

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
CAMPUS CURITIBANOS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

Laura Garbin Cappellaro

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO SUPERVISIONADO
NA UNIVERSIDADE DE MONTRÉAL, NA ÁREA DE MICROBIOLOGIA**

Curitibanos
2022

Laura Garbin Cappellaro

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO SUPERVISIONADO
NA UNIVERSIDADE DE MONTRÉAL, NA ÁREA DE MICROBIOLOGIA**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Medicina Veterinária do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Aline Félix Schneider Bedin.

Curitibanos

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Garbin Cappellaro, Laura
RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO
SUPERVISIONADO NA UNIVERSIDADE DE MONTRÉAL, NA ÁREA DE
MICROBIOLOGIA / Laura Garbin Cappellaro ; orientadora,
Aline Félix Schneider Bedin , 2022.
34 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus
Curitibanos, Graduação em Medicina Veterinária,
Curitibanos, 2022.

Inclui referências.

1. Medicina Veterinária. 2. Frango de Corte. 3.
Microbiota. 4. Probióticos. I. , Aline Félix Schneider
Bedin. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Graduação em Medicina Veterinária. III. Título.

Laura Garbin Cappellaro

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO SUPERVISIONADO
NA UNIVERSIDADE DE MONTRÉAL, NA ÁREA DE MICROBIOLOGIA**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Bacharel e aprovado em sua forma final pelo Curso de Medicina Veterinária

Curitiba, 24 de março de 2022.



Documento assinado digitalmente
Malcon Andrei Martinez Pereira
Data: 31/03/2022 15:06:09-0300
CPF: 691.481.550-04
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof^o. Dr. Malcon Andrei Martinez Pereira
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:



Documento assinado digitalmente
Aline Felix Schneider
Data: 31/03/2022 14:34:53-0300
CPF: 068.703.859-63
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof^a. Dr^a Aline Félix Schneider Bedin
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Dr^a Caroline Pissetti
Avaliadora
Centro de Diagnóstico de Sanidade Animal – CEDISA



Documento assinado digitalmente
Francieli Cordeiro Zimmermann
Data: 31/03/2022 15:07:03-0300
CPF: 044.193.079-43
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof^a. Dr^a Francieli Cordeiro Zimmermann
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Este trabalho é dedicado a todos aqueles que estiveram sempre ao meu lado durante esta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a vida, por simplesmente me permitir desfrutar de momentos tão maravilhosos e ter tido a oportunidade de dividi-los com pessoas tão especiais. Além disso, agradeço também pelos momentos ruins e difíceis, estes também foram essenciais para o meu desenvolvimento.

Agradeço aos meus pais, Celso Cappellaro e Eliane Garbin Cappellaro, por serem meus exemplos de dedicação, perseverança e amor.

Ao meu pai, agradeço por todos os conselhos e por todo auxílio ao longo da minha jornada. Segundo ele, a “sorte” depende das oportunidades aliadas com as competências de cada um. A minha “sorte”, posso dizer, então, que foi ter um pai que lutou muito para dar boas oportunidades aos filhos e lhes ensinou a importância de serem competentes para alcançarem os próprios sonhos.

À minha mãe, agradeço por todo carinho e dedicação. Mesmo de longe, ela sempre me protegeu e continua protegendo com muitas orações e inúmeras velas acesas para iluminar o meu caminho. Minha mãe é o meu exemplo de amor e de entrega.

Ao meu irmão, Gabriel Garbin Cappellaro, agradeço por sempre estar ao meu lado e por sempre aceitar fazer parte das minhas aventuras e “shows de teatro” quando criança. Estarei sempre aqui quando precisar.

A minha família, avós, tios e primos, agradeço por serem a minha base e por me ajudarem a construir o meu caráter e a pessoa que eu sou hoje.

Agradeço imensamente a minha família de alma que me acolheu quando fui para o Canadá. Meu pai adotivo, François Godbout, por todos os ensinamentos profissionais e pessoais. Minha mãe adotiva, Chantal Moffete, por todo carinho em cada detalhe para me receber em sua casa. Minha irmã adotiva, Celia Godbout, por me acolher e me mostrar as belezas de Montréal. Tenho certeza que, se anjos existem, vocês são os anjos que apareceram na minha vida.

Agradeço às minhas amigas e irmãs da UFSC, Ana Paula Teixeira, Ana Clara Teixeira, Bianca Agador, Laura Scaldaferrri, Letícia Post e Sylvia Farias por todos os momentos bons, pelas histórias e pela parceria. Graças a vocês, essa caminhada se tornou mais leve e divertida.

Aos meus amigos e irmãos de Curitiba, Gabriel Santos, Hyago Chaher, Jéssica Casali, Matheus Gatner, Rafaela Scheffer e Vinícius Neves, agradeço por entrarem na minha

vida e por me mostrarem que amizade verdadeira não precisa de muito tempo para ser construída.

À minha amizade de mais de 15 anos, Heloisa Pellegrini, agradeço por estar sempre do meu lado, mesmo com a distância e com as direções tão diferentes que tomamos.

Ao meu namorado, Rafael Francesco, obrigada por todo o carinho e por ser meu porto seguro. Obrigada também por estar do meu lado nos momentos mais difíceis e por sempre acreditar em mim e me motivar.

A minha orientadora, Professora Aline Schneider Bedin, por ter me guiado e ser meu exemplo de mulher e profissional. Agradeço por todos os conselhos que me ajudaram tanto em decisões importantes na minha vida.

Ao meu Professor orientador do estágio, Marcio Costa, por confiar em mim e me proporcionar uma das melhores experiências profissionais da minha vida.

Aos meus amigos do Canadá e do estágio, Aissan Souidi, Esdras Corrêa, Julia Arantes, Jean Ramos, Karine Lamarre, Laura Franco, Laura Guerrero, Lila Maduro, Marêva Bleuzé, Pedro Henrique Rocha, Ryota Watanabe, Sabrine Marangoni e Vitória Régia Campelo, por desde o primeiro momento, me acolherem e nunca deixarem eu me sentir sozinha.

Agradeço a instituição MITACS por me proporcionar condições de realizar o meu estágio final em uma instituição de ensino de excelência.

E por fim, agradeço a UFSC, pela oportunidade de estudar em um ensino público também de excelência e com profissionais extremamente capacitados que proporcionaram a realização do meu sonho de ser Médica Veterinária.

