

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR PALOTINA  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO  
ATIVIDADES DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO  
OBRIGATÓRIO**

Área: Genética animal

Acadêmica: Jéssica Heinzen Vicentin  
Supervisora: Dra. Jane de Oliveira Peixoto  
Orientador: Prof. Dr. Alexandre Leseur dos Santos

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como parte das exigências  
para a conclusão do curso de graduação  
em Medicina Veterinária da Universidade  
Federal do Paraná.

PALOTINA – PR  
Dezembro de 2017

*“Aprendi que a coragem não é a ausência do medo, mas o triunfo sobre ele. O homem corajoso não é aquele que não sente medo, mas o que conquista esse medo.” (Nelson Mandela)*

*“A persistência é o menor caminho do êxito”.  
(Charles Chaplin)*

*Aos meus pais, Ivone e Sidnei, familiares e amigos que, com carinho e afeição, sempre estiveram ao meu lado e nunca mediram esforços para me ajudarem a chegar até aqui.*

*Dedico!*

## **AGRADECIMENTOS**

Primordialmente a Deus, por ser minha luz e por ter me dado saúde, inteligência e força de vontade para superar todas as dificuldades e vencer os desafios.

A minha família, minha base! Especialmente aos meus pais, Ivone e Sidnei, por sempre me incentivarem e estarem ao meu lado em todas as minhas escolhas. Ao meu irmão, Giovani Heinzen Vicentin, por me servir de inspiração. Às minhas avós, Eliza e Odília (in memoriam), que intercederam a Deus por mim, e agora, do céu, observam a minha vitória.

Aos meus mestres, pela orientação e pela incansável luta em transmitir seus conhecimentos. Especialmente ao meu orientador, Dr. Alexandre Leseur dos Santos, pelo suporte e auxílio.

A Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina e a todos os funcionários que a integram, pela oportunidade de concretização de um sonho.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Suínos e Aves, por me dar a chance de expandir meus conhecimentos na área desejada. E aos colegas de trabalho, por serem extremamente pacientes e acolhedores, em especial, Adriana Ibelli, Alexandre Tessmann, Igor Savoldi, Kamilla Bleil e à Doutora Jane Peixoto, por me conferir orientação.

Enfim, a todas as pessoas, amigos e familiares que estiveram comigo, me ajudaram e me incentivaram, direta ou indiretamente, ao longo deste percurso e fizeram parte da minha formação.

O meu muito obrigada.

## RESUMO

O presente Trabalho de Conclusão de Curso foi realizado na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Suínos e Aves – sediada no município de Concórdia, situada na região oeste do estado de Santa Catarina, durante o período de 10 de julho a 02 de dezembro de 2017, totalizando 600 horas de atividades, obedecendo assim, às exigências da disciplina de Estágio Supervisionado Obrigatório da Universidade Federal do Paraná – setor Palotina. As atividades foram desenvolvidas no complexo de laboratórios de sanidade e genética animal, sob orientação da Pesquisadora Doutora Jane de Oliveira Peixoto e supervisão do Professor Doutor Alexandre Leseur dos Santos. No vigente Trabalho de Conclusão de Curso, são contemplados os elementos constados no Plano de Atividades do Estágio como, extração e purificação de DNA e RNA, técnicas de PCR e qPCR, além de atividades de rotina laboratorial. Também são descritos o local de estágio e toda sua estrutura física, composta por dois complexos laboratoriais, sendo um de Análises Físico-químicas e outro de Sanidade e Genética Animal, fábrica de ração e administrativo, bem como o acompanhamento dos projetos de pesquisa, como o projeto de Detecção do Gene Halotano em Suínos e o Projeto de Necrose da Cabeça do Fêmur em Frangos de Corte. Dentre outros experimentos e análises laboratoriais de rotina que abrangem a área de genética de Aves e Suínos, são relatados os procedimentos realizados e as avaliações decorrentes destes estudos. O estágio supervisionado obrigatório é de grande valia, uma vez que se pode vivenciar e aplicar os conhecimentos adquiridos na Universidade, e ainda, somar sabedoria oriunda de excelentes profissionais.

Palavras chave: Genética animal; suínos; aves.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: VISTA AÉREA DA EMBRAPA SUÍNOS E AVES EM CONCÓRDIA - SC. .....	16
FIGURA 2: LABORATÓRIO DESTINADO AOS PROCEDIMENTOS COM RNA. ....	18
FIGURA 3: LABORATÓRIO DESTINADO AOS PROCEDIMENTOS COM DNA. ....	19
FIGURA 4: SALA DE SEQUENCIAMENTO.....	19
FIGURA 5: KIT QIAGEN® E COLUNAS DE SÍLICA.....	23
FIGURA 6: APARELHO DE ESPECTROFOTOMETRIA BIODROP .....	23
FIGURA 7: KIT INVITROGEN®, UTILIZADO PARA A EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA DO SANGUE DE AVES. ....	24
FIGURA 8: COMPARAÇÃO ENTRE TRÊS TIPOS DE CARNE SUÍNA, PSE, NORMAL E DFD, APONTANDO A DIFERENÇA DE COLORAÇÃO E DE QUANTIDADE DE ÁGUA DISPONÍVEL ENTRE ELAS. ....	27
FIGURA 9: CICLAGEM PARA PCR CONVENCIONAL UTILIZANDO O MÉTODO PARA GENE HALOTANO.....	29
FIGURA 10: AMOSTRAS DEPOSITADAS EM GEL DE AGAROSE DENTRO DE UMA CUBA DE ELETROFORESE. ....	29
FIGURA 11: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DO GENE HALOTANO, AMPLIFICADO POR PCR-RFLP. ....	31
FIGURA 12: TUBO DE POLIPROPILENO CONTENDO AMOSTRAS COM TRIZOL® APÓS A CENTRIFUGAÇÃO, RESULTANDO EM TRÊS FASES: AQUOSA (RNA), INTERFASE (DNA) E ORGÂNICA (RESÍDUOS).....	41
FIGURA 13: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE PARA VERIFICAR A INTEGRIDADE DO RNA TOTAL. ....	41
FIGURA 14: EXPRESSÃO RELATIVA DOS GENES ALVOS FAM180A, PERP, ABI3P, PRRX1, LEPR, CHST1, ANGPTL7, COL8A1, COL14A1.....	43

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: DADOS DE PRODUÇÃO, CONSUMO E EXPORTAÇÃO DA CADEIA AVÍCOLA MUNDIAL, EM RELAÇÃO AO ANO DE 2015.....	14
TABELA 2: DADOS DE PRODUÇÃO, CONSUMO E EXPORTAÇÃO DA CADEIA SUINÍCOLA MUNDIAL, EM RELAÇÃO AO ANO DE 2015.....	14
TABELA 3: AMOSTRAS QUANTIFICADAS NO APARELHO BIODROP®, COM OS VALORES DE RNA E H <sub>2</sub> O JÁ CALCULADOS PARA A SÍNTESE DE CDNA. ....	42
TABELA 4: VALORES DE REAGENTES UTILIZADOS PARA A SÍNTESE DO MASTERMIX. ....	42
TABELA 5: RESULTADOS DA EXPRESSÃO RELATIVA DE OITO GENES ALVOS, QUANDO COMPARADOS A DOIS GENES DE REFERÊNCIA. ....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – Graus Celsius

µL – Microlitro

A – Adenina

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal

ATP – Trifosfato de Adenosina

C – Citosina

cDNA – Ácido Desoxirribonucleico Complementar

DEPC – Pirocarbonato de Dietila

DFD – (Dark, Firm and Dry) Escura, Dura e Seca

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EPI – Equipamento de Proteção Individual

FRLP – Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição

G – Guanina

HA – Hectares

Kg – Quilos

LGM – Laboratório de Genética Molecular

LSGA – Laboratório de Sanidade e Genética Animal

M<sup>2</sup> – Metros quadrados

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Mg – Miligramas

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade

ml – Mililitro

mRNA – Ácido Ribonucleico Mensageiro

NCF – Necrose da Cabeça do Fêmur

PB – Pares de base

PCR – Reação em Cadeia Polimerase

pH – Potencial Hidrogeniônico

PIB – Produto Interno Bruto

PSE – (Pale, Soft and Exudative ) Pálida, Mole e Exsudativa

qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa

RFN – (Reddish Pink, Firm and Non-Exudative) Cor normal, Textura Firme e Não Exudativa

RNA – Ácido Ribonucleico

RNAses – Ribonucleases

RPM – Rotação por minuto

rRNA – Ácido Ribonucleico Ribossômico

SNP – Polimorfismo de Nucleotídeo Único

SPF – Livre de patógenos específicos

T- Timina

TBE – Trisborato de Ácido etilenodiaminotetracético

TEC-DAM – Tecnologia para Destinação de Animais Mortos

tRNA – Ácido Ribonucleico Transportador

XG – Força Centrífuga

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2.</b>	<b>DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO</b> .....	<b>15</b>
2.1.	ESTRUTURA FÍSICA .....	15
2.1.1.	Laboratórios .....	16
2.1.1.1.	Laboratório de análises físico-químicas .....	16
2.1.1.2.	Laboratório de sanidade e genética animal .....	17
2.2.	CAMPOS EXPERIMENTAIS .....	20
2.3.	FÁBRICA DE RAÇÃO .....	20
<b>3.</b>	<b>ATIVIDADES DESENVOLVIDAS</b> .....	<b>21</b>
3.1.	EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA .....	21
3.1.1.	Obtenção e armazenamento de amostras .....	21
3.1.2.	Extração e purificação de dna de tecidos de suínos .....	22
3.1.3.	Extração e purificação de DNA de sangue de aves .....	23
3.2.	EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE RNA .....	24
3.3.	EXTRAÇÃO DE DNA PARA DETECÇÃO DO GENE HALOTANO EM SUÍNOS .....	25
3.3.1.	Introdução .....	25
3.3.2.	Material e Métodos .....	27
3.3.3.	Resultados e Discussão .....	29
3.3.4.	Conclusão .....	31
3.4.	DETECÇÃO DE GENES CANDIDATOS RELACIONADOS À NECROSE DA CABEÇA DO FÊMUR EM AVES DE 28 dias.....	31
3.4.1.	Introdução .....	31
3.4.1.1.	Genes Constitutivos .....	33
3.4.1.1.1.	<i>Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P1 (RPLP1)</i> .....	33

3.4.1.1.2.	<i>Ribosomal Protein L30 (RPL30)</i> .....	33
3.4.1.1.3.	<i>Hydroxymethylbilane Synthase (HMBS)</i> .....	33
3.4.1.1.4.	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH)</i> .....	34
3.4.1.1.5.	<i>Beta-2-Microglobulin (B2M)</i> .....	34
3.4.1.1.6.	<i>Ribosomal Protein L4 (RPL4)</i> .....	34
3.4.1.1.7.	<i>Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase (HPRT-1)</i> .....	34
3.4.1.2.	Genes Alvos .....	35
3.4.1.2.1.	<i>TP53 Apoptosis Effector (PERP)</i> .....	35
3.4.1.2.2.	<i>Family with Sequence Similarity 180 Member A (FAM180A)</i> .....	35
3.4.1.2.3.	<i>Angiopoietin-Like 7 (ANGPTL-7)</i> .....	35
3.4.1.2.4.	<i>Collagen Type VIII Alpha 1 Chain (COL8A1)</i> .....	36
3.4.1.2.5.	<i>Collagen Type XIV Alpha 1 Chain (COL14A1)</i> .....	36
3.4.1.2.6.	<i>ABI Family Member 3 Binding Protein (ABI3BP)</i> .....	36
3.4.1.2.7.	<i>Paired Related Homeobox 1 (PRRX-1)</i> .....	36
3.4.1.2.8.	<i>Carbohydrate Sulfotransferase 1 (CHST1)</i> .....	37
3.4.1.2.9.	<i>Leptin Receptor (LEPR)</i> .....	37
3.4.2.	Material e Métodos.....	37
3.4.3.	Resultados e discussão .....	42
3.4.4.	Conclusão .....	43
<b>4.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>45</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>46</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A realização do estágio extracurricular obrigatório é de extrema relevância, uma vez que possibilita concretizar e reproduzir os ensinamentos oriundos da Universidade e ainda preparar-se para a vida profissional. A disciplina está relacionada com o último período do curso de Medicina Veterinária, da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, e é um dos métodos de avaliação para a conclusão do curso e otimização do currículo.

A oportunidade de se executar o estágio extracurricular em uma das empresas mais renomadas do Brasil, e conhecida mundialmente, vem do acordo entre faculdade e empresa. Os fatores que determinaram a predileção pela mesma foram, não só a excelente estrutura, mas também o avançado interesse em pesquisas e desenvolvimento de experimentos, através de métodos modernos e equipe qualificada.

