do dia 1 a temperatura teve declínio de 3°C por semana (Sohail et al., 2015).

4.2 Extração do RNA Total

Para extração do RNA total das amostras foi utilizado o kit comercial SV Total RNA Isolation System (Promega®) (FIGURA 3). Primeiramente as amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e foi adicionado $175\mu\text{L}$ de RNA Lysis Buffer, invertidas 4 vezes e levadas ao vórtex (FIGURA 4), até que não houvesse traços visíveis de tecido. Foi transferido $175\mu\text{L}$ do lisado para o eppendorf e adicionado $350\mu\text{L}$ de RNA Dilution Blue, mexido por inversão e em seguida incubado à 70°C por 3 minutos e levado em centrífuga refrigerada (FIGURA 5) a 4°C por 10 minutos ($14.000 \times g$).

Em gelo, foram preparadas as colunas e os eppendorfs (2 para cada coluna), transferido $500\mu\text{L}$ do sobrenadante da amostra para o eppendorf e adicionado $200\mu\text{L}$ de etanol 95% gelado à amostra. Em seguida, todo o conteúdo foi transferido tudo para as colunas e centrifugado ($14000 \times g$) por 2 minutos, descartando o filtrado e adicionando $600\mu\text{L}$ de RNA Wash Solution à coluna e novamente centrifugado ($14000 \times g$) por 1 minuto e novamente descartado o filtrado.

Posteriormente, ainda em gelo, foi preparada a solução DNase ($40\mu\text{L}$ de Yellow Buffer, $5\mu\text{L}$ de $0,09\text{M}$ MnCl_2 e $5\mu\text{L}$ de DNase I, multiplicado pelo número de amostras), incubada por 15 minutos entre $20\text{-}25^\circ\text{C}$, adicionado $200\mu\text{L}$ de DNase Stop Solution e centrifugado ($14000 \times g$) por 1 minuto, adicionado $600\mu\text{L}$ de RNA Wash Solution e centrifugado novamente ($14000 \times g$) por 1 minuto.

Por fim, foi descartado o filtrado, adicionou-se $250\mu\text{L}$ de RNA Wash Solution e centrifugou-se ($14000 \times g$) por 2 minutos. Fez-se o preparo de novos eppendorfs, descartando os tubos antigos e passando as colunas para os novos tubos, foi adicionado $50\mu\text{L}$ de Nuclease Free Water, centrifugado ($14000 \times g$) por 1 minuto e armazenado em ultra freezer.

A integridade do RNA fora analisada pelo aparelho Nanovue e determinado por espectrofotometria nos comprimentos de onda 260 e 280nm as concentrações e o grau de pureza do material genético extraído.

Figura 3 - SV Total RNA Isolation System (Promega®)



Fonte: Do autor (2019).

Figura 4 - Agitador vórtex



Fonte: Do autor (2019).

Figura 5 - Centrífuga Eppendorf refrigerada



Fonte: Do autor (2019).

Figura 6 - Extração do RNA total



Fonte: Do autor (2019).

4.3 Síntese de cDNA por RT-PCR

Foi utilizado o kit comercial GoScript™ Reverse Transcription System for RT-PCR (Promega®) (FIGURA 7) para realizar a síntese da primeira fita de cDNA e as reações foram feitas em termocicladores. Inicialmente, fez-se o mix com 0,5µL de primer, completando com água até atingir o volume total de 5µL. Foi alocado em banho Maria a 70°C por 5 minutos, depois em gelo a 4°C por 5 minutos e em seguida levado ao vórtex, por fim, adicionou-se 15µL do mix em cada amostra e levado ao termociclador.

Após a formação da primeira fita de cDNA, a mesma foi estocada a -20°C , onde permaneceu até a sua utilização na reação em cadeia de polimerase.

Figura 7 - GoScript™ Reverse Transcription System for RT-PCR (Promega®)



Fonte: Do autor (2019).

4.4 Reação em Cadeia de Polimerase com cDNA

Através da técnica de PCR os fragmentos desejados de DNA foram amplificados através do uso do cDNA que fora produzido, usando diferentes pares de iniciadores (QUADRO 1). A reação foi constituída de 1X de PCR buffer 10X (100 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl); 2,5 mM de MgCl_2 ; 0,3 mM de dNTPs (ATP, TTP, CTP e GTP); 2 μl do cDNA; 2 U de Plantium® Taq DNA Polimerase; 0,4 μM dos iniciadores *forward* e *reverse*; Água deionizada autoclavada para completar um volume final de 25 μl .