Quem acredita sempre alcança.

Renato Russo

RESUMO

O estágio curricular obrigatório em Medicina Veterinária foi realizado na Universidade de Montréal, campus de Saint-Hyacinthe, localizado na província de Québec, no Canadá. Através da premiação da bolsa MITACS e co-financiamento da Universidade Canadense, o estágio foi remunerado e as atividades foram realizadas durante o período de 18 de outubro de 2021 até 04 de fevereiro de 2022. O estágio baseou-se em um projeto de desenvolvimento de um probiótico para frangos de corte, supervisionado pelo Professor Assistente da Universidade de Montréal, Dr. Marcio Costa. O objetivo do estágio era auxiliar em uma das etapas do projeto e contribuir com o desenvolvimento do produto. Esta etapa do projeto consistia em realizar a seleção e sequenciamento genético de bactérias de amostras colhidas do ceco de galinhas criadas de forma orgânica, ou seja, aves com biodiversidade da microbiota. A intenção era selecionar 30 bactérias com potencial probiótico. Com base nessa seleção, seria possível seguir para a próxima etapa do projeto. Desta forma, esse relatório tem como objetivo descrever as atividades desenvolvidas ao longo do estágio, bem como descrever a estrutura, rotina e os outros projetos em andamento na universidade. O estágio possibilitou grande crescimento e aprendizagem ao longo do processo, além da possibilidade de ter acesso a uma nova cultura e desenvolvimento da comunicação em outras línguas.

Palavras-chave: Frango de Corte. Microbiota. Probióticos.

ABSTRACT

The obligatory curricular internship in Veterinary Medicine was carried out at the University of Montréal, Saint-Hyacinthe campus, located in the province of Quebec, Canada. Through the award of the MITACS scholarship and co-financing from the Canadian University, the internship was remunerated and the activities were carried out during the period from October 18, 2021 to February 04, 2022. The internship was based on a project to develop a probiotic for broilers, supervised by the Assistant Professor at the University of Montréal, Dr. Marcio Costa. The objective of the internship was to assist a part of the project and contribute to the development of the product. This part of the project consisted in carrying out the selection and genetic sequencing of bacteria from samples collected from the cecum of organic chickens with better biodiversity of the microbiota. The intention was to select 30 bacteria with probiotic potential. Based on this selection, it would be possible to proceed to the next stage of the project. In this way, this report aims to describe the activities developed during the internship, as well as to describe the structure, routine and other projects at the university. The internship allowed great growth and learning throughout the process, in addition to the possibility of having access to a new culture and development of communication in other languages.

Keywords: Broilers. Microbiota. Probiotics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Universidade de Montréal, campus Saint-Hyacinthe, pavilhão principal.	19
Figura 2- Planta da Faculdade de Medicina Veterinária, em Saint-Hyacinthe.	20
Figura 3 - Câmara Anaeróbica (BactronEz).....	21
Figura 4 - Laboratório 1441, supervisionado pelo Professor Dr. Marcio Costa, lateral esquerda (A) e lateral direita (B).	21
Figura 5 - Análise de coordenadas principais demonstrando a semelhança da microbiota cecal de galinhas, em comparação com a microbiota do cecal de aves de criação comercial adultas, que receberam a solução por gavagem no primeiro dia de vida.....	23
Figura 6 - Aparelho <i>Nanodrop</i>	25
Figura 7 - Termociclador convencional de PCR.....	27
Figura 8 - Equipamento para realizar a Eletroforese em Gel.	28
Figura 9 - Exemplo de resultado da Técnica de Eletroforese em Gel.	29

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1- Resultados da quantificação de DNA pelo Nanodrop.....	25
Tabela 2 - Composição dos tubos <i>ependorfs</i> de 200 μ L para o PCR.....	26
Tabela 3 - Protocolo de ciclos utilizado no PCR.....	30
Tabela 4- Resultados do sequenciamento Sanger acima de 99%.....	30
Quadro 1- Primers utilizados para o PCR e posteriormente sequenciamento.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAL - bactérias do ácido láctico

FMV – Faculdade de Medicina Veterinária

IRIC - *Institute for Research in Immunology and Cancer*

PIB – Produto Interno Bruto

P&D - Pesquisa e desenvolvimento

UdeM – Universidade de Montréal

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS	15
1.1.1	Objetivo Geral.....	15
1.1.2	Objetivos Específicos.....	16
2	A AVICULTURA NO BRASIL E CANADÁ	17
3	BOLSA MITACS.....	18
4	UNIVERSIDADE DE MONTRÉAL	19
4.1	LOCALIZAÇÃO E ESTRUTURA.....	19
4.2	ATIVIDADES REALIZADAS NO LABORATÓRIO.....	22
4.2.1	Cultura Bacteriana	24
4.2.2	Extração e quantificação de DNA	24
4.2.3	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	26
4.2.4	Eletroforese em gel	27
4.2.5	Purificação do DNA.....	29
5	RESULTADOS	30
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32
	REFERÊNCIAS.....	33

1 INTRODUÇÃO

O estágio curricular obrigatório constitui um momento importante na formação do médico veterinário, cujo conhecimento adquirido na graduação é colocado em prática. O estágio foi realizado na Universidade de Montréal (UdeM), na província do Québec, no Canadá. O período do estágio foi de 650 horas/aula entre o dia 18 de outubro de 2021 até o dia 04 de fevereiro de 2022, sendo voltado para a área de avicultura, associada a microbiologia e a pesquisa.

A província de Québec é uma das líderes do Canadá na criação de aves e suínos destinados ao abastecimento interno. Além disso, o Canadá possui excelentes universidades, grande incentivo à pesquisa, inovações industriais e ótimas oportunidades de treinamento na graduação (MITACS, 2022). Ao realizar um estágio internacional, além da experiência profissional na área, é possível desenvolver outras habilidades como a comunicação em uma nova língua e os desafios de uma nova cultura.

No Brasil, a avicultura representa um dos principais pilares nas exportações do país e hoje o Brasil é o maior exportador de carne de frango do mundo (ABPA, 2021). A avicultura brasileira possui caráter industrial, impulsionada por constantes aumentos de produção (TAVARES; RIBEIRO, 2007). Desta forma, a pesquisa voltada para esta área e profissionais capacitados são cada vez mais necessários para o mercado brasileiro.