As áreas da avicultura e suinocultura mostraram-se mais interessantes, visto que são produções em crescente e intenso desenvolvimento. De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2016) a carne suína e de aves são as duas proteínas mais consumidas no planeta, ocupando, respectivamente, o primeiro e o segundo lugar no ranking de consumo mundial, seguidas pela carne bovina.

Atualmente, a criação de suínos e aves no Brasil é feita, em sua grande maioria, de forma intensiva, visando sempre melhorias na qualidade e inocuidade da carne. Desde o final do século XX, o modelo integrado de produção tem sido adotado e se mostrado eficiente para atender a demanda de mercado. Neste modelo, a empresa facilita o financiamento das estruturas, fornece os animais, a assistência técnica, os medicamentos e a ração, enquanto o produtor viabiliza a mão de obra, as instalações e conseqüentemente a entrega dos animais dentro do prazo estabelecido pela empresa integradora, atendendo às exigências de qualidade e rastreabilidade da mesma (ÁVILA et al., 2007; SOUZA et al., 2013).

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2016), o Produto Interno Bruto (PIB) nacional fechou 2015 totalizando R\$5,9 trilhões, sendo que desta quantia, R\$1,2 trilhão foram provenientes do agronegócio, com 32% relacionados à pecuária.

Apesar de os Estados Unidos liderarem os números de produção avícola mundial, o maior país exportador de carne de frango do mundo é o Brasil (Tabela 1). Cerca de 33% do produto produzido é exportado para diversos países e continentes. Enquanto na cadeia suinícola, a maioria da produção é para atender a demanda interna, e apenas 14% destina-se à exportação. O maior produtor de carne suína do mundo é a China, seguida pela União Europeia, Estados Unidos e Brasil (ABPA, 2016). Embora a carne suína seja a proteína animal mais consumida do mundo, no Brasil sua procura ainda é baixa, quando comparada a outros países, como a China, por exemplo (Tabela 2) (CONAB, 2016).

Visto que a produção de aves e suínos são duas extensões da pecuária brasileira e mundial em intenso desenvolvimento (ABPA, 2016), objetivando atender a alta demanda de mercado, e ainda, acompanhar o avanço nas técnicas de reprodução, o conhecimento da genética e do melhoramento animal são noções indispensáveis e de extrema importância.

Para que o melhoramento genético seja efetivo, existem duas técnicas elementares, sendo elas, a seleção e o cruzamento. Basicamente, na seleção opta-se por indivíduos com melhores índices zootécnicos ou que se destaquem em relação à característica desejada, permitindo que, posteriormente, estes produzam uma geração, enquanto no cruzamento, tem-se o acasalamento de animais de diferentes raças ou espécies. Ambos objetivam uma progênie com as melhores características (MORAES; CAPANEMA, 2012).

Com o sequenciamento do genoma de diversas espécies, dentre elas, aves e suínos, pode-se obter um razoável banco de dados que, atrelado ao acelerado desenvolvimento tecnológico, oportunizou o desenvolvimento e conhecimento de diversos marcadores moleculares. Segundo Regitano e Veneroni (2009, p.3), os marcadores são porções do genoma onde, “[...]o padrão fenotípico individual pode ser experimentalmente determinado de modo a permitir que a segregação do locus marcador responsável pelo caráter seja acompanhada.” O uso de marcadores genéticos visa auxiliar, por exemplo, na descoberta de genes de resistência a doenças e características de carcaça, ou ainda, na expressão de genes como o Halotano, em suínos, que resultam na carne pálida, mole e exsudativa (PSE).

Portanto, o objetivo do estágio supervisionado foi acompanhar as atividades de pesquisa do laboratório de sanidade e genética animal da EMBRAPA – AVES E

SUÍNOS, bem como participar dos experimentos desenvolvidos na área durante o período.

TABELA 1: DADOS DE PRODUÇÃO, CONSUMO E EXPORTAÇÃO DA CADEIA AVÍCOLA MUNDIAL, EM RELAÇÃO AO ANO DE 2015.

<b>País</b>	<b>Produção</b>	<b>Consumo</b>	<b>Exportação</b>
<b>Estados Unidos</b>	18.238	15.379	2.978
<b>Brasil</b>	13.605	9.497	4.110
<b>China</b>	12.700	12.715	*
<b>União Europeia</b>	11.070	10.570	1.250
<b>Índia</b>	4.200	4.194	*

FONTE: EMBRAPA (2016).

\* Dados não expressivos.

TABELA 2: DADOS DE PRODUÇÃO, CONSUMO E EXPORTAÇÃO DA CADEIA SUINÍCOLA MUNDIAL, EM RELAÇÃO AO ANO DE 2015.

<b>País</b>	<b>Produção</b>	<b>Consumo</b>	<b>Exportação</b>
<b>China</b>	51.850	14.070	*
<b>União Europeia</b>	23.350	20.062	3.300
<b>Estados Unidos</b>	11.307	9.452	2.356
<b>Brasil</b>	3.710	2.811	900
<b>Rússia</b>	2.770	3.160	*

FONTE: EMBRAPA (2016).

\* Dados não expressivos.

## 2. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), está amplamente distribuída por todo território nacional, possuindo sede em Brasília. São 47 unidades descentralizadas, vinculadas ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A Unidade designada para Suínos e Aves está localizada no distrito de Tamanduá, na cidade de Concórdia, região oeste do estado de Santa Catarina.

Objetivando apoiar o desenvolvimento e aumentar o número de pesquisas no ramo da suinocultura no Brasil, em 1975 foi criado o Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e, posteriormente, no ano de 1978, iniciaram as pesquisas na área de avicultura, quando a Unidade passou a ser denominada Centro Nacional de Pesquisas de Suínos e Aves (Embrapa Suínos e Aves).

Desde sua criação, a unidade teve papel fundamental nas cadeias avícolas e suinícolas. Por meio de milhares de experimentos, desde então, tem se conquistado um maior controle de doenças, aperfeiçoamento de rações, melhoria da qualidade genética dos animais, preservação do meio ambiente e desenvolvimento de equipamentos. A Embrapa ainda trabalha em parceria com outros órgãos do governo, empresas particulares e agricultores.

Os projetos de pesquisas são desenvolvidos considerando as demandas atuais nos setores de aves e suínos. Para isto, a empresa conta com uma equipe de funcionários qualificados, sendo 49 pesquisadores, 54 analistas, 37 técnicos e 69 assistentes, totalizando 209 servidores, tendo como missão, "viabilizar soluções de pesquisa, desenvolvimento e inovação para a sustentabilidade da suinocultura e avicultura em benefício da sociedade brasileira". Todos os resultados das pesquisas realizadas dentro da empresa, são repassados às cadeias produtivas por meio de publicações, cursos, palestras, dias de campo, entre outras formas (EMBRAPA, 2017).

### 2.1. ESTRUTURA FÍSICA

Atualmente, a Empresa abrange uma área de 210,74 ha, sendo 50.351,37 m<sup>2</sup> de área construída (Figura 1). A infraestrutura disponível é constituída pelo prédio administrativo, unidades de produção e pesquisa, campos experimentais, dois complexos de laboratórios (Análises Físico-Químicas e Sanidade e Genética Animal),

isolamento e necropsia, biotério, incubatório, fábrica de rações, biblioteca, Unidade de produção de aves e ovos SPF (Specific Pathogen Free) e Unidade de produção de suínos SPF, central de coleta de sêmen de suínos, laboratório TEC-DAM (abriga diversas tecnologias para tratamento de animais mortos), estação meteorológica, almoxarifado, refeitório, abatedouro, local de alojamento com capacidade para 6 mil suínos e 50 mil aves e outras estruturas de apoio.

FIGURA 1: VISTA AÉREA DA EMBRAPA SUÍNOS E AVES EM CONCÓRDIA - SC.



FONTE: Embrapa Aves e Suínos.

### 2.1.1. Laboratórios

A unidade dispõe de dois complexos laboratoriais, sendo o de Análises Físico-Químicas responsável por pesquisas em meio ambiente, nutrição, qualidade da carne, solo, fertilizantes e bioenergia, e o complexo de Sanidade e Genética Animal voltado às pesquisas que envolvem questões sanitárias ligadas à avicultura e suinocultura. O laboratório também possui estrutura para estudos sobre genômica.

#### 2.1.1.1. Laboratório de análises físico-químicas

O principal objetivo do laboratório de análises físico-químicas é a prestação de auxílio técnico-científico aos projetos de pesquisa da Unidade através da

realização de ensaios e condução de experimentos. Atualmente o laboratório é dividido em áreas temáticas: Bromatologia, Minerais, Cromatografia, Espectrometria no Infravermelho, Laboratório de Análises e Experimentação Ambiental, Laboratório de Solos e Fertilizantes e Laboratório de Tecnologia de Carnes. Essas grandes áreas visam atender ensaios de rotina e área de experimentação.

São realizados cerca de 100 mil ensaios por ano, nos quais as principais amostras analisadas são solos, lombo suíno, milho em grão, fezes e excretas (suínos e aves), ração (suínos e aves), tecido vegetal, água e ossos de aves (que apesar de não se tratar de demanda rotineira, impactou nos números gerados devido à quantidade de amostras protocoladas). O laboratório ainda trabalha em parceria com toda a Unidade, atendendo a demanda de todos os setores (EMBRAPA, 2017).

#### 2.1.1.2. Laboratório de sanidade e genética animal

O complexo laboratorial de sanidade e genética animal é subdividido em pequenas áreas, respeitando as normas de biossegurança e boas práticas laboratoriais, sendo assim, a estrutura é composta por laboratórios de virologia, bacteriologia, parasitologia, histopatologia, reprodução e genética molecular. É considerada uma área de segurança nível 2, conseqüentemente o acesso aos laboratórios é restrito, faz-se obrigatório o uso de EPI (Equipamento de Proteção Individual), não se pode adentrar com alimentos, entre outros.

O objetivo do complexo laboratorial é desenvolver pesquisas nas áreas de sanidade e genética de aves e suínos. O mesmo ainda trabalha em conjunto com toda a Unidade, prestando serviços de diagnóstico e realizando o monitoramento do rebanho, por exemplo. Anualmente são realizadas em média 55 mil análises laboratoriais.

Os projetos de pesquisas envolvem inúmeros ensaios laboratoriais que são padronizados, validados e utilizados para atingir as metas propostas. As metodologias são desenvolvidas ou adaptadas no laboratório, utilizadas nos projetos de pesquisa, e quando pertinentes, incorporadas à rotina de trabalho e/ou disponibilizadas para clientes ou parceiros de pesquisa. Sendo assim, o LSGA se caracteriza como um laboratório de pesquisa e desenvolvimento (EMBRAPA, 2017).

Os laboratórios direcionados à área de genética animal são subdivididos em sala para extração e purificação de RNA, com bancadas, consumíveis e equipamentos

de uso exclusivo para manuseio de RNA (Figura 2). Sala para extração e purificação de DNA, com bancadas exclusivas para a manipulação de bactérias e DNA bacteriano, bancada para a manipulação de DNA para PCR e bancada limpa para preparo de PCR e reações livres de DNA e RNA (Figura 3). E salas de sequenciamento (Figura 4).

FIGURA 2: LABORATÓRIO DESTINADO A TODOS OS PROCEDIMENTOS COM RNA.



FONTE: Arquivo Pessoal (2017).

FIGURA 3: LABORATÓRIO DESTINADO A TODOS OS PROCEDIMENTOS COM DNA.



FONTE: Arquivo Pessoal (2017).

FIGURA 4: SALA DE SEQUENCIAMENTO.



FONTE: Arquivo Pessoal (2017).

## 2.2. CAMPOS EXPERIMENTAIS

O objetivo dos campos experimentais é a produção e manutenção de animais para a instalação de experimentos de pesquisa. São compostos por quatro áreas distintas, sendo elas, Campo Experimental de Suínos (incluindo a Unidade Demonstrativa e a Estação de Tratamento de Dejetos Suínos), totalizando 19 instalações. Núcleo de Conservação Genética de Suínos, com 10 instalações. Núcleo de Conservação Genética de Aves, com 12 instalações e Unidade Experimental de Aves, com 14 instalações (EMBRAPA, 2017).

## 2.3. FÁBRICA DE RAÇÃO

A fábrica foi criada em 1986, visando atender a demanda interna. Com possibilidade de produzir ração peletizada e farelada, prioriza a produção de rações experimentais com misturadores em forma de "Y" com capacidade de 50 e 100 kg, verticais, com capacidade de mistura de 250, 500 e 1.000 kg e horizontais automatizados com capacidade de 250 e 500 kg. Anualmente a média de produção é de 2 mil toneladas de ração (EMBRAPA, 2017).