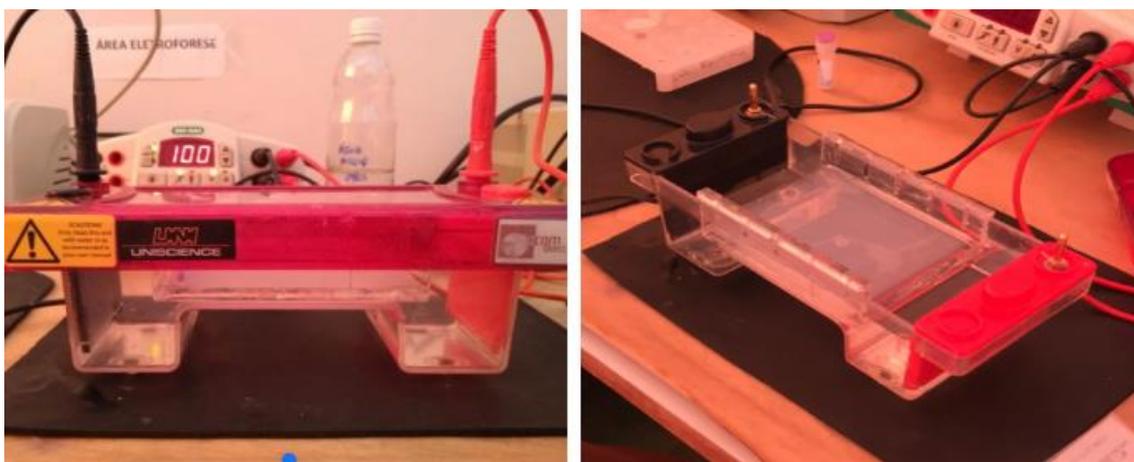
Para cada amostra foram realizadas três reações, sendo ao final 75 μL . Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo à 120 volts em cuba de eletroforese horizontal tendo TBE como tampão de corrida (FIGURA 8). Através do peso molecular foram identificadas as bandas de interesse com o auxílio do *Ladder*.

Quadro 1: Iniciadores utilizados como marcadores moleculares.

Iniciadores	Sequência genética
IL 12B	F: 5' AACTACACCTGCCTGTCTGC R: 3' TAGGACCTCACTACCAGGT
INF GAMMA RECEPTOR	F: 5' GGTAAGGAACGTCGCTGGA R: 3' CTAACTGAATCCCCCGTGG
HSP 70	F: 5' CTCCTGTTGGATGTCACCCC R: 3' TGGCTTTGGTCTACCGTCTC
IL 4 RECEPTOR	F: 5' GGAAGAAGGGCCGGGATCT R: 3' CAATTCGGGTCCTGAGGGTT
TCR GAMMA DELTA	F: 5' ATCCATCACCATGTCACGAGG R: 3' GAGCACTGTACCACTACCTAT
Gallus gallus GAPDH	F: 5' AGTCAACGGATTTGGCCGTA R: 3' TCAGTTGCCTAAACCGGCATR

Fonte: Do autor, 2019.

Figura 8 – Eletroforese em gel de agarose



Fonte: Do autor (2019).

5 DISCUSSÃO DAS ATIVIDADES

Utilizando uma pequena quantidade de amostra, foi quantificado e avaliado o nível de pureza do RNA extraído, foi utilizado um espectro de absorvância que foi lido em aparelho de

Nanovue, este forneceu um espectro completo e preciso. Em poucos segundos foram obtidos os resultados, sabendo-se que o pico de absorvância do RNA é a 260 nm, na qual uma leitura à 260 nm igual a 1.0 equivale a 40 μ g RNA/mL e proteínas apresentam pico de absorvância a 280 nm, conclui-se que 260/280 nm são valores utilizados para avaliar a contaminação por proteínas, sendo 2.0 o valor referência para a amostra estar livre destas. As extrações apresentaram bom resultado, uma vez que foram determinados valores de absorvância dentro do esperado (QUADRO 2).

Para que seja avaliada as condições da amostra, visualiza-se o RNA no gel de agarose (FIGURA 9), ou seja, é possível visualizar bandas que irão “correr” ao longo do gel, deixando rastros de RNA ribossomal (SAMBROOK; RUSSELL, 2002). Rastros abaixo da banda indica degradação, enquanto que rastros acima desta indica contaminação por DNA genômica, que prejudica o resultado final, sendo assim, para que este RNA seja aceitável as bandas devem estar bem definidas e não apresentar rastros.

O resultado obtido não foi desejável, uma vez que não houve apresentação de nenhum tipo de banda (FIGURA 10), dessa forma, percebe-se que o RNA que foi utilizado estava em condições ruins ou fatores externos influenciaram negativamente. Também é possível que as moléculas de RNA presentes não tenham sido desnaturadas durante o processo de RT-PCR, revelando um erro na programação das temperaturas nas etapas realizadas no termociclador.