Para realização do estágio, uma bolsa de CAD \$6.000 foi enviada pelo programa MITACS *Globalink Research Internship*. A instituição MITACS premia alunos internacionais de graduação selecionados de acordo com o projeto apresentado em parceria com uma universidade canadense.

Este relatório tem como objetivo descrever as atividades desenvolvidas ao longo do período de estágio curricular obrigatório, bem como o funcionamento da Universidade de Montréal e conhecimentos adquiridos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Complementar os conhecimentos teóricos e práticos obtidos durante a graduação, principalmente na área da avicultura vinculada a pesquisa. Além da possibilidade de

desenvolvimento profissional e pessoal associado à experiência de realizar o estágio internacional.

1.1.2 Objetivos Específicos

Contribuir com parte de um projeto de doutorado no desenvolvimento de um novo probiótico eficiente para frangos de corte contra *Clostridium perfringens*;

Aprender novas técnicas moleculares, como seleção e cultura de bactérias, extração e quantificação de DNA, PCR, técnica de eletroforese em gel, sequenciamento genético, teste de antagonismo e várias outras técnicas associadas a seleção bacteriana;

Estudar a microbiota de frangos de corte para o desenvolvimento de um novo produto.

2 A AVICULTURA NO BRASIL E CANADÁ

A Faculdade de Medicina Veterinária (FMV) da UdeM está localizada na principal zona agroalimentar de Quebec (UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL, 2022). A província de Ontário e Québec, tornaram-se, sobretudo, líderes da produção leiteira e da criação de aves e suínos destinados ao abastecimento interno (ALMEIDA, 2003). Em 2017, a produção agrícola e o processamento agroalimentar no Québec geraram quase 223.000 empregos em tempo integral (empregos diretos, indiretos e induzidos), ou seja, pelo menos 5,3% dos empregos na província. Esses setores também geraram US \$21,8 bilhões do PIB (direto, indireto e induzido), representando 5,3% do Produto Interno Bruto (PIB) do Quebec (MAPAQ, 2019).

Apesar do Canadá não ser um dos maiores produtores ou exportadores da carne de frango ou de ovos do mundo, há muitos investimentos para um crescimento destas áreas voltadas à tecnologia e qualidade. O foco do país relaciona-se muito a redução do uso de antibióticos, a produção de aves orgânicas, produção com sustentabilidade e redução de impactos ambientais (COOP CARBONE, 2020). No Canadá, a mecanização tem sido muito importante no crescimento da produção (DOWNING, 1962).

No Brasil, a avicultura representa um dos principais pilares nas exportações do país, sendo a exportação de 4.231 milhões de toneladas no ano de 2020. Atualmente, o Brasil é o maior exportador de carne de frango do mundo e o segundo maior produtor. A produção de carne de frango no ano de 2020 alcançou a marca histórica de 13.845 milhões de toneladas (ABPA, 2021). A avicultura no Brasil tem maior desenvolvimento produtivo devido a fatores como melhoramento genético, introdução de novas tecnologias, utilização de instalações mais adequadas, alimentação racional e parceria entre produtor e agroindústria, por meio do sistema de integração. A avicultura possui caráter industrial, impulsionada por constantes aumentos de produção (TAVARES; RIBEIRO, 2007).

Com isso, ambos os países podem se beneficiar de parcerias e desenvolvimento em conjunto nesta área da produção avícola. O Canadá com grandes investimentos em pesquisa e desenvolvimento e o Brasil sendo referência mundial na produção de frangos.

3 BOLSA MITACS

O estágio no Canadá foi possível devido a contribuição da instituição MITACS. Dentre os programas da instituição há um programa denominado *Globalink Research Internship*, que é uma iniciativa competitiva para alunos internacionais de graduação de determinados países e regiões da Austrália, Brasil, China, Colômbia, França, Alemanha, Hong Kong, Índia, México, Paquistão, Taiwan, Tunísia, Ucrânia, Reino Unido e Estados Unidos Estados (MITACS, 2022).

Sob a supervisão conjunta de um professor local e anfitrião, alunos de graduação e pós-graduação bem-sucedidos, recebem um prêmio de pesquisa total de CAD \$6.000 para conduzir um projeto de 12 a 24 semanas no Canadá (MITACS, 2022). Este valor é utilizado pelo aluno para despesas pessoais e custos relacionados ao intercâmbio. A aplicação para a bolsa foi realizada em janeiro de 2021 e o resultado da aprovação foi em março do mesmo ano. É possível usufruir da bolsa até 12 meses depois da premiação, desta forma, o estágio foi realizado a partir de outubro de 2021.

A MITACS é uma organização canadense sem fins lucrativos que projeta e fornece programas de pesquisa e treinamento no Canadá há 20 anos. Há trabalhos com 70 universidades, 6.000 empresas, governos federais e provinciais. O intuito é construir parcerias que apoiam a inovação industrial e social no Canadá. Desde 2007 a MITACS está aberta para todas as disciplinas e se expandiu em resposta às necessidades industriais e universitárias, incluindo programas em gestão de P&D, desenvolvimento de habilidades profissionais e treinamento em pesquisa internacional. A MITACS visa apoiar a inovação baseada em pesquisa e trabalhar em colaboração com seus parceiros na indústria, academia e governo (MITACS, 2022).

4 UNIVERSIDADE DE MONTRÉAL

4.1 LOCALIZAÇÃO E ESTRUTURA

O estágio curricular obrigatório foi realizado na Universidade de Montréal, situada na província de Québec, no Canadá, sendo esta considerada a única província francesa do país. O campus da Medicina Veterinária encontra-se na cidade de Saint-Hyacinthe (Figura 1), a cidade possui uma população de aproximadamente 50.000 habitantes e localiza-se há 51 km da cidade metropolitana de Montréal (STATISTIC CANADA, 2016).

Figura 1. Universidade de Montréal, campus Saint-Hyacinthe, pavilhão principal.