### 3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Durante os cinco meses de estágio, foram realizadas extrações de DNA e RNA, técnicas de PCR convencional e PCR em tempo real, rotina laboratorial, e ainda acompanhamento de projetos de pesquisas, palestras internas, estudos e revisões bibliográficas.

#### 3.1. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA

A extração e purificação do DNA é uma técnica utilizada rotineiramente, com intuito de se realizar posteriormente, técnicas como o PCR convencional, PCR em tempo real, sequenciamento e digestão de DNA direto. O produto extraído pode ser oriundo de diversos tipos de amostras como tecidos, sangue, digesta ileal, além de fungos, bactérias e vírus.

Basicamente o DNA é composto por uma dupla hélice, constituída por nucleotídeos e ligados entre si por pontes de hidrogênio. Por este motivo, a molécula de DNA é altamente resistente e estável, mantendo-se inalterada em determinadas condições. Entretanto, boas práticas laboratoriais são imprescindíveis para o bom desenvolvimento das análises, evitando que o material se degrade (OLIVEIRA et.al., 2007).

Atualmente, no laboratório de genética molecular da Embrapa Aves e Suínos, a técnica de extração e purificação é realizada por meio de enzimas de restrição, responsáveis por cortar o DNA, e protocolos específicos.

##### 3.1.1. Obtenção e armazenamento de amostras

As amostras são oriundas de animais da própria Unidade, ou ainda, de amostras de animais provenientes de empresas parceiras. Todos os itens para análise, sejam eles tecidos, digesta ou sangue, devem ser armazenados de forma adequada e refrigerada, para que seja mantida a integridade até o momento da extração. No LGM, as amostras são refrigeradas nos ultrafreezers, alcançando temperatura igual ou inferior a -80 °C.

### 3.1.2. Extração e purificação de DNA de tecidos de suínos

Para o desenvolvimento da extração e purificação do DNA de tecidos, utiliza-se o protocolo "*Quik-Start Protocol*" da marca Qiagen® (Figura 5). Obedecendo à sequência exata de passos e pipetagem precisa.

Ao decorrer de todo o processo, é de extrema importância o uso de luvas e materiais adequadamente higienizados e estéreis, para que não haja a contaminação das amostras. Todo material utilizado para extração, desde ponteiros, até microtubos plásticos são esterilizados e novos, não é permitido o uso de materiais reciclados ou reutilizados.

Inicialmente, as amostras de tecido são cortadas em um tamanho com cerca de 25 mg e então, submetidas à digestão enzimática com Proteinase K, em banho-maria com temperatura entre 50-56°C. O tempo de incubação varia de acordo com a quantidade de amostra digerida, o conteúdo final deve apresentar aspecto viscoso. Posteriormente o conteúdo digerido é repassado para uma coluna de sílica (Figura 5). Todo DNA presente na amostra se ligará à membrana da coluna de sílica, o que permite que esta seja lavada sucessivamente, com a utilização dos tampões de lavagem presentes no Kit, até que a amostra apresente alta pureza. Por fim, o DNA é eluído da sílica por meio do tampão de eluição, responsável por desestabilizar as cargas que mantinham o DNA ligado à coluna.

Após o procedimento de extração e purificação, as amostras são submetidas à quantificação, utilizando espectrofotômetro, no aparelho BioDrop (Figura 6). A quantificação é necessária para que sejam conhecidos os valores de DNA presentes nas amostras, e o quão pura estas amostras estão.

FIGURA 5: KIT QIAGEN® E COLUNAS DE SÍLICA.

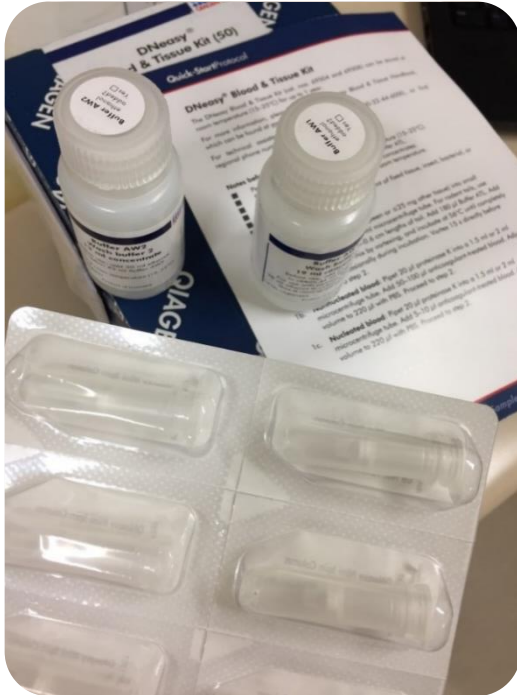


FIGURA 6: APARELHO DE ESPECTROFOTOMETRIA BIODROP.



FONTE: Arquivo Pessoal (2017).

### 3.1.3. Extração e purificação de DNA de sangue de aves

A extração e purificação de DNA de sangue é mais utilizada em aves, pois estas possuem eritrócitos nucleados e conseqüentemente a quantidade de DNA obtida a partir da extração é maior (CAMPOS et al. 2003), enquanto suínos possuem eritrócitos anucleados, ou seja, é necessário utilizar maior quantidade de sangue e posteriormente centrifugar, para que a extração seja realizada a partir dos leucócitos. É de extrema importância que toda hemoglobina seja eliminada, pois as porfirinas possuem ação inibitória sobre a Taq DNA polimerase (HIGUCHI, 1989).

No LGM da Embrapa Aves e Suínos, é realizada a colheita das amostras de aves, geralmente da própria Unidade, para experimentos internos. Para evitar a coagulação, adiciona-se EDTA. A extração e a purificação é realizada com base no protocolo do Kit Invitrogen® (Figura 7).

Assim como na extração de DNA a partir de tecidos, para a extração do DNA sanguíneo, também utilizam-se as colunas de sílica.

FIGURA 5: KIT INVITROGEN®, UTILIZADO PARA A EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA DO SANGUE DE AVES.



FONTE: Arquivo Pessoal (2017).

### 3.2. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE RNA

Diferente do DNA, o RNA é uma molécula de ácido ribonucleico, formado por apenas uma cadeia, o que o torna mais sensível (ROSSETTI, 2000). Ou seja, ao realizar as análises, deve-se ter extremo cuidado para manter a integridade e a qualidade do RNA.

Simplificadamente, para que o processo de isolamento do RNA seja efetivo, deve-se haver lise e desnaturação das células, para que os ácidos nucleicos totais sejam liberados, e ainda, presença de inibidores impedindo a ação de ribonucleases (RNAses) (AUSUBEL, et al. 2003). As ribonucleases são responsáveis por catalisar a degradação do RNA em componentes menores. A presença destas enzimas é o que torna a extração do RNA complexa, pois elas facilitam a degradação rápida da amostra (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

Primordialmente, no LGM, para o desenvolvimento da técnica de extração de RNA, podem ser utilizadas amostras de cartilagem, tecidos, ossos e digesta de animais. Após a obtenção das amostras, as mesmas são armazenadas em ultrafreezers, à temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ . Todo o manuseio das amostras deve ser realizado em temperatura demasiadamente baixa, para isto, qualquer manipulação fora dos ultrafreezers é feita em caixas de isopor, repletas por nitrogênio líquido. A baixa temperatura impede a ação das RNAses.

Boas práticas laboratoriais são imprescindíveis ao se realizar a extração de RNA. No LGM existe uma sala destinada apenas à manipulação desta molécula, com pipetas exclusivas, ponteiros específicas e com filtros, entre outros. Toda e qualquer manipulação deve ser realizada com a utilização de luvas.

A técnica de extração e purificação de RNA está descrita na íntegra no tópico 3.4.2.

### 3.3. EXTRAÇÃO DE DNA PARA DETECÇÃO DO GENE HALOTANO EM SUÍNOS

#### 3.3.1. Introdução

A influência do gene Halotano sobre a qualidade de carcaças suínas, foi inicialmente descrita por Junichi Fujii e colaboradores, por volta dos anos 90. Em seus trabalhos Fujii et al. (1991) relata a descoberta de uma mutação no gene que codifica os receptores de Rianodina, associada a Hipertermia Maligna. A Rianodina é uma proteína responsável por regular o fluxo de cálcio no organismo (MAGANHINI, 2007). Enquanto a hipertermia maligna é citada por Carpenter (2009) como uma desordem farmacogenética letal.

A consequência do excesso de cálcio liberado no citoplasma em animais afetados por esta desordem é a intensa ativação da contração muscular. Continuadamente o organismo trabalha para reabsorver este cálcio remanescente. Entretanto, os mecanismos exercidos pelo organismo para manter a contração muscular, somados às forças exercidas para realizar a reabsorção do excesso de cálcio, consomem elevadas quantidades de ATP. Baixos níveis de ATP resultam em rigidez muscular (PAUL-PLETZER, 2002). Outra consequência da ausência de ATP é o rompimento da membrana do músculo esquelético, resultando em extravasamento de elementos celulares, como potássio.

Sabe-se atualmente, que um dos fatores preponderantes para o aparecimento da carne PSE em suínos, é a presença do gene Halotano. O mesmo ainda é responsável por determinar maior propensão ao estresse em animais que o possuem (CULAU, 2002).

Fisiologicamente, a transformação do músculo em carne ocorre logo após a sangria, quando os níveis de ATP começam a diminuir devido à falta do aporte de oxigênio. Consequentemente, o organismo é obrigado a utilizar o glicogênio disponível

como fonte de energia. Devido à escassez de fluxo sanguíneo e posterior glicólise anaeróbica, há formação de grande quantidade de ácido láctico, que acaba por se acumular no músculo. O resultado desta cadeia de acontecimentos, é a queda do pH (<5,4), ou seja, acidificação do músculo, que inibe completamente a ação das enzimas glicolíticas. O *rigor mortis* se inicia após a ausência de ATP. E a resolução do mesmo acarreta a maciez da carne (ORDÓÑES, 2005; ABERLE, 2001).

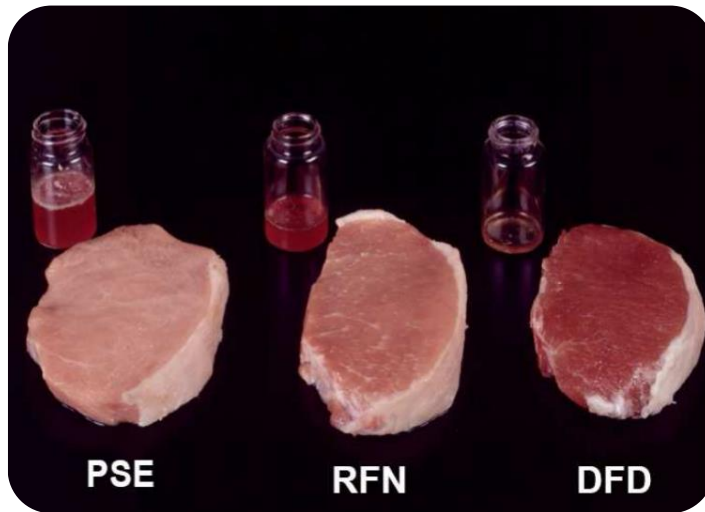
Vários fatores são determinantes para uma carne de boa qualidade. Uma pequena falha em determinada etapa do processo, pode ocasionar perdas. A carne PSE, denominada Pálida, Mole e Exsudativa é, atualmente, o problema de qualidade mais relevante na suinocultura (Figura 8). O nome dado, é devido a elevada perda de água durante o processamento, coloração esbranquiçada em relação as carnes ditas normais e textura flácida (MAGANHINI, 2007). Tecnicamente, este mecanismo acontece devido à rápida velocidade da glicólise, fazendo com que o pH diminua mais depressa que o normal (RÜBENSAM, 2000).

No gene Halotano foi identificada uma mutação do tipo SNP (Polimorfismo de Nucleotídeo Único), graças ao sequenciamento de genoma, que identificou a troca de uma única base, citosina (C), por timina (T), no cromossomo 6 de suínos, os quais geraram mutações não sinônimas (GUIMARÃES; EUCLYDES, 1999 e ALENCAR, 2010).

Não apenas fatores genéticos, exemplo, a presença do gene Halotano, como também nutrição e falhas de manejo são pontos decisivos para o aparecimento de carne PSE. É por esse motivo que, cada vez mais, as empresas buscam meios para eliminar animais que possuem o gene Halotano, realizando a seleção de machos negativos ( $Hal^{NN}$ ) para o gene nos plantéis reprodutores, e descartando os machos positivos ( $Hal^{nn}$ ) e portadores ( $Hal^{Nn}$ ). E ainda, instruindo produtores para realizar manejo adequado dos animais, evitando com isso, estresse pré-abate (MAGANHINI, 2007).