Outro fator a ser analisado é o próprio gel, que pode ter influenciado negativamente no resultado, sendo que este pode ter sido contaminado durante o preparo. Até mesmo os utensílios utilizados na PCR podem conter proteínas que degradam o RNA, já que estes não foram usados exclusivamente para RNA. Outro motivo para tal resultado pode ter sido a presença de RNAses em algum material usado para a extração ou em vidrarias, uma vez que estas degradam moléculas de RNA e são resistentes a vários tratamentos térmicos, o que dificulta ainda mais o controle frente à contaminação.

Quadro 2 - Concentração de RNA mensageiro de fígado e intestino delgado de frangos de corte desafiados ao estresse térmico por fonte de calor.

#	Nome da amostra	Ng/ μ	A260	260/230
	Branco			
1	DT1	385,33	9,633	2,02
2	DT2	395,95	9,899	1,68
3	DC1	89,19	2.230	1,72
4	DC2	539,24	13.481	2,04
5	DC3	163,11	4.078	1,95
6	FC7	1273,89	31.847	2,00
7	FT3	64,51	1.613	0,82
8	FT7	832,23	20.806	1,77
9	FT6	701,41	17.535	1,94
10	FC6	883,01	22.075	1,76
11	FT5	1061,09	26.527	1,78
12	FT8	1166,48	29.162	1,86
13	FT9	709,28	17.732	1,75
14	FC1	45,41	1.135	0,80
15	FC12	695,05	17.376	2,07
16	FC10	416,39	10.410	1,87
17	FT10	-125,91	-3.148	1,78
18	FT11	822,94	20.573	2,00
19	FC8	527,09	13.177	1,79
20	FT12	286,12	7.153	1,34
21	FT2	784,06	19.601	1,66
22	FT1	840,14	21.004	1,70
23	FC1	438,69	10.967	1,49

Legenda: Intestino Delgado Tratamento Térmico (DT), Intestino Delgado Tratamento Controle (DC), Fígado Tratamento Térmico (DT) Fígado Tratamento Controle (FC).

Fonte: Do autor, 2019.

Figura 9 - Análise do gel de agarose



Fonte: Do autor (2019).

Figura 10 - Resultado da análise do gel de agarose



Fonte: Do autor (2019).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estágio realizado no laboratório de epidemiologia molecular possibilitou adquirir conhecimentos mais aprofundados em imunologia bem como proporcionou aprendizados referentes ao dia-a-dia de um laboratório, permitindo a compreensão da importância de procedimentos realizados de forma correta para a obtenção de resultados satisfatórios em pesquisas.

Os métodos realizados durante o estágio permitiram a aplicação prática de todo o conteúdo envolvido na busca por marcadores moleculares que fora abordado anteriormente na revisão de literatura deste trabalho de conclusão de curso, tornando possível o melhor

entendimento desses métodos. Apesar do resultado insatisfatório, a análise dos procedimentos permitiu que fossem encontrados possíveis erros que possam ter influenciado em tal resultado, os quais poderão ser corrigidos para um novo experimento.

As pesquisas levantadas em torno dos marcadores moleculares permitiram maior conhecimento a respeito da relevância da utilização destes dentro do sistema de criação de aves, de forma a tornar possível o rápido reconhecimento do estresse nas mesmas e viabilizar medidas de prevenção, as quais reduzem o prejuízo do produtor, do bem-estar das aves e consequentemente reduz os danos ao produto de origem animal consumido pela comunidade. Dessa perspectiva é possível associar essas metodologias ao trabalho do zootecnista, que visa a melhora na produtividade levando em conta o bem-estar dos animais. O presente projeto continua em andamento.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H. **Imunologia básica**. Elsevier Brasil, 2007.
- ADZITEY, F.; NURUL, H. Pale soft exudative (PSE) and dark firm dry (DFD) meats: causes and measures to reduce these incidences-a mini review. **International Food Research Journal**, v. 18, n. 1, 2011.
- AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant cell reports**, v. 27, n. 4, p. 617-631, 2008.
- AL-AQIL, A.; ZULKIFLI, I. Changes in heat shock protein 70 expression and blood characteristics in transported broiler chickens as affected by housing and early age feed restriction. **Poultry science**, v. 88, n. 7, p. 1358-1364, 2009.
- ALVES, A.R. et al. Efeito do estresse sobre a qualidade de produtos de origem animal. **Pubvet**, v. 10, p. 448-512, 2016.
- ARAÚJO, Fernando Godinho de. Bem-estar e Ambiência das Aves. 2018.
- BAYLISS, P. A.; HINTON, M. H. Transportation of broilers with special reference to mortality rates. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 28, n. 1-2, p. 93-118, 1990.
- BORGES, S.A.; MAIORKA, A.; SILVA, A.V.F. Fisiologia do estresse calórico e a utilização de eletrólitos em frangos de corte. **Ciência Rural**, p. 975-981, 2003.

CEBALLOS, Maria Camila; SANT'ANNA, Aline Cristina. Evolução da ciência do bem-estar animal: aspectos conceituais e metodológicos. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 16, p. 1-24, 2018.