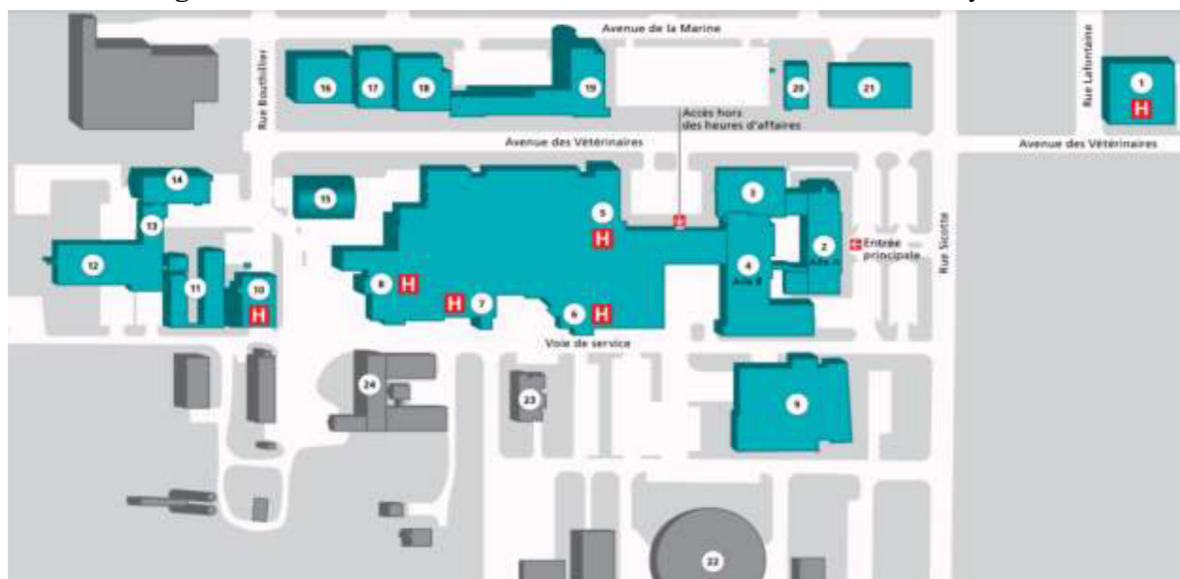
Fonte: Autor, 2022.

A Universidade de Montréal é francófona, todavia a língua inglesa também é aceita e frequentemente utilizada, principalmente entre alunos internacionais e na pós-graduação. A Universidade é considerada o principal centro de ensino superior do Québec e ocupa a quarta posição no Canadá em número de atividades e pesquisas. Além disso, é considerada a 88ª melhor universidade do mundo de acordo com a classificação *Times Higher Education* (UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL, 2022).

O curso de Medicina Veterinária é o único curso da Universidade de Montréal na cidade de Saint-Hyacinthe. A estrutura da faculdade possui vários pavilhões, sendo cada um deles designado a diferentes áreas do curso (Figura 2). A maior parte do estágio foi realizada no Pavilhão da Anatomia, no setor de Biomedicina Veterinária, onde encontra-se o laboratório 1441, supervisionado pelo Professor Dr. Marcio Costa. Outra pequena parte do estágio foi realizada no Centro de Pesquisa Avícola, local onde encontram-se os animais para desenvolvimento de pesquisa. Durante o período do estágio a fase de teste *in vivo* ainda não estava sendo realizada, desta forma o estágio concentrou-se mais na área laboratorial.

No Centro de Pesquisa Avícola foi realizado apenas um curso teórico-prático denominado Formação em Experimentação Animal. Este curso é ministrado pela Universidade de Montréal, com o objetivo de habilitar os alunos e professores a realizarem experimentos utilizando animais. Para receber o certificado é necessário realizar duas provas teóricas e também realizar um pequeno curso prático, com o objetivo de apresentar as instalações e equipamentos disponíveis no local.

Figura 2. Planta da Faculdade de Medicina Veterinária, em Saint-Hyacinthe.



- | | | |
|-------------------------------------|---|---|
| 1. Clínica Ambulatorial | 9. Complexo de vigilância epidemiológica | 17. Pavilhão 1600 (área de pesquisa) |
| 2. Pavilhão principal (parte A) | 10. Clínica de Aves Silvestres | 18. Pavilhão 1550 (área de pesquisa) |
| 3. Pavilhão da Anatomia | 11. Petshop | 19. Biblioteca |
| 4. Pavilhão principal (parte B) | 12. Complexo de pesquisa do meio ambiente | 20. Pavilhão 1500 (área de pesquisa) |
| 5. Hospital de Animais de Companhia | 13. Fazenda | 21. Café dos Estudantes |
| 6. Hospital de animais de Fazenda | 14. Centro de Pesquisa Avícola | 22. Instituto de tecnologia Agroalimentar do Quebec |
| 7. Hospital de Equinos (entrada 1) | 15. Arena Equina | 23. Instituto de epidemiologia do Quebec |
| 8. Hospital de Equinos (entrada 2) | 16. Pavilhão 1650 (área de pesquisa) | 24. Fazenda Maskita |

No laboratório 1441, supervisionado pelo Dr. Marcio Costa, são realizados estudos voltados para a área de microbiota. Desta forma, para que seja possível simular um ambiente intestinal, o laboratório é equipado com uma câmara anaeróbica BactronEz (Figura 3), a qual possibilita cultivar bactérias fastidiosas que permaneceram desconhecidas até recentemente. A câmara anaeróbica era de fácil manuseio, os alunos recebiam um breve treinamento para realizar a manipulação.

Figura 3. Câmara Anaeróbica (BactronEz).



Fonte: Autor, 2022.

Este laboratório também conta com capela de fluxo contínuo, incubadora convencional, freezers, termocicladores, centrífugas e demais equipamentos necessários à pesquisa (Figura 4).

Figura 4. Laboratório 1441, supervisionado pelo Professor Dr. Marcio Costa, lateral esquerda (A) e lateral direita (B).



Fonte: Autor, 2022.

4.2 ATIVIDADES REALIZADAS NO LABORATÓRIO

Durante a semana eram realizadas reuniões semanais, em inglês, com o grupo de pesquisa. O intuito era discutir a respeito do andamento dos projetos de cada aluno. O estagiário poderia contribuir com diferentes projetos, porém com a responsabilidade de dedicar-se ao projeto ao qual foi designado. O supervisor de estágio, Dr. Costa, proporcionava aos alunos bastante liberdade em relação a carga horária de acordo com a necessidade e do andamento da pesquisa. Além disso, de acordo com o projeto, também era possível adquirir novos materiais em caso da falta dos mesmos no laboratório.