Desta maneira, o objetivo deste estudo foi genotipar pela técnica de PCR-RFLP um SNP no Gene Halotano, em seis amostras de Suínos Reprodutores, para posterior seleção dos mesmos.

FIGURA 6: COMPARAÇÃO ENTRE TRÊS TIPOS DE CARNE SUÍNA, PSE, NORMAL E DFD, APONTANDO A DIFERENÇA DE COLORAÇÃO E DE QUANTIDADE DE ÁGUA DISPONÍVEL ENTRE ELAS.



FONTE: Universidad Nacional de Colombia (2009).

PSE: Pale, Soft and Exudative. RFN: Reddish Pink, Firm and Non-Exudative. DFD: Dark, Firm and Dry.

### 3.3.2. Material e Métodos

As amostras foram recebidas pelo laboratório de genética e sanidade animal da Embrapa Aves e Suínos, oriundas de uma empresa da região, responsável por machos reprodutores suínos. Ao todo, seis amostras foram submetidas à análise, para detecção do Gene Halotano.

A extração do DNA foi realizada a partir de um fragmento de tecido (50-80mg) dos animais selecionados, sendo proveniente de uma pequena região da orelha dos mesmos. O material foi cortado, pesado e colocado em microtubos *ependorf* 1,5mL. Em seguida, foram adicionados 200  $\mu$ L de tampão de digestão e 20  $\mu$ L de Proteinase-K aos microtubos. As amostras foram colocadas em banho seco, a 55°C, onde ficaram por cerca de 16-20 horas, para digestão enzimática. Para realização da extração e purificação do DNA, utilizou-se o Protocolo do “*Kit Pure Link*” da marca Invitrogen®.

O DNA lisado foi adicionado às respectivas colunas de sílica, estas, centrifugadas a 12000 rpm por 1 minuto à temperatura ambiente, isto permite a ligação do DNA na coluna. O líquido proveniente da centrifugação, juntamente com os *collections tubes* foram descartados e as colunas de sílica foram colocadas em novos tubos, fornecidos pelo Kit.

Para a lavagem do DNA, foram adicionados 500  $\mu$ L de tampão de lavagem 1 no centro de cada coluna, que seguiram para centrifugação a 12000 rpm, por 1 minuto,

à temperatura ambiente. Todos os *collections tubes* foram descartados e trocados por novos. Com exceção da rotação e tempo de centrifugação que foram de 14000 rpm, a 2 minutos, os demais passos foram repetidos ao se adicionar o tampão de lavagem 2.

Foram adicionados 150 µL de tampão de eluição ao centro das colunas e incubados por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida os tubos foram centrifugados a 14000 rpm, por 1 minuto, à temperatura ambiente. Este passo permitiu que o DNA ligado à sílica se desprendesse e se acumulasse no fundo dos tubos.

Para verificação da qualidade e quantidade de DNA resultante da extração e purificação, realizou-se a quantificação das amostras, utilizando o aparelho BioDrop®.

Posteriormente, elaborou-se o *Mastermix*, composto por água, *primers* (Hal2\_F: 5' – CTC ACA GCC CCC TGC GTC TC – 3'; Hal2\_R: 5' – GCC AGG GAC AAG CTG GGA CA – 3'), solução tampão, deoxinucleosídeos trifosfatos, magnésio e a enzima Taq-Polimerase. Esta combinação foi misturada ao DNA e então, as amostras foram armazenadas no Termociclador para reação de PCR-convencional.

A ciclagem do Termociclador foi escolhida com base em análises já realizadas, utilizando o método para Gene Halotano, onde, para etapa inicial de desnaturação do DNA foi designado apenas 1 ciclo de 5 minutos, à temperatura de 94.0°C. Para a segunda etapa, determinaram-se 35 ciclos sendo 94.0°C (desnaturação) por 00:00:30 segundos, 61.0°C (anelamento) por 00:00:30 segundos e 72.0°C (extensão) por 00:01:00 minuto. Para a etapa final, de extensão, definiu-se 1 ciclo de 00:05:00 minutos, a 72°C (Figura 9).

Em seguida, foi realizada outra PCR mais simples, denominada PCR-RFLP, em que as amostras resultantes da primeira PCR foram misturadas a um *MasterMix*, contendo água, solução tampão, magnésio e enzima de restrição (*HhaI* - *Invitrogen TM*, *Cat. Nº: 25212-010: 5'-GCG↓C- 3' 3'-C↑GCG- 5'*). As amostras permaneceram por cerca de 2 horas no termociclador, à 37°C.

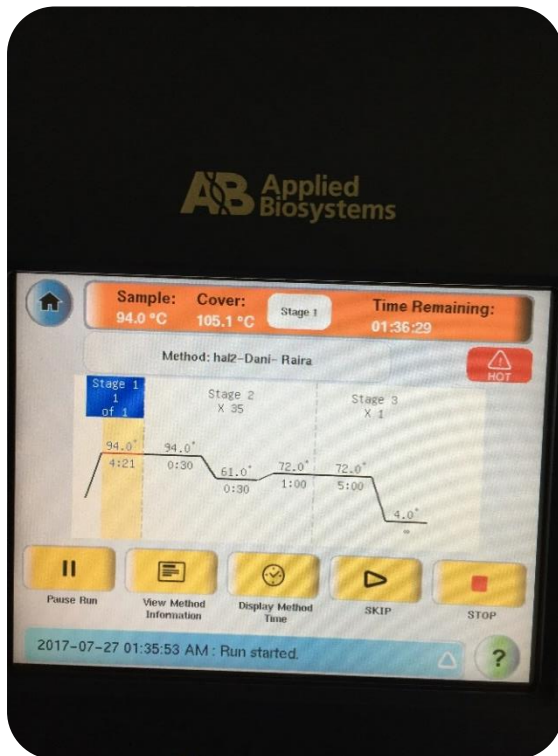
Ao final das PCRs, as amostras foram submetidas à confirmação em eletroforese, para isso foram marcadas com azul de bromofenol. Elaborou-se um gel de agarose, de 100 ml de solução tampão (TBE), a 1,5% de agarose, corado com brometo de Etídio à 0,1%. Este foi colocado no suporte da cuba de eletroforese. Sobre a solução ainda morna, colocou-se um pente, de 20 tiras, o qual teve a função de formar os poços onde foi aplicada a amostra. Após polimerização, a forma contendo o gel foi transferida para a cuba de eletroforese horizontal, e coberta por solução de

TBE 1X. No primeiro e no último poço (1 e 11), colocou-se o marcador (*ladder*), enquanto nos poços intermediários (2 a 7), foram colocadas as amostras coradas. Nos poços 8, 9 e 10 foram depositados o controle negativo, positivo e portador, respectivamente (Figura 10).

A cuba foi ligada a fios de platina (cátodo e ânodo), que permitiram a passagem de corrente elétrica pela solução tampão. Esta foi ligada a 100 Volts, por 2 horas e 30 minutos. Como a molécula de DNA possui carga negativa, esta migrou no gel em direção ao polo positivo.

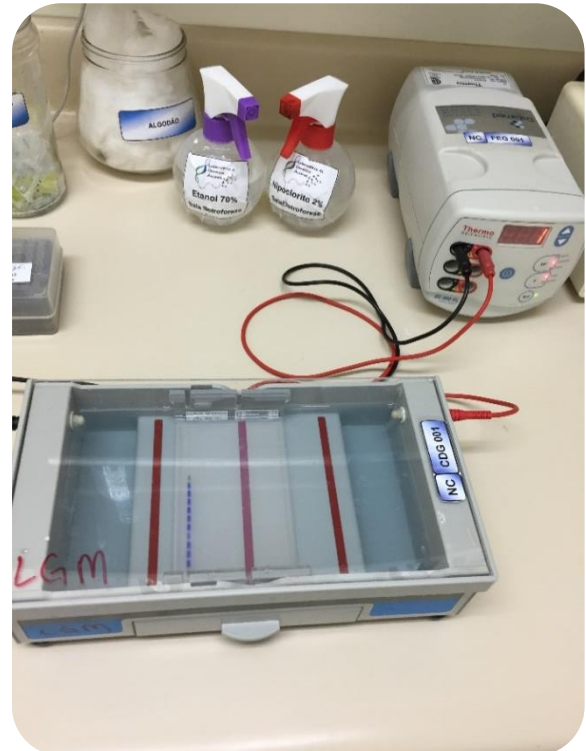
A revelação e registro do Gel foi feita no fotodocumentador (transiluminador de luz ultravioleta).

FIGURA 7: CICLAGEM PARA PCR CONVENCIONAL UTILIZANDO O MÉTODO PARA GENE HALOTANO.



FONTE: Arquivo Pessoal (2017).

FIGURA 8: AMOSTRAS DEPOSITADAS EM GEL DE AGAROSE DENTRO DE UMA CUBA DE ELETROFORESE.



### 3.3.3. Resultados e Discussão

Para a leitura dos resultados, observou-se os pares de base marcados no gel (Figura 15). O *ladder* adicionado aos poços laterais são como “escadas”, e funcionam como marcadores, possuindo trechos de DNA com diferentes tamanhos. Este contém

14 fragmentos, que marcam a cada 100 pb. Ou seja, em uma extremidade do gel, mais próxima aos poços onde foram depositadas as amostras, encontram-se as bandas maiores (1400 pb) e em outra, as bandas menores (100 pb). Isso se dá porque, bandas maiores demoram mais para passar no gel, enquanto bandas menores, passam com mais facilidade.

As enzimas de restrição são responsáveis por clivar o DNA na região de interesse, resultando em fragmentos de diferentes tamanhos, que no gel de agarose, são separadas em forma de bandas (marcas retangulares de coloração branca de variadas intensidades).

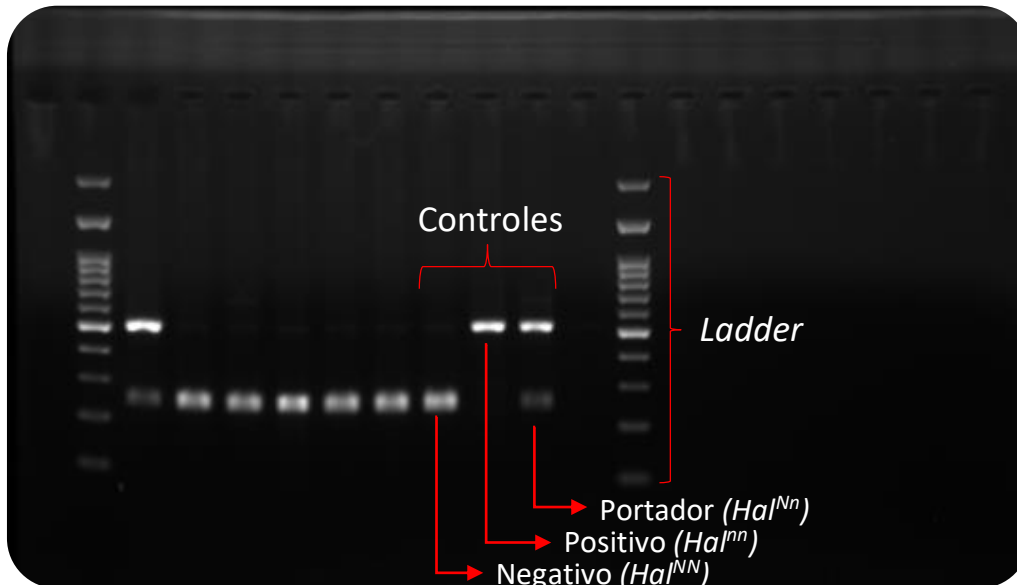
Fisiologicamente, o cromossomo contém o material genético da mãe e o material genético do pai, estes possuem os mesmos pares de base. Entretanto, quando surge uma mutação, como é o caso do gene Halotano, no cromossomo 6, ocorre a substituição da citosina, pela timina, na posição 1843 (GUIMARÃES; EUCLYDES, 1999). Essa alteração denomina-se SNP casual no gene receptor da rianodina1.

A enzima de restrição é responsável por clivar o DNA na região C (5'-GCG↓C-3' 3'-C↑GCG-5'), sendo assim, animais negativos (NN), tiveram essa região clivada, resultando em bandas menores, com 262pb e 242pb. Enquanto animais positivos (nn), não tiveram a região clivada, pois ela foi substituída por T, e a banda foi maior, com 505pb, conseqüentemente, correu menos pelo gel. Animais portadores, possuem a mutação apenas no material genético oriundo do pai, ou da mãe, e não em ambos, por isso, apenas metade da sequência foi clivada, resultando em bandas com 505pb, 262pb e 242pb.

Portanto, de acordo com a eletroforese em gel de agarose, amplificado por PCR-RFLP, observou-se a presença de 1 animal portador (duas bandas formadas, sendo uma de 500 pb e outra de 250 pb), e 5 animais negativos (uma banda com 250 pb).