COUTINHO, L.L; ROSÁRIO, M.F.; JORGE, E.C. Biotecnologia animal. **Estudos avançados**, v. 24, n. 70, p. 123-147, 2010.

CRUVINEL, W.M. et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2010.

DA SILVA BRAGA, Janaina et al. O modelo dos “Cinco Domínios” do bem-estar animal aplicado em sistemas intensivos de produção de bovinos, suínos e aves. **Revista Brasileira de Zootecias**, v. 19, n. 2, 2018.

FERNANDES, D.C. et al. BIOLOGIA DO SISTEMA IMUNE DE AVES. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 17, n. 5, p. 131-140, 2013.

GABAI, V.L. et al. Hsp70 prevents activation of stress Kinases a novel pathway of cellular thermotolerance. **Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 29, p. 18033-18037, 1997.

GERTNER, L.R.S.; SANTIN, E.; SAAD, M.B. Influência da fumonisina sobre a resposta imunológica de aves: revisão bibliográfica. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 6, n. 3, p. 401-411, 2008.

GU, H; TANG, C.; YANG, Y. Psychological stress, immune response, and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 223, n. 1, p. 69-77, 2012.

GU, X. H.; HAO, Y.; WANG, X. L. Overexpression of heat shock protein 70 and its relationship to intestine under acute heat stress in broilers: 2. Intestinal oxidative stress. **Poultry Science**, v. 91, n. 4, p. 790-799, 2012.

GUYTON, A. C., HALL, J.A. **Textbook of Medical Physiology**. Philadelphia: Elsevier Inc. n, 11, p,439. 2006.

KLIPPER, E., SKLAN, D., FRIEDMAN, A. Immune response of chickens to dietary protein antigens. **Vet Immunol Immunopathol**, n,74, p,209–233. 2000.

LARA, L. J. DETERMINAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE AVES DE CORTE. 2017.

MAST, J., GODDEERIS, B.M. Development of immune competence of broiler chickens. **Vet Immunol Immunopathol**, n, 70, p,245–256.1999.

MITCHELL, M. A. et al. Welfare of poultry during transport—a review. In: **Poultry Welfare Symposium**. Cervia: Association Proceeding, 2009. p. 90-100.

MORAES, V.E.G.; CAPANEMA, L.X.L. A genética de frangos e suínos: a importância estratégica de seu desenvolvimento para o Brasil. **BNDES Setorial**, n. 35, mar. 2012, p. 119–154, 2012.

MOURA, Daniella Jorge de et al. Strategies and facilities in order to improve animal welfare. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 311-316, 2010.

OLIVEIRA, L.A. et al. **ESTUDO DO SETOR DE AVICULTURA BRASILEIRA: COM ÊNFASE NAS EXPORTAÇÕES DO PERÍODO DE 2008 A 2018**. 2019.

REGITANO, L.C.A.; VENERONI, G.B. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento animal. In: **Embrapa Pecuária Sudeste-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: SIMPÓSIO DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA À PRODUÇÃO ANIMAL, 2., 2009, São Carlos, SP. Anais... São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2009, 2009.

RODRIGUES, D.R. et al. Abate humanitário de aves: Revisão. **Pubvet**, v. 10, p. 636-720, 2016.

ROSTAGNO, H.S. **Tabelas brasileiras para aves e suínos**: composição de alimentos e exigências nutricionais. 3a ed. – Viçosa: UFV, DZO, 2011. 252p.

RUTZ, F. et al. Impacto da nutrição vitamínica sobre a resposta imunológica das aves. **Anais... Simpósio Brasil Sul de Avicultura**, v. 3, p. 1-15, 2002.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning**: A laboratory manual, the third edition. 2001.

SILVA, R.M.; GOULART, C.T.; GUIDO, L.A. Evolução histórica do conceito de estresse. **Revista de Divulgação Científica Sena Aires**, v. 7, n. 2, p. 148-156, 2018.

SINGH, U. et al. Molecular markers and their applications in cattle genetic research: A review. **Biomarkers and Genomic medicine**, v. 6, n. 2, p. 49-58, 2014.

SOHAIL, M.U., HUME. M.E., BYRD. J.A., NISBET, D.J., SHABBIR. M.Z., IJAZ. A., REHMAN, H. Molecular analysis of cecal and tracheal microbiome of heat-stressed broilers supplemented with prebiotic and probiotic. **Avian Pathology**. DOI: 10.1080/03079457.2015.1004622. 2015.

VILAR, J.H. et al. Exigências nutricionais de codornas. In: III SIMPÓSIO INTERNACIONAL E II CONGRESSO BRASILEIRO DE COTURNICULTURA, Lavras - MG, 2007. **Anais...** Lavras: UFLA/NECTA, 2007. p. 44-64.