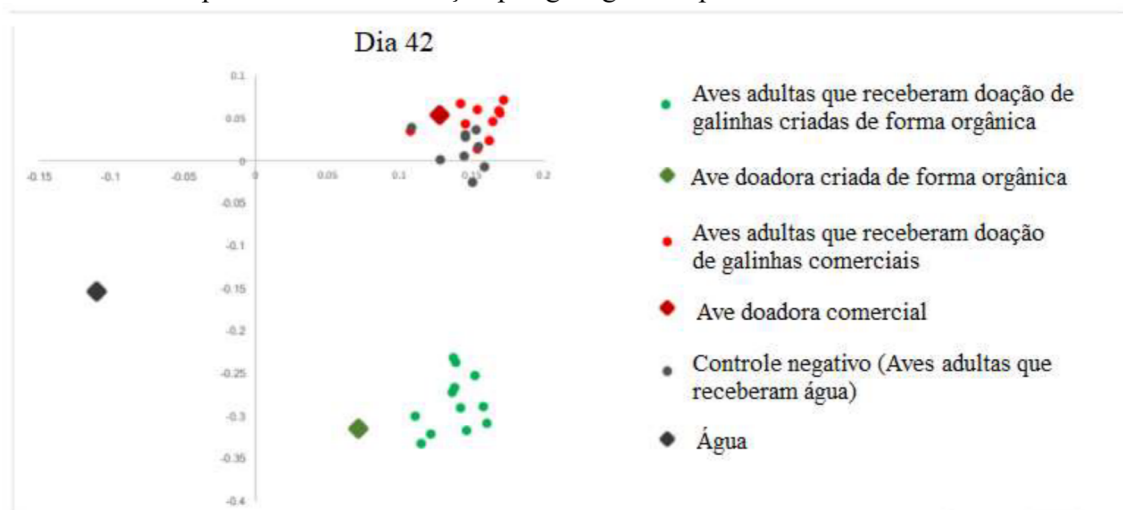
As aulas de nutrição equina, suína e de aves, que eram ministradas pelo Dr. Costa, também podiam ser assistidas. Toda a primeira semana do mês realizavam-se apresentações dos estudantes de pós-graduação do departamento de biomedicina veterinária. Os seminários eram relacionados a artigos, publicados recentes, de acordo com o tema do projeto de cada aluno.

O projeto proposto para a MITACS foi um projeto de doutorado em andamento da aluna Laura Franco, voltado para a área de microbiota avícola, baseado na pesquisa e seleção de bactérias para o desenvolvimento de um super probiótico para frangos de corte. O objetivo é produzir um novo produto, ainda não disponível no mercado veterinário, com uma grande variedade de bactérias benéficas ao trato gastrointestinal da ave para melhorar a microbiota intestinal e o sistema imunológico frente aos patógenos entéricos.

Neste período de estágio o objetivo foi identificar espécies bacterianas relacionadas à saúde intestinal (maior desempenho e resistência a doenças). Estudos anteriores no projeto da referida doutoranda, demonstraram que as bactérias presentes na microbiota de galinhas criadas de forma orgânicas (linhagem Lohmann), de 85 semanas de idade, tinham a capacidade de colonizar a microbiota de pintos de um dia. Nos estudo preliminar observou-se que galinhas criadas organicamente tinham 60% mais diversidade de bactérias em comparação com frangos criados convencionalmente, e que os pintos inoculados com essas bactérias por gavagem na eclosão permaneceram com elas até o momento do abate (dados não publicados).

Na pesquisa, foi realizada a eutanásia e necrópsia de uma galinha criada de forma orgânica. Para a colonização, o ceco, juntamente com seu conteúdo, foi coletado e colocado em solução PBS. No mesmo dia, os pintos de um dia receberam essa solução. Após 42 dias eles foram eutanasiados e a microbiota dos mesmos foi avaliada (Figura 5).

Figura 5. Análise de coordenadas principais demonstrando a semelhança da microbiota cecal de galinhas, em comparação com a microbiota do cecal de aves de criação comercial adultas, que receberam a solução por gavagem no primeiro dia de vida.



Fonte: dados não publicados.

É possível observar nesta análise que, após 42 dias de vida, a microbiota dos animais que receberam a solução por gavagem (representados por pontos) se assemelha a microbiota dos seus respectivos doadores (representados por losangos). As aves que receberam a solução proveniente da microbiota das galinhas criadas de forma orgânica, representadas pela cor verde, apresentaram a microbiota semelhante ao seu doador, o mesmo ocorre para as aves que receberam a solução proveniente de galinhas criadas de forma convencional, representadas pela cor vermelha.

O grupo controle recebeu apenas água e após 42 dias apresentou a microbiota semelhante à das aves criadas de forma convencional, sugerindo que o ambiente, a dieta e a genética estão direcionando a composição bacteriana nesses grupos.

Após esta análise, o objetivo principal foi cultivar e identificar as bactérias presentes na microbiota das galinhas orgânicas, usando condições anaeróbias específicas e sequenciamento genético. A hipótese é de que, meios de cultura específicos contendo substâncias necessárias para o crescimento de bactérias exigentes permitirão o isolamento destas espécies benéficas previamente observadas no primeiro estudo. Estas bactérias isoladas serão utilizadas futuramente para o desenvolvimento um novo produto (probiótico de nova geração), para melhorar a saúde intestinal de frangos de corte.

Para atingir o objetivo e selecionar as bactérias de interesse várias técnicas laboratoriais foram utilizadas, dentre elas: cultura bacteriana, extração e quantificação de DNA,

PCR, técnica de eletroforese em gel, purificação e sequenciamento genético. Todas essas técnicas eram realizadas frequentemente na rotina do laboratório.

4.2.1 Cultura bacteriana

Estima-se que apenas 5-20% das espécies bacterianas são cultiváveis. A maior parte do conhecimento atual tem origem em estudos baseados em cultura. A cultura é muito utilizada hoje em dia, por exemplo, para a determinação da resistência a antibióticos e para a detecção de organismos presentes em baixa abundância (por exemplo, *Clostridium difficile*) usando meios de crescimento seletivos (COSTA; WEESE, 2019).