Existem países como Dinamarca, Suíça e Suécia, que são livres de Gene Halotano em suas linhagens de suínos, devido a seleção realizada há muitos anos (ANGERAMI, 2004). A longo prazo, a tendência é a extinção total do gene em granjas multiplicadoras (FÁVERO; BELLAVÉR, 2001).

FIGURA 9: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DO GENE HALOTANO, AMPLIFICADO POR PCR-RFLP.



FONTE: Arquivo Pessoal (2017).

#### 3.3.4. Conclusão

A PCR-RFLP foi conclusiva e eficaz para a detecção dos genótipos do gene Halotano. Sendo assim, 5 animais foram negativos e consequentemente selecionados para reprodução. Enquanto 1 animal foi eliminado, por ser portador do alelo deletério do gene.

### 3.4. DETECÇÃO DE GENES CANDIDATOS RELACIONADOS A NECROSE DA CABEÇA DO FÊMUR EM AVES DE 28 dias

#### 3.4.1. Introdução

A Necrose da Cabeça do Fêmur (NCF), também denominada de Necrose Asséptica da Cabeça do Fêmur, Necrose Avascular ou Osteonecrose, é uma doença de origem multifatorial, que resulta em dor, e acontece devido à falta de suprimento sanguíneo na cabeça femoral, consequente a morte das células ósseas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA, 2013).

Como resultado do elevado crescimento populacional e do aumento na demanda por proteína animal, o melhoramento genético possibilitou a criação de aves de corte em um curto período de tempo. Por volta do ano de 1930, uma ave demorava

105 dias para atingir o peso de abate, que na época era de 1,5 kg (HAVENSTEN; FERKET; QURESHI. 2005). Enquanto atualmente, com a automatização dos sistemas de produção e evolução das carcaças, o frango de corte passou a ser abatido com 45 dias, pesando em média 2,5kg (SISTEMA OCEPAR, 2007).

O rápido crescimento e desenvolvimento das aves, associados ao aumento do ganho de peso e aumento da densidade de aves no galpão, têm favorecido o aparecimento de doenças no sistema locomotor (NÄÄS et al. 2012). Acarretando em prejuízos expressivos para o setor avícola. Em um lote, a mortalidade por eliminação pode chegar a 6% (MENDONÇA, 2000).

As perdas econômicas podem evidenciar-se tanto nas granjas, com animais refugos devido ao fato de os mesmos sentirem dor e, conseqüentemente, dificuldade de locomoção, resultando em redução do consumo de água e ração (ALMEIDA PAZ et al. 2009). Quanto nos abatedouros, por condenações de carcaças com presença de hematomas, devido a lesões ou fraturas ósseas, relacionadas a falhas no manejo de apanha, transporte ou pendura dos animais (COLET, 2013).

Segundo Gabriel (2001, p.124), “Todas as funções das células são governadas pela expressão dos genes”. A metodologia mais utilizada atualmente, capaz de avaliar os níveis de expressão dos genes, é a quantificação relativa, realizada no equipamento de PCR em tempo real (qPCR) (MARCHESI et al. 2014). As vantagens desse método são elevada sensibilidade, rápida quantificação de grande volume de amostras, alta acurácia e acompanhamento em tempo real. Qualquer alteração, por menor que seja, na expressão de um gene específico, pode ser verificada (PFAFFL, 2001; GACHON; MINGAM; CHARRIER, 2004).

Para a amplificação dos genes de escolha na qPCR, três reações acontecem repetidamente em variadas temperaturas, são elas: desnaturação da matriz, hibridação e alongamento de iniciadores (GACHON; MINGAM; CHARRIER, 2004). A visualização em tempo real se dá pela presença do fluoróforo SYBR Green I, responsável por se ligar ao DNA e emitir fluorescência (HUGGETT; BUSTIN, 2011). A fluorescência é capturada por uma câmera específica, em diferentes espaços de tempo, e apontada em forma de gráfico no software do computador.

Na técnica para a detecção de genes candidatos, faz-se primeiramente, análises utilizando genes de referência, também denominados genes constitutivos. Estes, são responsáveis por realizar um controle interno da reação, sendo assim, são diferentes dos genes alvos (CHERVONEVA et al., 2010). Os genes de referência são

expressos independente de outros fatores e, basicamente, são responsáveis por processos essenciais e fisiológicos para o organismo (THELLIN, 1999).

Desta maneira, o objetivo deste estudo foi detectar os genes candidatos relacionados à necrose da cabeça do fêmur em frangos de corte de 28 dias, por meio de análises em genes constitutivos: RPLP-1, RPL30, HMBS, GAPDH, B2M, RPL-4 e HPRT-1. E genes alvos: PERP, FAM180A, ANGPTL-7, COL8A1, COL14A1, ABI3BP, PRRX-1, CHST-1 e LEPR.

#### 3.4.1.1. Genes Constitutivos

##### 3.4.1.1.1. *Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P1 (RPLP1)*

O gene RPLP1 localiza-se no cromossomo 2 das aves e é responsável pela decodificação de proteínas ribossômicas. Sua principal função está relacionada a atividade ativadora da proteína Quinase, além de ser constituinte estrutural do ribossomo (NCBI, 2017). A expressão deste gene ocorre principalmente no cérebro, cólon, coração, rim, fígado, pulmão, musculo esquelético, baço e testículos (ENSEMBL, 2017).

##### 3.4.1.1.2. *Ribosomal Protein L30 (RPL30)*

O gene RPL30 está localizado no cromossomo 2 das aves e é responsável pela decodificação de proteínas ribossomais (NCBI,2017). Ele possui funções moleculares como tradução do mRNA viral e processamento de rRNA no núcleo e no citosol, além de ser constituinte estrutural do ribossomo. Também está relacionado a processos biológicos, como resposta imune humoral antimicrobiana. Sua expressão acontece principalmente no cérebro, cólon, coração, rim, fígado, pulmão, musculo esquelético, baço e testículos (ENSEMBL, 2017).

##### 3.4.1.1.3. *Hydroxymethylbilane Synthase (HMBS)*

O gene HMBS é considerado um dos genes de referência mais estáveis para realização da qPCR (NASCIMENTO, 2015). Está localizado no cromossomo 24 das aves. Sua expressão se dá principalmente no cérebro, cólon, coração, rim, fígado,

pulmão, baço, testículos, e em menor quantidade no músculo esquelético (ENSEMBL, 2017). Sua principal função está relacionada à síntese da molécula Heme, mais abundante no sangue, porém, essencial para todos os órgãos do corpo (GENETICS HOME REFERENCE, 2017).

#### 3.4.1.1.4. *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH)*

O gene GAPDH se encontra no cromossomo 1 das aves. Ele está diretamente relacionado ao processo de glicólise, também possui funções moleculares e nucleares como: transcrição, transporte de RNA, replicação de DNA e apoptose (UNIPROT, 2017). Sua expressão ocorre principalmente no cérebro, cólon, coração, rim, fígado, pulmão, músculo esquelético, baço e testículos (ENSEMBL, 2017).

#### 3.4.1.1.5. *Beta-2-Microglobulin (B2M)*

O gene B2M está localizado no cromossomo 10 das aves. Sua principal ação está relacionada ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Juntamente com outras proteínas exerce função na ativação do sistema imune (UNIPROT, 2017). Participa de processos biológicos como diferenciação de células T no Timo, importação de ferro férrico, regulação negativa do desenvolvimento da projeção do neurônio e regulação na diferenciação dos eritrócitos (NCBI, 2017). Sua expressão acontece principalmente no cólon, rim, fígado, pulmão, músculo esquelético e baço. E em menor quantidade no cérebro, coração e testículos (ENSEMBL, 2017).

#### 3.4.1.1.6. *Ribosomal Protein L4 (RPL4)*

O gene RPL4 está localizado no cromossomo 10 das aves. Em humanos este gene é constituinte estrutural do ribossomo e está envolvido em processos biológicos como tradução citoplasmática, processamento de rRNA e transcrição viral (UNIPROT, 2017). Sua expressão ocorre principalmente nos rins e nos testículos (ENSEMBL, 2017).

#### 3.4.1.1.7. *Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase (HPRT-1)*

O gene HPRT-1 se encontra no cromossomo 4 das aves. Sua principal função é converter a guanina em monofosfato de guanosina e hipoxantina para monofosfato de inosina (UNIPROT, 2017). Também está envolvido em alguns processos biológicos como desenvolvimento de neurônios do sistema nervoso central, diferenciação de neurônios do córtex cerebral, desenvolvimento do estriado e comportamento do sistema locomotor (NCBI, 2017).

#### 3.4.1.2. Genes Alvos

##### 3.4.1.2.1. *TP53 Apoptosis Effector* (PERP)

O gene efetor de apoptose também conhecido por TP53 está relacionado com a regulação da transcrição dos genes referentes à morte celular. Em humanos, este gene reproduz uma função na integridade epitelial estratificada e na adesão célula-célula, possibilitando a montagem do desmossomo (junção ancoradora) (GENECARDS, 2017). Em aves, este gene se encontra no cromossomo 3 (ENSEMBL, 2017).

##### 3.4.1.2.2. *Family with Sequence Similarity 180 Member A* (FAM180A)

O gene Família com similaridade de sequência 180 membro A, localiza-se no cromossomo 1 das aves (NCBI, 2017). De acordo com Kosla, Dvorak e Cermak (2012), este gene pode estar associado ao Fator de Transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ), proteína responsável por controlar a proliferação e diferenciação celular, além de estar relacionada ao sistema imunológico.

##### 3.4.1.2.3. *Angiopoietin-Like 7* (ANGPTL-7)

O gene Angiopoetina tipo 7 está localizado no cromossomo 21 dos frangos (NCBI, 2017). A regulação da expressão deste gene ocorre pela hipóxia, portanto, é considerado um fator pró-angiogênico (PARRI et al. 2014). Também atua promovendo o crescimento e repovoamento de células estaminais hematopoiéticas e células progenitoras, capazes de transformarem-se em células de diferentes linhagens celulares (XIAO, et al. 2015).

#### 3.4.1.2.4. *Collagen Type VIII Alpha 1 Chain (COL8A1)*

O gene Colágeno do tipo VIII de Cadeia Alfa 1 está localizado no cromossomo 1 das aves (NCBI, 2017). É um importante componente da membrana basal do endotélio da córnea (membrana de Descemet), do endotélio de vasos sanguíneos e possui influência significativa na manutenção da integridade e estrutura da parede vascular (GENECARDS, 2017). Também está associado a microfibrilas de alguns sistemas de fibras elásticas (SAWADA e KONOMI, 1991).

#### 3.4.1.2.5. *Collagen Type XIV Alpha 1 Chain (COL14A1)*

O gene Colágeno do tipo XIV de Cadeia Alfa 1, localiza-se no cromossomo 2 dos frangos (NCBI, 2017). É fundamental para a síntese de colágeno e também atua na regulação da fibrilogênese (GENECARDS, 2017; YOUNG et al., 2002). A expressão deste gene em frangos de corte ocorre principalmente em tecidos conjuntivos densos como pele, tendões, córnea e cartilagem articular (CASTAGNOLA et al., 1992; YOUNG; GORDON; BIRK, 2000).

#### 3.4.1.2.6. *ABI Family Member 3 Binding Protein (ABI3BP)*

Na espécie *Gallus gallus* o gene denominado Proteína de Ligação membro 3 da Família ABI está localizado no cromossomo 1 (NCBI, 2017). A função biológica deste gene ainda é pouco conhecida, entretanto, sabe-se que em humanos ele atua no controle e equilíbrio de células-tronco não hematopoiéticas, em processos como proliferação, diferenciação, adesão, morfologia e transformação (HODGKINSON et al., 2013). Zhang et al. (2014) relatou que o gene ABI3BP está relacionado com a susceptibilidade à osteocondropatias crônicas, como a doença de Kashin-Beck em humanos, responsável pela degeneração de cartilagens, necrose dos condrócitos e apoptose.

#### 3.4.1.2.7. *Paired Related Homeobox 1 (PRRX1)*

O gene da família Homeobox está localizado no cromossomo 8 das galinhas (NCBI, 2017). Em humanos este gene codifica uma proteína responsável por regular a creatina quinase muscular, liberada quando o organismo é submetido a elevadas proporções de estresse físico (GENECARDS, 2017). Em um estudo utilizando pintainhos, Meijlink et al. (1999) identificou uma marcante relação deste gene com a morfogênese do esqueleto, além de estar presente no mesênquima dos membros em desenvolvimento.

#### 3.4.1.2.8. *Carbohydrate Sulfotransferase 1 (CHST1)*

Pertencente à família das Sulfotransferases, este gene está situado no cromossomo 5 da espécie *Gallus gallus* (NCBI, 2017). Em humanos sua expressão foi relatada em células endoteliais vasculares, que podem estar relacionadas a síntese de ligantes de L-selectina, responsáveis pela localização dos linfócitos, durante a resposta inflamatória (LI; TEDDER, 1999).