Foi realizada a coleta do ceco de uma galinha criada de forma orgânica, proveniente do mesmo produtor utilizado no primeiro estudo, visando o isolamento de bactérias anaeróbicas e com potencial probiótico. A ave foi eutanasiada e o ceco, juntamente com o seu conteúdo, foi colocado em caldo BHI, como meio de cultivo para enriquecimento e também com o auxílio de alguns antibióticos para inibir o crescimento de bactérias indesejadas, como por exemplo a *Escherichia coli*. Após o período de incubação foram realizadas diluições seriadas até a concentração de 10^{-6} e utilizou-se meios de cultivo seletivos e não seletivos para cultivar as bactérias nas diferentes concentrações. Os ágaros utilizados foram: Agar Columbia CNA, Agar Sangue, Agar Brucella, Agar Mac Conkey, XLT-4 (para isolamento de *Salmonella spp.*), Agar TSA, Agar BHI e Agar CN (para *Pseudomonas sp.*).

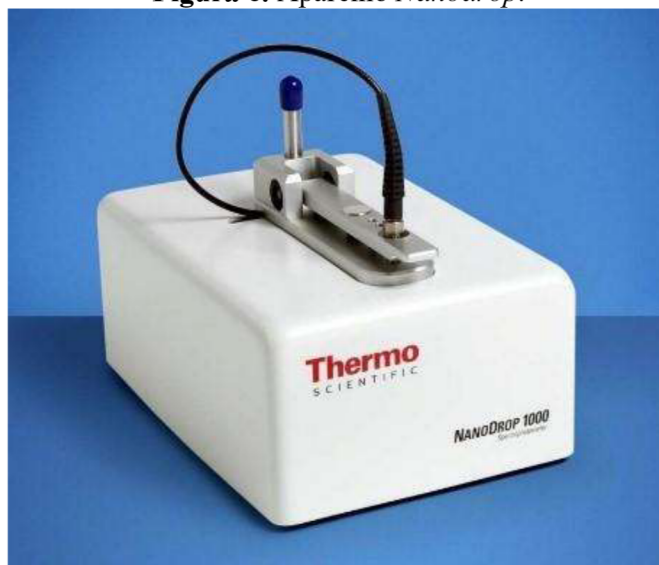
4.2.2 Extração e quantificação de DNA

Após a cultura dos microrganismos, o objetivo foi preparar amostras para identificação taxonômica a nível de espécie, pelo sequenciamento. Para isso, existem várias formas e kits de extração de DNA. O protocolo utilizado no projeto foi de acordo com as recomendações do Kit MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification (LUCIGEN CORPORATION, 2022), seguindo as instruções para extração de amostra celular. Utilizou-se este protocolo para extrair o DNA das bactérias coletadas e isoladas a partir da cultura das bactérias cecais.

Para a quantificação de DNA utilizou-se o NanoDrop (Figura 6). Este equipamento é um espectrofotômetro que quantifica ácidos nucleicos sem a necessidade de realizar diluições. Funciona combinando tecnologia de fibra óptica e propriedades naturais de tensão superficial

para capturar e reter pequenas quantidades de amostra (2 μ L) (DESJARDINS; CONKLIN, 2010).

Figura 6. Aparelho *Nanodrop*.



Fonte: Thermo Scientific, 2022.

Todos os resultados obtidos pela quantificação de DNA, que foram superiores a 500 μ g/ μ l (Tabela 1), precisaram ser ajustados e realizou-se diluições adequadas para a reação de PCR (50-100 μ g/ μ l).

Tabela 1. Resultados da quantificação de DNA pelo Nanodrop.

Amostra	ng/ μ l	Amostra	ng/ μ l	Amostra	ng/ μ l	Amostra	ng/ μ l
1	1.081,79	10	1.459,40	19	2.998,17	28	1.650,39
2	1.767,41	11	1.542,15	20	1.965,08	29	1.880,69
3	2.756,23	12	1.814,16	21	1.760,72	30	2.016,39
4	4.032,13	13	2.832,64	22	735,76	31	3.094,71
5	1.844,04	14	2.163,75	23	762,9	32	3.651,79
6	2.631,02	15	3.187,89	24	1.724,68	33	2.061,29
7	1.165,69	16	3.423,28	25	84,16	34	1.239,62
8	1.175,41	17	3.776,84	26	18,32	35	1.073,89
9	1.303,69	18	2.340,76	27	0	36	1.701,21

Fonte: Autor, 2022.

4.2.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase, ou PCR, é uma técnica para fazer cópias de uma região específica do DNA, *in vitro*. Na PCR, a reação é repetida ciclicamente através de uma série de alterações de temperatura, o que possibilita a produção de muitas cópias da região de interesse. A PCR tem muitas aplicações práticas e em pesquisa. Ela é rotineiramente usada em clonagens de DNA, diagnósticos e análises de DNA.

No projeto realizado o objetivo era amplificar o gene 16S rRNA. A amplificação de genes que codificam o rRNA 16S por reação em cadeia da polimerase (PCR) e o seu subsequente sequenciamento consistem em uma ferramenta importante na caracterização de comunidades microbianas presentes em várias amostras ambientais. O gene 16S rRNA codifica para a subunidade ribossômica menor que é parte do sítio de ocorrência da síntese protéica e, portanto, está presente em todas as bactérias. (PETECOF *et al.*, 2015). Para isso, foram utilizados *primers* específicos para essa região (Quadro 1).

Para realizar a PCR, foi utilizado KAPA Taq PCR Kit with dNTPs (Thermo Fisher), sendo primeiramente é preparado o master mix, que é uma mistura que contém precursores e a Taq polimerase para realização da técnica.

Depois da preparação do master mix, preparou-se juntamente com a amostra e água molecular, os microtubos de 200 μ L para serem submetidos ao PCR (Tabela 2).

Quadro 1. *Primers* utilizados para o PCR e posteriormente sequenciamento.

Primer_F	ID	Primer_R	ID	Bandas
CAGACTCCTACGGGGAGGCAGCAGT	FP	ACTTAACCCAACATCTCACGACAC	RP	700pb
AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	27F	GGCGTGGACTTCCAGGGTATCT	801R	700pb

Fonte: Autor, 2022.

Tabela 2. Composição dos microtubos de 200 μ L para o PCR.

Componentes	Quantidade (μ L)
Master Mix	5,1
Amostra com DNA extraído	3
Água livre de DNase e RNase	16,9

Fonte: Autor, 2022.

Após as amostras serem colocadas no equipamento (Figura 7), para que o PCR ocorra, são necessários diferentes ciclos (Tabela 3). No primeiro ciclo ocorre o processo de desnaturação, onde a dupla fita é aberta (desnaturada), tornando-se uma fita única. No ciclo de anelamento, ou hibridação, um par de iniciadores ou primers (uma fita de DNA específica para o gene que se quer estudar) complementam a fita oposta da sequência de DNA a ser amplificada. O último ciclo é o de extensão, onde com o molde já identificado, a enzima DNA-polimerase adiciona as bases complementares, formando uma nova fita e então tem-se novamente a duplicação da fita de DNA (NASCIMENTO; SUAREZ; PINHAL, 2015).

Figura 7. Termociclador convencional de PCR.



Fonte: Autor, 2022.

Tabela 3. Protocolo de ciclos utilizado no PCR.

Etapas	Temperatura	Duração	Ciclos
Início da desnaturação	94 °C	3min	1
Desnaturação	95 °C	45 seg	27
Hibridação	53 °C	1 min	27
Extensão	72 °C	90 seg	27
Final da Extensão	72 °C	10 min	1
Final	10 °C	-	1

Fonte: Autor, 2022.

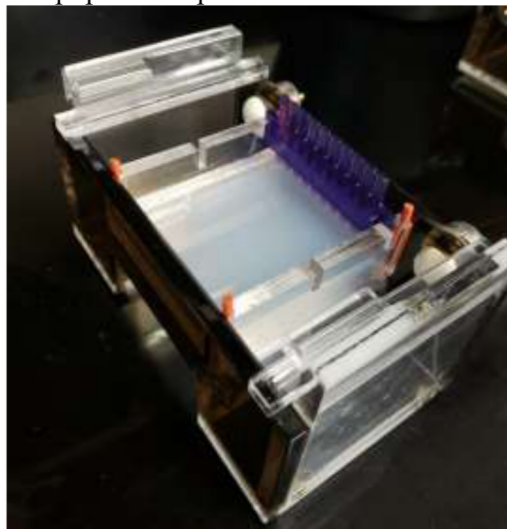
4.2.4 Eletroforese em gel

A impressão digital molecular, neste caso a eletroforese em gel, gera padrões de bandas de DNA diretamente de uma amostra ou de amplificação por PCR de um gene

conservado (por exemplo, gene 16S rRNA) para comparar padrões de bandas entre amostras. Os métodos de impressão digital mais utilizados são a desnaturação e a eletroforese em gel de gradiente de temperatura e a eletroforese terminal (COSTA; WEESE, 2019).

Para realizar a eletroforese em gel de agarose, as amostras de DNA são carregadas nos poços (cavidades) localizados numa das extremidades de um gel, e uma corrente elétrica é aplicada para fazê-las avançar pelo gel (Figura 8) (PETECOF *et al.*, 2015).

Figura 8. Equipamento para realizar a Eletroforese em Gel.



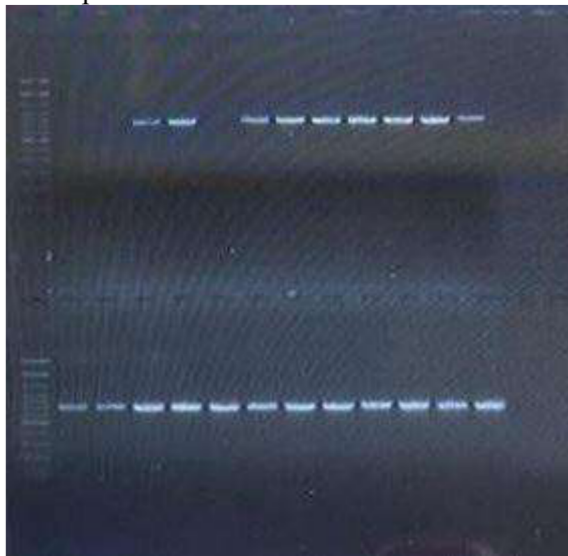
Fonte: Autor, 2022.

Desta forma, os fragmentos DNA estão carregados negativamente, então movem-se na direção do eletrodo positivo. Já que todos os fragmentos de DNA têm a mesma quantidade de carga por massa, os fragmentos menores atravessam o gel mais rapidamente do que os maiores. Ao adicionar brometo, o gel é pigmentado e o mesmo se liga ao DNA, que permite visualizar o DNA sob luz ultravioleta e este é visto como bandas, cada uma representando um grupo de fragmentos de DNA de mesmo tamanho (PETECOF *et al.*, 2015).

Neste caso, a intenção de realizar a técnica de eletroforese em gel era com o intuito de confirmar se o processo do PCR havia ocorrido corretamente. Desta forma, foi possível visualizar as amostras que possuíam o mesmo padrão de bandas (Figura 9).

Quase todas as amostras apresentaram a banda corretamente. Aquelas que não apresentaram bandas não passaram pelo processo de purificação e também não foram encaminhadas para o sequenciamento genético.

Figura 9. Exemplo de resultado da técnica de Eletroforese em Gel.



Fonte: Autor, 2022.

4.2.5 Purificação do DNA

Para realizar o sequenciamento é necessário, primeiramente, purificar o DNA. Para realizar a purificação utilizou-se o protocolo descrito ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup (ThermoFisher Scientific). A purificação é utilizada para realizar a limpeza enzimática do produto de PCR amplificado, este processo hidrolisa o excesso de primers e nucleotídeos em uma única etapa.

Para o sequenciamento de Sanger foram encaminhadas 34 amostras e transportadas de acordo com os requerimentos do laboratório.

5 RESULTADOS

Depois de todos os processos realizados, foram enviadas 34 amostras para o sequenciamento Sanger no *Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC)* da Universidade de Montréal. O resultado do sequenciamento de cada amostra foi recebido, analisada a qualidade dos sequenciamentos comparando através do BLAST, disponível na plataforma da National Center for Biotechnology Information (NCBI). Apenas os resultados acima de 99% foram considerados (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados do sequenciamento Sanger acima de 99%.

Nome Científico	% Identificada
<i>Ligilactobacillus salivarius</i>	99,22%
<i>Enterococcus hirae</i>	99,61%
<i>Shigella boydii</i>	99.16%
<i>Ligilactobacillus salivarius</i>	99.85%
<i>Escherichia fergusonii</i>	99.24%
<i>Shigella sonnei</i>	99.24%
<i>Enterococcus hirae</i>	99.85%
<i>Shigella sonnei</i>	99.05%
<i>Enterococcus hirae</i>	99.74%
<i>Enterococcus hirae</i>	99.21%

Fonte: Autor, 2022.