#### 3.4.1.2.9. *Leptin Receptor (LEPR)*

O gene Receptor de Leptina está localizado no cromossomo 8 do frango de corte (NCBI, 2017). A leptina é um hormônio responsável por controlar o peso corporal. Alterações neste gene estão relacionadas à obesidade (GENECARDS, 2017). Em estudos recentes utilizando camundongos, Decker et al. (2017) relacionou este gene à deposição de tecido fibrótico na região da medula óssea, resultando em mielofibrose.

### 3.4.2. Material e Métodos

As amostras foram obtidas a partir da extremidade do fêmur de animais normais/controle (749, 759, 761, 784, 788 e 789) e afetados (742, 758, 764, 766, 782 e 792) de frangos de corte machos, da linhagem Cobb 500®, com 28 dias de idade. Para melhor eficiência das análises e posterior extração do RNA, todo o material colhido foi armazenado em ultrafreezers à temperatura de -80°C.

As amostras de fêmur das aves foram pesadas e maceradas individualmente, com auxílio de pistilo e almofariz de porcelana. Durante todo este processo utilizou-se

nitrogênio líquido para conservação da integridade das amostras. Para a extração do RNA total utilizou-se o reagente TRIzol® da marca Invitrogen®, de acordo com o protocolo. A cada 100 mg de tecido ósseo, foi adicionado 1 mL de TRIzol® em tubo de polipropileno de 1,5 mL. Posteriormente, as amostras foram vortexadas para homogeneização e incubadas à temperatura ambiente (25°C) por 5 minutos. Após o período de incubação, foram acrescentados 200 µL de Clorofórmio aos tubos, que novamente foram vortexados e mantidos à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas durante 15 minutos, à velocidade de 16.000 xg e temperatura de 4°C. A centrifugação promoveu a separação do material do tubo em três fases, sendo elas: fase aquosa, onde está contido o RNA, fase orgânica e interfase, onde se encontram as impurezas (Figura 16). A fase aquosa foi selecionada, adicionada a um novo tubo com 500 µL de Isopropanol, levemente homogeneizada por inversão e incubada à temperatura ambiente por 10 minutos. Seguidamente as amostras foram centrifugadas à velocidade de 13.000 xg, durante 10 minutos, à temperatura de 4°C, visando a formação de um *pellet* contendo o RNA. O sobrenadante presente no microtubo foi descartado, e no mesmo microtubo foi adicionado 1 mL de álcool 75% para lavagem. Após a centrifugação, em velocidade de 10.500 xg, o álcool foi descartado e os microtubos contendo o *pellet* foram colocados no interior de uma estufa, onde ficaram por cerca de 15 minutos para secagem total, não podendo restar nada de etanol. Para ressuspender o *pellet* de RNA, foram adicionados 30 µL de água DEPC aos microtubos. Por fim, as amostras foram colocadas em banho seco por 10 minutos, à temperatura de 55°C.

Posteriormente, as amostras foram submetidas à quantificação no aparelho BioDrop® e avaliação de integridade por meio da eletroforese em gel de agarose 1,5% (Figura 17). Devido à baixa qualidade (pureza) das amostras na primeira quantificação, realizou-se o “Protocolo de Precipitação de RNA com Acetato de Sódio”. Para isto, adicionou-se 0,1 volume de acetato de sódio 3M (0,1 x 30 µL de RNA) + 2,5 volumes de etanol absoluto gelado (2,5 x 30 µL de RNA). A homogeneização foi feita delicadamente por inversão. As amostras permaneceram no ultrafreezer à temperatura de -80°C por 24 horas. Após este período, os microtubos foram centrifugados por 30 minutos, em velocidade máxima e à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 500 µL de Etanol 75% (preparado com água DEPC), para a lavagem do *pellet*. Em seguida, o material foi novamente centrifugado a fim de que o *pellet* formado ficasse bem preso ao fundo do microtubo.

O sobrenadante foi descartado e os microtubos foram colocados no interior de uma estufa para a secagem total. O *pellet* foi ressuspendido com a utilização de água DEPC (30 µL) e os microtubos foram colocados no banho seco à temperatura de 55°C, durante 10 minutos. Após este processo as amostras foram novamente quantificadas no aparelho BioDrop®. Os resultados da quantificação estão descritos na tabela 1.

Para síntese de cDNA seguiu-se as recomendações do Protocolo de Síntese de cDNA – SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix (número do catálogo – 18080-400) da marca Invitrogen®. Para o primeiro *mix* de RNA/*primer* foram utilizados 3 µg de RNA total para cada amostra. O cálculo elaborado visou um volume final total de RNA igual a 8 µL ( $C1 \times V1 = C2 \times V2$ ), onde: C1 foi o valor obtido na quantificação pelo aparelho BioDrop®, V1 foi o volume procurado, C2 foi o valor de 3000 µg estabelecido pelo Kit e V2 foi o volume final desejado, de 8 µL (a quantidade usada de RNA e de água estão descritas na tabela 1). Sendo assim, amostras que continham RNA mais puro na quantificação, exigiram maior quantidade de água DEPC e menor quantidade de RNA, enquanto amostras que continham RNA mais diluído, obrigatoriamente precisaram de menor quantidade de água DEPC e maior quantidade de RNA. Posteriormente foi adicionado à mistura 1 µL de *Primer* OligoDT 50 uM e 1 µL de tampão de anelamento, totalizando 10 µL. Os microtubos contendo o *mix* foram incubados no termociclador durante 5 minutos à temperatura de 65°C, ao fim do ciclo, foram resfriadas em gelo por 1 minuto. Em um tubo separado, elaborou-se o segundo *mix* contendo 10 µL de 2X *First-Strand Reaction Mix* e 2 µL de *SuperScript® III/RNaseOUT™ Enzyme Mix*, totalizando 12 µ (valores utilizados para 1 microtubo). Após o resfriamento dos tubos, foram adicionados 12 µL do segundo *mix* em cada amostra, que posteriormente foram misturadas com as mãos, centrifugadas rapidamente (*spin*) e incubadas no termociclador com a seguinte ciclagem: 50°C por 50 minutos e 85°C por 5 minutos. Por fim, as amostras foram armazenadas à temperatura de -20°C para posterior etapa de qPCR.

Para a PCR em tempo real elaborou-se o *mastermix*, composto por *Master Mix 2x sybr green*, *Primer Forward* (F) e *Primer Reverse* (R) de cada gene estudado, água ultra pura e cDNA (valores e cálculos descritos na tabela 2). Foram selecionados 7 genes constitutivos (RPLP-1, RPL30, HMBS, GAPDH, B2M, RPL-4 e HPRT-1) e 9 genes alvos (PERP, FAM180A, ANGPTL-7, COL8A1, COL14A1, ABI3BP, PRRX-1, CHST-1 e LEPR), subdivididos em placas ópticas de qPCR com 96 poços. Todas as amostras foram preparadas em duplicatas. Cada gene continha um poço da placa

com controle negativo (sem cDNA), para verificar a ausência de contaminação. A sequência das amostras nas placas foi: 761, 742, 789, 759, 784, 749, 788, 766, 792, 764, 758 e 782. Devido à quantidade de genes, as amostras foram organizadas em 7 placas. Primeiramente, foram adicionados à placa 13 µL de *mastermix* e em seguida, 2 µL do cDNA de cada animal, na sequência já descrita. A placa foi vedada com adesivo transparente (*Optical Adesive Covers*) e centrifugada por alguns segundos, para que todo conteúdo ficasse ao fundo. As amostras foram alocadas no equipamento *QuantStudio™ 6 Flex (Applied Biosystems)*, que foi programado da seguinte forma: *QuantStudio 6 → Fast 96 Well 0,1 mL → Comparative ΔCT → Saybr green → Standard curve*. Com a seguinte ciclagem: 1 ciclo de 10 minutos a 95°C (desnaturação inicial), 40 ciclos de 15 segundos a 95°C (desnaturação) e 1 minuto a 60°C (anelamento e extensão). As condições para curva de *Melting* foram: 1 ciclo de 95°C por 15 segundos, 1 ciclo de 60°C por 1 minuto e dissociação de 95°C por 15 segundos. Ao final de todas as análises no equipamento, foram extraídos os dados necessários para análise estatística, como média, desvio padrão e coeficiente de variação.

A análise estatística foi executada por meio do programa REST 2009 (*Relative Expression Software Tool*), responsável por realizar a análise da expressão relativa dos genes, comparando dois grupos, ou seja, comparando a razão da expressão do grupo alvo em relação ao grupo controle, por meio de um teste de randomização.

Modelo matemático utilizado:

$$\text{Razão} = (E_{alvo})^{\Delta CP_{alvo}} / (E_{ref})^{\Delta CP_{ref}}$$

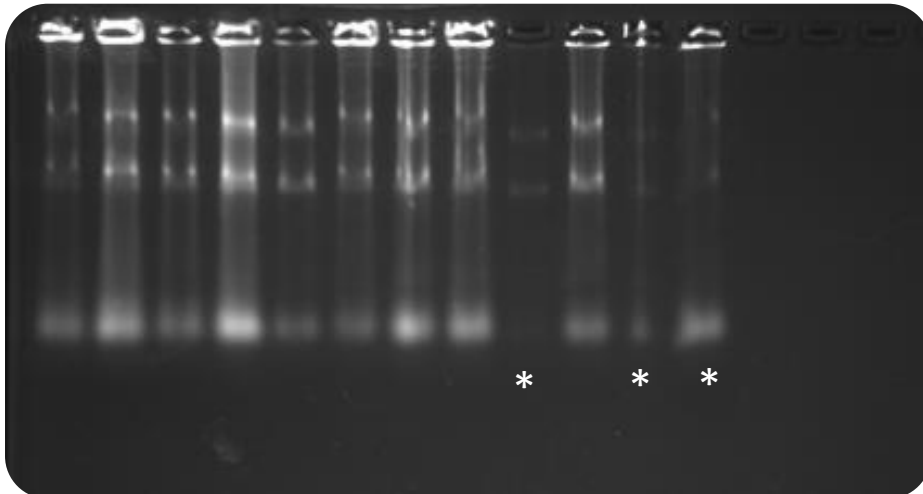
Onde, a razão de expressão é calculada segundo a eficiência da PCR em tempo real ( $E$ ) e na diferença do ponto de cruzamento ( $\Delta CP$ ) em relação ao gene constitutivo selecionado (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLÉ, 2002).

FIGURA 10: TUBO DE POLIPROPILENO CONTENDO AMOSTRAS COM TRIZOL® APÓS A CENTRIFUGAÇÃO, RESULTANDO EM TRÊS FASES: AQUOSA (RNA), INTERFASE (DNA) E ORGÂNICA (RESÍDUOS).



FONTE: Arquivo pessoal (2017).

FIGURA 11: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE PARA VERIFICAR A INTEGRIDADE DO RNA TOTAL.



FONTE: Arquivo Pessoal (2017).

\* Menor quantidade de amostras no poço. Não afeta a análise.

TABELA 3: AMOSTRAS QUANTIFICADAS NO APARELHO BIODROP®, COM OS VALORES DE RNA E H<sub>2</sub>O JÁ CALCULADOS PARA A SÍNTESE DE CDNA.

Amostras NCF			Quantificação RNA precipitado (BioDrop®)			
Amostras	Peso (g)	Quantificação (ng/μL)	A260/230	A260/280	RNA	H <sub>2</sub> O
761	0,070	1500,1	1,4	1,95	2,00	6,00
742	0,070	1062,0	1,7	1,98	2,82	5,18
789	0,070	470,00	1,5	1,94	6,38	1,62
759	0,100	1085,0	1,8	2,00	2,76	5,24
784	0,100	877,80	1,6	1,94	3,42	4,58
788	0,100	1676,0	1,8	1,98	1,79	6,21
749	0,100	1001,8	1,9	2,00	2,99	5,01
766	0,080	1544,2	1,6	1,92	1,94	6,06
792	0,080	792,20	1,4	1,96	3,79	4,21
764	0,100	792,20	1,6	1,97	3,79	4,21
758	0,080	945,20	1,2	1,92	3,17	4,83
782	0,100	365,40	1,8	1,92	3,47	4,53

FONTE: Arquivo Pessoal (2017).

TABELA 4: VALORES DE REAGENTES UTILIZADOS PARA A SÍNTESE DO MASTERMIX.

Reagentes	X1	X26 *
Master Mix 2x Sybr Green	7,5 μL	195
Primer F (2MicroMol)	1,0 μL	26
Primer R (2MicroMol)	1,0 μL	26
H <sub>2</sub> O	3,5 μL	91
cDNA	2 μL	-
Total	15 μL	-

FONTE: Arquivo Pessoal (2017).

\* Os valores foram multiplicados por 26 devido ao número de amostras em duplicatas, juntamente com uma amostra de controle negativo e uma amostra a mais caso haja falha de pipetagem.

### 3.4.3. Resultados e discussão

Com base nos dados oriundos da qPCR, o *software* gerou um gráfico correspondente à expressão relativa dos genes (Figura 14). De acordo com os resultados obtidos (Tabela 5), não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) na expressão de nenhum dos genes analisados, em frangos de corte aos 28 dias de idade, afetados ou não com necrose da cabeça do fêmur.

O fato de nenhum dos genes alvos terem sido validados, propõe que possivelmente não exista relação entre a expressão do gene em si e a ocorrência da doença nesta faixa etária, apesar de vários genes analisados já terem sido detectados em animais com diversas idades e citados na literatura, por exemplo, Carmo et al. (2016) relataram uma expressão de 4 vezes menos que o normal do gene CHST1 em frangos de corte com 35 dias de idade, afetados com a doença, sugerindo que a menor concentração deste gene resulta em menor vascularização do tecido ósseo e portanto, morte celular. Além de estar relacionado com o recrutamento de células de defesa para o sítio de inflamação, sendo assim, sua menor expressão pode resultar em falhas

no mecanismo de defesa dos ossos, favorecendo o aparecimento de bactérias. Entretanto, neste experimento o gene CHST1 apresentou expressão de 0,967, portanto, não houve diferença estatística ( $p>0,05$ ).

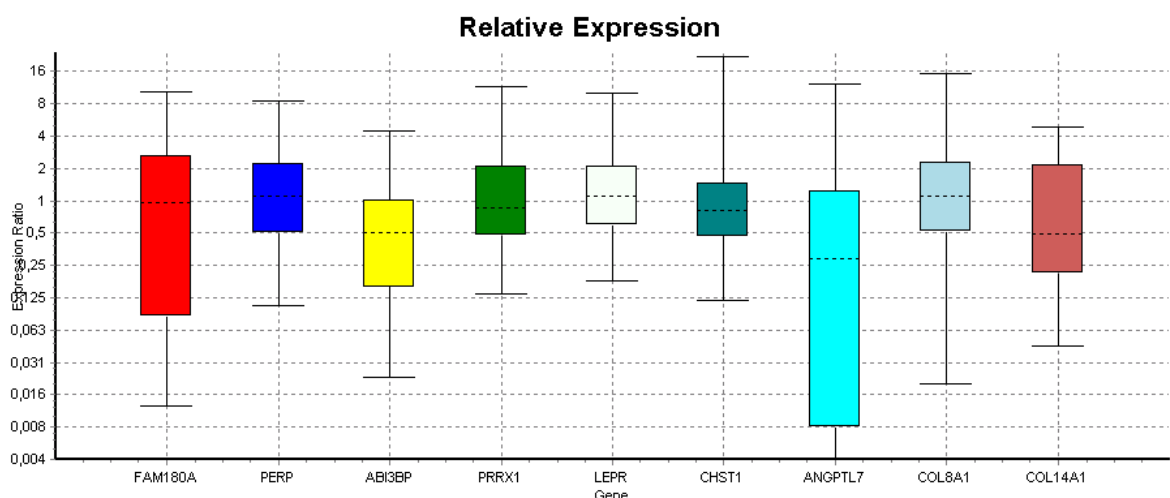
Através de um estudo semelhante analisando o Gene LEPR e utilizando frangos de corte com 45 dias de idade, afetados com NCF, Marchesi et al. (2014) relatou a ausência de diferença estatística ( $p>0,05$ ) em suas análises, bem como no presente estudo, onde a expressão do mesmo foi de 0,735 ( $p>0,05$ ).

Embora nenhum dos genes alvos analisados (FAM180A, PERP, ABI3P, PRRX1, LEPR, CHST1, ANGPTL7, COL8A1, COL14A1) tenham exercido influência significativa para necrose da cabeça do fêmur em frangos de corte de 28 dias de idade, isso não descarta a possibilidade dos mesmos estarem envolvidos nesta desordem óssea em outras faixas etárias, uma vez que todos os genes estudados possuem relação com a fisiologia do osso.

#### 3.4.4. Conclusão

De acordo com este estudo, não houve relação entre os Genes alvos analisados e Necrose da Cabeça do Fêmur em frangos de corte de 28 dias de idade. Entretanto, são necessários mais estudos, em animais de diferentes idades, para descartar a influência destes genes sobre desenvolvimento da doença.

FIGURA 12: EXPRESSÃO RELATIVA DOS GENES ALVOS FAM180A, PERP, ABI3P, PRRX1, LEPR, CHST1, ANGPTL7, COL8A1, COL14A1.



FONTE: Arquivo Pessoal (2017).

TABELA 5: RESULTADOS DA EXPRESSÃO RELATIVA DE OITO GENES ALVOS, QUANDO COMPARADOS A DOIS GENES DE REFERÊNCIA.

<b>GENE</b>	<b>TIPO</b>	<b>EXPRESSÃO</b>	<b>ERRO PADRÃO</b>	<b>P(H1)</b>
RPLP1	Referência	1,045	-	-
FAM180A	Alvo	0,534	0,052 - 3,221	0,461
PERP	Alvo	1,029	0,388 - 2,950	0,958
ABI3P	Alvo	0,413	0,123 - 1,546	0,158
PRRX1	Alvo	0,972	0,338 - 2,777	0,942
LEPR	Alvo	1,168	0,469 - 3,263	0,735
CHST1	Alvo	0,978	0,301 - 2,310	0,967
ANGPTL7	Alvo	0,118	0,002 - 2,898	0,186
COL8A1	Alvo	0,878	0,233 - 3,442	0,869
COL14A1	Alvo	0,590	0,161 - 2,476	0,387
HPRT1	Referência	0,957	-	-

FONTE: Arquivo Pessoal (2017).

#### **4. CONCLUSÃO**

Com o comprovado aumento populacional diretamente relacionado ao aumento no consumo de proteína animal, torna-se indispensável o desenvolvimento de pesquisas visando a expansão da produção e da qualidade de produtos avícolas e suínícolas. O Brasil tornou-se um país com potencial competência para desenvolver estudos nestas áreas, uma vez que lidera os rankings de produção e exportação nas duas culturas e tende a crescer ainda mais.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) é considerada líder em desenvolvimento de pesquisas e inovações no âmbito nacional. Podendo-se ainda destacar o competente e renomado grupo de pesquisadores que contemplam a área de genética animal.

O desenvolvimento do estágio curricular na Embrapa Aves e Suínos proporcionou ampliar os conhecimentos na área de genética animal e aprimorar os conceitos já adquiridos na Universidade. Poder participar de projetos e pesquisas conceituados, acompanhando pessoas com alto nível de conhecimento no assunto, foi uma grande honra e, o mais importante, promoveu um considerável crescimento pessoal e profissional.

Com a conclusão do curso de Medicina Veterinária em uma admirável Universidade e com a realização do estágio em uma ilustre Empresa, posso afirmar a concretização de um sonho e a plena convicção de que escolhi o caminho certo a seguir.

## REFERÊNCIAS

- ABERLE, E.D. et al. **Principles of meat science**. 4. Iowa: Kendall/Hunt Publishing Company, 2001. 354p.
- ALENCAR, S.A. **Utilização de ferramentas computacionais para o estudo do impacto funcional e estrutural de nsSNPs em genes codificadores de proteínas**. 128f. Tese (Doutorado em Bioinformática) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, 2010.
- ALMEIDA PAZ I.C.L., et al. Follow-up of the development of femoral degeneration lesions in broilers. **International Journal of Morphology**, v.27, p.571-575. 2009.
- ANGERAMI, C.N. **Influência do Genótipo, Sexo e Peso de Abate na Composição da Carcaça e nas Características de Qualidade da Carne Suína**. 2004. 154 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba – SP, 2004.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL – ABPA. **Relatório anual – 2016**. Disponível em: < [http://abpa-br.com.br/storage/files/versao\\_final\\_para\\_envio\\_digital\\_1925a\\_final\\_abpa\\_relatorio\\_anual\\_2016\\_portugues\\_web1.pdf](http://abpa-br.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf) > Acesso: 09 ago. 2017.
- AUSUBEL, F.M. et al. **Current protocols in molecular biology**. Nova Iorque: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, 2003. 4648p.
- AVILA, V.S. et al. **Boas práticas de Produção de Frangos de Corte**. Concórdia, SC: Embrapa, 2007, 28p. Circular técnica: 51.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. **Informe econômico da política agrícola**. Abril/2016. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/arquivos-deestatisticas/edicao-n-04-2016.pdf/view> > Acesso: 09 ago. 2017.
- CAMPOS, R.L.R. et al. Otimização e comparação de protocolos para extração de DNA de sangue de aves. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 49., 2003. Águas de Lindóia, São Paulo. **Resumo...** Águas de Lindóia: SBG, 2003. p.19.
- CARMO, K. B. et al. Expressão do gene *chst-1* em frangos de corte normais e afetados pela necrose da cabeça do fêmur. In: Jornada de Iniciação Científica, 10, 2016, Concórdia, **Anais**, Concórdia, Santa Catarina, Embrapa Suínos e Aves, 2016, p.32-33.
- CARPENTER, D. et al. Genetic variation in RYR1 and malignant hyperthermia phenotypes. **British Journal of Anaesthesia**, v.103, n.4, p.538-548. Jul. 2009.
- CASTAGNOLA, P. et al. Tissue-specific expression of type XIV collagen—a member of the FACIT class of collagens. **European Journal of Cell Biology**, v.59, n.2, p.340-347. Dez. 1992.

CHERVONEVA, I. et al. Selection of optimal reference genes for normalization in quantitative RT-PCR. **BMC Bioinformatics**, v.11. Mai. 2010.

COLET, S. **Características ósseas de frangos de corte suplementados com diferentes níveis de vitamina D**. 74f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados – MS, 2013.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Perspectivas para a agropecuária**. Brasília, v.4, 129p. Set. 2016.

CULAU, P.O.V. et al. Influência do gene Halotano sobre a Qualidade da Carne Suína. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.2, p.954-961. 2002.

DECKER, M. et al. Leptin-receptor-expressing bone marrow stromal cells are myofibroblasts in primary myelofibrosis. **Nature cell biology**, v.19, n.6, p.677-688. Mai. 2017.

EMBRAPA SUÍNOS E AVES. **Apresentação**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/apresentacao>> Acesso: 17 ago. 2017.

ENSEMBL GENOME BROWSER 90. **Gene B2M**. 2017. Disponível em: <[http://www.ensembl.org/Gallus\\_gallus/Gene/ExpressionAtlas?db=core;g=ENSGALG00000002160;r=10:1254940-1257208;t=ENSGALT00000040255](http://www.ensembl.org/Gallus_gallus/Gene/ExpressionAtlas?db=core;g=ENSGALG00000002160;r=10:1254940-1257208;t=ENSGALT00000040255)> Acesso em: 10 out. 2017.

ENSEMBL GENOME BROWSER 90. **Gene GAPDH**. 2017. Disponível em: <[http://www.ensembl.org/Gallus\\_gallus/Gene/Phenotype?db=core;g=ENSGALG0000014442;r=1:76950864-76956805](http://www.ensembl.org/Gallus_gallus/Gene/Phenotype?db=core;g=ENSGALG0000014442;r=1:76950864-76956805)> Acesso em: 10 out. 2017.

ENSEMBL GENOME BROWSER 90. **Gene HMBS**. 2017. Disponível em: <[http://www.ensembl.org/Gallus\\_gallus/Gene/Summary?db=core;g=ENSGALG0000042939;r=24:36245-47018](http://www.ensembl.org/Gallus_gallus/Gene/Summary?db=core;g=ENSGALG0000042939;r=24:36245-47018)> Acesso em: 10 out. 2017.

ENSEMBL GENOME BROWSER 90. **Gene PERP**. 2017. Disponível em: <[http://www.ensembl.org/Gallus\\_gallus/Gene/Summary?db=core;g=ENSGALG0000027536;r=3:54693252-54709177;t=ENSGALT00000044666](http://www.ensembl.org/Gallus_gallus/Gene/Summary?db=core;g=ENSGALG0000027536;r=3:54693252-54709177;t=ENSGALT00000044666)> Acesso em: 16 out. 2017.

ENSEMBL GENOME BROWSER 90. **Gene RPL30**. 2017. Disponível em: <[http://www.ensembl.org/Gallus\\_gallus/Gene/ExpressionAtlas?db=core;g=ENSGALG00000029897;r=2:128050861-128055217](http://www.ensembl.org/Gallus_gallus/Gene/ExpressionAtlas?db=core;g=ENSGALG00000029897;r=2:128050861-128055217)> Acesso em: 08 out. 2017.