A plataforma apresentou apenas 10 amostras com resultado acima de 99% de precisão, como resultado as seguintes bactérias: *Ligilactobacillus salivarius*, *Enterococcus hirae*, *Shigella boydii*, *Escherichia fergusonii* e *Shigella sonnei*. A mesma bactéria apresentou-se igual mesmo em amostras diferentes, ou seja, apenas cinco espécies foram identificadas no processo de sequenciamento de 34 amostras.

O grupo de bactérias abundantes presente no ceco de frangos de corte são do filo *Firmicutes*, *Bacteroides*, *Proteobactéria* e *Actinobacteria* (OALEY *et al.*, 2014). As cinco bactérias previamente sequenciadas e selecionadas compreendem naturalmente a microbiota do ceco de galinhas.

A maioria dos microrganismos probióticos são bactérias produtoras de ácido lático (BAL), Gram-positivas, geralmente catalase-negativas, não esporulantes, anaeróbios estritos ou

de crescimento facultativo. Os probióticos incluem espécies BAL dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Weissella* e outros (ALVIM, 2015).

Das bactérias selecionadas, duas compreendem o grupo BAL (*Ligilactobacillus salivarius* e *Enterococcus hirae*), porém não necessariamente essas bactérias que constituem esse grupo, apresentam um potencial probiótico.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sabe-se que nem todas as bactérias selecionadas possuem um aspecto probiótico como descrito na literatura, todavia, sugere-se que as bactérias previamente selecionadas devem passar por uma análise e verificação para avaliar se as mesmas são capazes de inibir o crescimento e a proliferação de bactérias patogênicas.

Além disso, novos métodos de coleta e meios seletivos devem ser verificados, para que nas próximas análises e sequenciamento genético seja possível obter uma maior variedade de espécies bacterianas.

Atualmente, sabe-se que a imunidade e a digestibilidade estão diretamente ligadas à microbiota do trato gastrointestinal, existem muitos estudos relatando o aumento no desempenho e bem-estar de animais com uma microbiota desenvolvida e saudável. Desta forma, o objetivo de desenvolvimento de um super probiótico eficiente é de extrema importância para qualidade da produção avícola.

A pesquisa proporciona desenvolver novos métodos de análises e conseqüentemente melhorar projetos para se atingir o objetivo desejado. A pesquisa alinhada com as necessidades da agroindústria proporciona crescimento econômico e qualidade de desenvolvimento. Desta forma, o estágio curricular obrigatório na área de avicultura associado a microbiologia e a pesquisa gerou muito conhecimento.

Acrescentando a experiência do estágio curricular obrigatório, ao realizar um estágio internacional, além da experiência profissional na área e desenvolvimento em uma Universidade Internacional, foi possível desenvolver outras habilidades como a comunicação em uma nova língua e os desafios de uma nova cultura.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, Maria Geralda de. Espaço rural em mutação no Québec. **Boletim goiano de geografia**. v. 23, n. 2, p 219 – 241. 2003.

ALVIM, Luige Biciati. Segurança e efeito probiótico de *Weissella paramesenteroides* WpK4 isolada de suíno na infecção experimental com *Salmonella typhimurium* em camundongos. 2015. Disponível em <https://repositorio.ufmg.br>. Acesso 25 FEV, 2022.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. ABPA. **Relatório anual 2021**. 2021. 75 p. Disponível em: <https://abpa-br.org>. Acesso 10 JAN, 2022.

COOP CARBONE. Les retombées économiques de l'industrie agroalimentaire québécoise en 2017. **Coop Carbone**. 25p. fev. 2019.

COSTA, Marcio; WEESE, J. Scott. Methods and basic concepts for microbiota assessment. **The veterinary journal**. v. 249, p. 10 – 15, 2019.

DESJARDINS, Phelippe; CONKLIN, Deborah. Nanodrop microvolume quantitation of nucleic acids. **Journal of Visualized Experiments and Thermo Fisher Scientific**. v. 45, p 1 – 4, nov 2010.

DOWNING, Charles Glenn Eldrich. Mechanization in canada. **Canadian Agricultural Engineering**. v.4, n.1, p.17, 1962.

LUCIGEN CORPORATION. Masterpure complete DNA and RNA purification kit. **Biosearch Technologies**. 18p. 2022.

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE. MAPAQ. Le bioalimentaire économique. 2020. Disponível em: www.mapaq.gouv.qc.ca/. Acesso em 14 FEV, 2022.

MITACS. Bourses de recherche mitacs globalink. 2022. Disponível em <https://www.mitacs.ca>. Acesso em 06 JAN, 2022.

NASCIMENTO, Sabrina; SUAREZ, Eloah Rabello; PINHAL, Maria Aparecida da Silva. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. **Revista Brasileira de Medicina**. 10p. 2015.

OALEY, Brian B; LILLEHOJ, Hyun S; KOGUT, Michael H; KIM, Woo k; MAURER, John J; PEDROSO, Adriana; LEE, Margie D; COLLETT, Stephen R; JOHNSON, Timothy; COX, Nelson A. The chicken gastrointestinal microbiome. **Microbiol lett.** p. 100- 112. 2014 Disponível em DOI: 10.1111/1574-6968.12608. Acesso 23 FEV, 2022.

PETECOF, Rafael; TEJADA, Erik Cendel Saenz; VEJA, Camila; COSTA, César; SAENZ, Charlotte Cesty Borda de; PETECOF, R; SAENZ, EC; VEJA, C; COSTA, C; BORDA, C C. Análise de eficiência do gel de agar-agar na eletroforese de DNA. **Centro universitário das faculdades metropolitanas unidas-FMU**. v.3, n.3, jul-set 2015.

STATISTIC CANADA. *Population and dwelling count highlight tables, 2016 census*. 2016. Disponível em: <https://www12.statcan.gc.ca>. Acesso em 14 FEV, 2022.

TAVARES, Luciano de Paulo; RIBEIRO, Kárem Cristina de Sousa. Desenvolvimento da avicultura de corte brasileira e perspectivas frente à influenza aviária. **Organização rurais & agroindustriais**. Lavras, v.9, n.1, p. 79-88, 2007.

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL. **Faculté de médecine vétérinaire**. Disponível em <https://fmv.umontreal.ca>. Acesso em 06 JAN, 2022.