ENSEMBL GENOME BROWSER 90. **Gene RPLP1**. 2017. Disponível em: <[http://www.ensembl.org/Gallus\\_gallus/Gene/Summary?db=core;g=ENSGALG0000030878;r=2:145812305-145813467](http://www.ensembl.org/Gallus_gallus/Gene/Summary?db=core;g=ENSGALG0000030878;r=2:145812305-145813467)> Acesso em: 08 out. 2017.

ESTADOS UNIDOS. Department of agriculture. **USDA.gov – United States Departmente of Agriculture**. 2016. Disponível em: <<https://www.ers.usda.gov/topics/animal-products/>>. Acesso: 09 ago. 2017.

- FÁVERO, J.A.; BELLAVER, C. **Produção de Carne de Suínos**. 2001. Disponível em: <[http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc\\_arquivos/palestras\\_q7t2f5k.pdf](http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_arquivos/palestras_q7t2f5k.pdf)> Acesso: 21 set. 2017.
- FUJII, J. et al. Identification of a Mutation in Porcine Ryanodine Receptor Associated with Malignant Hyperthermia. **Science**, v. 253, n.5018, p.448-451, jul. 1991.
- GABRIEL, J.E. Emprego das Técnicas de Biologia Molecular nos Estudos de Expressão Gênica. *In*: REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. (Ed.). **Biologia Molecular: Aplicada à Produção Animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.124-134.
- GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**, v.55, n.402, p.1445-1454. Jun. 2004.
- GENECARDS. **COL8A1 Gene**. 2017. Disponível em: <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=COL8A1&keywords=col8a1>> Acesso em: 17 out. 2017.
- GENECARDS. **PERP Gene**. 2017. Disponível em: <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PERP&keywords=PERP>> Acesso em: 16 out. 2017.
- GENECARDS. **PRRX1 Gene**. 2017. Disponível em: <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PRRX1&keywords=prrx1>> Acesso em: 18 out. 2017.
- GENECARDS. **COL14A1 Gene**. 2017. Disponível em: <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=COL14A1&keywords=col14a1>> Acesso em: 17 out. 2017.
- GENECARDS. **LEPR Gene**. 2017. Disponível em: <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LEPR&keywords=LEPR>> Acesso em: 19 out. 2017.
- GENETICS HOME REFERENCE. **HMBS gene**. 2017. Disponível em: <<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/HMBS#location>> Acesso em: 10 out. 2017.
- GUIMARÃES, S.E.F.; EUCLYDES, R.F. Frequência da Mutação Gene da Síndrome do Estresse Suíno e sua Associação com Características Reprodutivas em Marrãs Híbridas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.28, n.3, p.490-494. 1999.
- HAVENSTEIN, G.B.; FERKET, P.R.; QURESHI, M.A. Growth, livability, and feed conversion of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. **Poultry Science**, v.82, n.10, p.1500-1508. 2003.
- HIGUCHI, R. Simple and rapid preparation of samples for PCR. *In*: Erlich, H.A. de (Ed.). **PCR technology: principles and applications for DNA amplification**. UK: Macmillan Publishers, 1989. p.17-22.
- HODGKINSON, C.P. et al. Abi3bp is a multifunctional autocrine/paracrine factor that regulates mesenchymal stem cell biology. **Stem Cells**, v.31, n.8, p.1669-1682. Ago. 2013.

HUGGETT, J.; BUSTIN, S. Standardisation and reporting for nucleic acid quantification. **Accreditation and Quality Assurance**, v.16, p.399-405. Ago, 2011.

KOSLA, J.; DVORAK, M.; CERMAK, V. Molecular analysis of the TGF-beta controlled gene expression program in chicken embryo dermal myofibroblasts. **Gene**: v.513, n.1, p.90-100. Nov. 2013.

LI, X. TEDDER, T.F. CHST1 and CHST2 Sulfotransferases Expressed by Human Vascular Endothelial Cells: cDNA Cloning, Expression, and Chromosomal Localization. **Genomics**, v.55, n.3, p.345-347. Fev. 1999.

MAGANHINI, M.B. et al. Carnes PSE (*Pale, Soft, Exudative*) e DFD (*Dark, Firm, Dry*) em lombo suíno numa linha de abate industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, p.69-72. Ago. 2007.

MARCHESI, J.A.P. et al. Expressão do gene receptor da leptina (LEPR) em frangos de corte normais e afetados pela necrose da cabeça do fêmur. *In: Jornada de Iniciação Científica*, 8, 2014, Concórdia, **Anais**, Concórdia - Santa Catarina: Embrapa Suínos e Aves, 2014, p.43-44.

MEIJLINK, F. et al. Vertebrate aristaless-related genes. **The International Journal of Developmental Biology**, v.43. n.7, p.651-663. 1999.

MENDONÇA, J.R. Enfermidades do Sistema Locomotor. *In: BERCHIERI JÚNIOR, A; MACARI, M. Doenças das Aves*. Campinas: FACTA, 2000. p.29-36.

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

NÄÄS, I. A. et al. Use of Vitamin D to Reduce Lameness in Broilers Reared in Harsh Environments. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.14, n.3, p.159-232. 2012.

NASCIMENTO, C. S. et al. Identification of Suitable Reference Genes for Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Assays on Pectoralis major Muscle in Chicken (*Gallus gallus*). **Journal Ploss one**, v.10, n.5, p.1-15. Mai. 2015.

NCBI. **ABI3BP ABI family member 3 binding protein [Gallus gallus (chicken)]**. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/769237>> Acesso em: 18 out. 2017.

NCBI. **ANGPTL7 angiopoietin like 7 [Gallus gallus (chicken)]**. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/101750033>> Acesso em: 16 out. 2017.

NCBI. **B2M beta-2-microglobulina [Gallus gallus (frango)]**. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/414830>> Acesso em: 10 out. 2017.

NCBI. **CHST1 carbohydrate sulfotransferase 1 [Gallus gallus (chicken)]**. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/428866>> Acesso em: 18 out. 2017.

NCBI. **COL14A1 collagen type XIV alpha 1 chain [Gallus gallus (chicken)]**. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/396276>> Acesso em: 17 out. 2017.

NCBI. **COL8A1 collagen type VIII alpha 1 chain [Gallus gallus (chicken)]**. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/418378>> Acesso em: 16 out. 2017.

NCBI. **FAM180A family with sequence similarity 180 member A [Gallus gallus (chicken)]**. 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/772003>> Acesso em: 16 out. 2017.

NCBI. **HPRT1 hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 [Gallus gallus (chicken)]**. 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/395653>> Acesso em: 16 out. 2017.

NCBI. **LEPR leptin receptor [Gallus gallus (chicken)]**. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/374223>> Acesso em: 18 out. 2017.

NCBI. **PRRX1 paired related homeobox 1 [Gallus gallus (chicken)]**. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/373941>> Acesso em: 18, out. 2017.

NCBI. **RPL30 ribosomal protein L30 [Gallus gallus (chicken)]**. 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/425416>> Acesso em: 08 out. 2017.

NCBI. **RPL4 ribosomal protein L4 [Gallus gallus (chicken)]**. 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/415551>> Acesso em: 16 out. 2017.

NCBI. **RPLP1 ribosomal protein lateral stalk subunit P1 [Gallus gallus (chicken)]**. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/396262>> Acesso em: 08 out. 2017.

NCBI. **TNFRSF11B TNF receptor superfamily member 11b [Gallus gallus (chicken)]**. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/378803>> Acesso em: 06 nov. 2017.

NCBI. **TNFSF11 tumor necrosis factor superfamily member 11 [Gallus gallus (chicken)]**. 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/428067>> Acesso em: 06 nov. 2017.

OLIVEIRA, M.C.S. et al. **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase**. São Carlos – São Paulo: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007. 43p.

ORDÓÑES, J.A. et al. **Tecnologia de Alimentos: Alimentos de origem animal**. Porto Alegre – RS: Artmed, v.2, 279 p. 2005.

PARRI, M. et al. Angiopoietin-like 7, a novel pro-angiogenic factor over-expressed in cancer. **Angiogenesis**, v.17, n.6, p.881-896. Out. 2014.

PAUL-PLETZER, K. et al. Identification of a dantrolene-binding sequence on the skeletal muscle ryanodine receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v.277, n.38, p.34918-34923. Jul. 2002.

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v.30, n.9, p.1-10. Mai. 2002.

PFAFFL, M.W.A. New mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v.29, n.9, p.2002-2007. Mai. 2001.

REGITANO, L.C.A.; VENERONI, G.B. Marcadores Moleculares e suas aplicações no Melhoramento Animal. In: SIMPÓSIO DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA À PRODUÇÃO ANIMAL, 2., 2009. São Carlos – SP. **Anais...** São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2009.

ROSSETTI, M.L.R. Célula e seus constituintes moleculares. In: ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. (Org.) **Biologia Molecular Básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2000. 336p.

RÜBENSAM, J.M. Transformações post mortem e qualidade da carne suína. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL VIRTUAL SOBRE QUALIDADE DE CARNE SUÍNA, 1, 2000. Concórdia – SC. **Anais...** Concórdia, 2000, p. 89-99.

SAMBROOK, J. E.; RUSSEL, D. W. Molecular cloning: **A laboratory manual**. 3. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v.11, 2.700p. 2002.

SAWADA, H., KONOMI, H. The  $\alpha 1$  Chain of Type VIII Collagen is Associated with Many but Not All Microfibrils of Elastic Fiber System. **Cell Structure and Function**, v.16, n.6, p.455-466. Dez. 1991.

SISTEMA OCEPAR. **Custos de produção de Frangos e Suínos no Paraná**. 2007. Disponível em: < <http://ambienteduran.eng.br/system/files/publicador/ANEXOS/CustoProducaoCarnesfinalSUINOS.pdf> > Acesso: 25 jul. 2017.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA. **Necrose asséptica da cabeça do fêmur**. 2013. Disponível em: <[http://amb.org.br/diretrizes/\\_DIRETRIZES/necrose\\_asseptica\\_da\\_cabeca\\_femoral\\_no\\_adulto/files/assets/common/downloads/publication.pdf](http://amb.org.br/diretrizes/_DIRETRIZES/necrose_asseptica_da_cabeca_femoral_no_adulto/files/assets/common/downloads/publication.pdf)> Acesso: 25 jul. 2017.

SOUZA, J.C.P.V.B et. al. **Sistemas de Produções de Leitões baseado em Planejamento, Gestão e Padrões Operacionais**. Concórdia, SC: Embrapa, 2013, 118p. Sistemas de Produção: 4.

THELLIN, O. et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.75, p.291-305. Out. 1999.

UNIPROT. **UniProtKB - P00356 (G3P\_CHICK) – GAPDH**. 2017. Disponível em: < <http://www.uniprot.org/uniprot/P00356> > Acesso em: 10 out. 2017.

UNIPROT. **UniProtKB - P21611 (B2MG\_CHICK) – B2M**. 2017. Disponível em: <<http://www.uniprot.org/uniprot/P21611#sequences>> Acesso em: 10 out. 2017.

UNIPROT. **UniProtKB - P36578 (RL4\_HUMAN) – RPL4**. 2017. Disponível em: <<http://www.uniprot.org/uniprot/P36578>> Acesso em: 16 out. 2017.

UNIPROT. **UniProtKB - Q9W719 (HPRT\_CHICK) – HPRT1**. 2017. Disponível em: <<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9W719>> Acesso em: 16 out. 2017.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. **Los cerdos merecen tratamiento de reyes**. 2009. Disponível em: <<http://agenciadenoticias.unal.edu.co/en/detalle/article/los-cerdos-merecen-tratamiento-de-reyes.html>> Acesso em: 07 nov. 2017.

XIAO, Y. et al. ANGPTL7 Regulates The Expansion And Repopulation Of Human Hematopoietic Stem And Progenitor Cells. **Haematologica: Journal of the European Hematology Association**, v.100, n.5, p.585-594. Mai. 2015.

YOUNG, B.B. et al. The roles of types XII and XIV collagen in fibrillogenesis and matrix assembly in the developing cornea. **Journal of cellular biochemistry**, v.87, n.2, p.208-220. Ago. 2002.

YOUNG, B.B.; GORDON, M.K.; BIRK, D.E. Expression of type XIV collagen in developing chicken tendons: association with assembly and growth of collagen fibrils. **Developmental Dynamics**, v.217, n.4, p.430-439. Abr. 2000.

ZHANG, F. et al. Genome-wide copy number variation study and gene expression analysis identify ABI3BP as a susceptibility gene for Kashin–Beck disease. **Human Genetics**, v.133, n.6, p.793-799. Jan. 2014.