

**ORIENTAÇÃO PARA COLETA, PREPARO E TRANSPORTE DE TECIDOS DE AVES
PARA COLEÇÕES (utilização potencial em sistemática molecular)**
(versão 0.9)

Helena Mata helenamata@pucrs.br

[Dr. Sandro L. Bonatto, slbonatto@pucrs.br, Coordenador]

Centro de Biologia Genômica e Molecular e Laboratório de Ornitologia MCT da PUCRS

O objetivo deste protocolo é padronizar as coletas de tecidos de aves para a utilização nas pesquisas em colaboração com o Dr. Sandro L. Bonatto no Centro de Biologia Genômica e Molecular da PUCRS. Qualquer dúvida entre em contato nos endereços acima. Os tubos e o etanol podem ser requisitados ao Dr. Bonatto no endereço acima.

I. SANGUE

A) Considerações Gerais

- 1) O sangue deve ser coletado com uma seringa estéril (preferencialmente de insulina, para as aves de pequeno porte).
- 2) A quantidade de sangue coletado é proporcional ao tamanho da ave. Em Passeriformes e Psittaciformes, por exemplo, 1% (v/p) em relação ao peso do corpo pode ser retirado, sem maiores problemas (0,9 ml de uma ave com 90g) (Campbell, 1994).
- 3) A escolha do local de coleta (veia jugular direita, veia ulnar, etc.) está relacionada com o tamanho da ave, volume de sangue necessário e a habilidade do coletor (Campbell, 1994).
Em Passeriformes aconselha-se realizar a punção da veia ulnar cutânea (asa) para obtenção de maior quantidade de sangue ou, para quantidades menores, coleta de sangue através do corte da unha.
- 4) Armazenamento de sangue em etanol: utiliza-se uma gota, 0,1ml de sangue para 1 ml de etanol absoluto ou superior a 95° GL (Carter, 2000).

B) Considerações Específicas

Para a coleta de sangue da veia adotam-se os seguintes procedimentos:

- 1) Fazer a assepsia do local, preferencialmente, com álcool (80° GL);
- 2) Tomar cuidado para não formar hematomas, pois a ave será solta novamente e estará mais vulnerável a predadores e doenças (miíases, abscessos, etc);
- 3) Logo após a retirada da agulha da veia deve-se fazer pressão no local com o dedo, utilizando algodão embebido em álcool (80° GL) até parar de sair sangue. Isto irá minimizar a formação de hematomas provocados pela agulha;

Na coleta de sangue através do corte da unha:

- 1) O material a ser usado para cortar a unha da ave deve ser previamente esterilizado;
- 2) A unha deve ser cuidadosamente limpa (etanol 80°GL) antes da realização do corte, para evitar contaminações (tanto da ave como da amostra);
- 3) Faça uma divisão imaginária da unha em três partes e, então, realize o corte na porção distal;
- 4) A hemóstase pode ser realizada semelhantemente à venipunção, contudo, pode-se colocar em volta do corte pequena quantidade de iodo ou coagulante (Kiwik Stop, encontrado em farmácias veterinárias).

Observações Gerais:

- 1) Não é aconselhado cortar a unha de animais que freqüentam muito o chão, pois, possivelmente estas aves ficarão mais predispostas a infecções na unha e, devido à dor, seu deslocamento tornar-se-á mais lento, expondo-a a predadores.
- 2) Na manipulação de aves silvestres, devido ao risco de zoonoses, (para segurança do coletor) é aconselhada a utilização de luvas.
- 3) Identifique o tubo de coleta de cada ave conforme as instruções do item coleta de dados.
- 4) Deixe a ave imóvel, por 30 minutos (no saco de pano*) e antes de soltá-la, certifique-se de que ela esteja bem.

*Utilizar um saco para cada ave a fim de evitar transmissão de patógenos entre as aves. Estes sacos devem ser lavados ao retornar do campo.

II. TECIDOS (músculo peitoral, coração, rim, fígado)

- 1) Os tecidos devem ser coletados, o mais breve possível após a morte do animal, para minimizar a autólise, pois ela ocorre rapidamente nas aves (Campbell, 1994). Caso isto não seja possível, recomenda-se manter a carcaça refrigerada.
- 2) Os instrumentos utilizados (tesouras e pinças) devem ser cuidadosamente limpos para evitar contaminação da amostra. Para tanto, é aconselhado lavar os instrumentos com detergente utilizando uma escova, assegurando-se que nenhum traço de tecido ou sangue fique retido e, após isso, flambá-los rapidamente com álcool.
- 3) Quando o projétil (chumbinho) atingir o abdômen da ave, deve-se evitar coletar tecidos dessa cavidade, pois eles podem estar expostos a enzimas digestivas e principalmente à bile, que afeta a estabilidade e conservação dos tecidos destinados a este tipo de análise (Dessauer, et al., 1990). Neste caso, coletar apenas músculo peitoral.

4) O tamanho das peças coletadas deve ser de 2-4 mm. Elas devem ser acondicionadas em tubos Eppendorf. Completar o volume do tubo com etanol 95° GL (álcool absoluto é mais recomendado) na proporção de, no mínimo, 3 volumes de álcool para 1 volume de tecido, de tal forma que as peças fiquem totalmente imersas (Dessauer, et al., 1990). Uma a duas horas após este procedimento, o álcool deve ser trocado, porque desidrata os tecidos, tornando-se diluído (Dessauer, et al., 1990; Zhang & Hewitt. 1998). Após dois dias trocar o álcool da amostra novamente e estocá-la, preferencialmente em freezer (-20°C) ou geladeira (4-8°C) (Zhang & Hewitt. 1998). Verifique cuidadosamente se a tampa está firmemente fechada, pois, diversas vezes recebemos material evaporado em consequência de tubos mal fechados. Sempre que possível, devem ser coletados dois tubos por espécime e, se for animal raro, coletar mais de dois.

Penas

As penas fornecem menor quantidade de DNA; porém, em caso de impossibilidade de obtenção de outro tecido, é possível utilizá-las.

- 1) As penas devem ser arrancadas do corpo do animal. (As penas soltas involuntariamente não podem servir.)
- 2) Retire cinco penas diretamente da região abdominal ou peitoral da ave (para aves menores como Passeriformes são necessárias adicionalmente duas primárias). As primárias devem ser arrancadas de maneira simétrica, para não comprometer o vôo da ave.
- 3) Acondicione as penas extraídas em saco plástico de fechamento hermético.

Observações Gerais:

Sempre usar luvas para manipular tecidos, a fim de evitar a contaminação da amostra e proteger o coletor.

III. COLETA DE DADOS

O material deve ser cuidadosamente etiquetado:

- a) *Marque o tubo, em pelo menos dois lugares, fixando uma etiqueta com fita transparente (durex); coloque também uma etiqueta escrita a lápis no lado de dentro do tubo.*
- b) Os dados devem conter:
 - b.1) Número de campo: usualmente as iniciais do coletor e número de identificação do animal;
 - b.2) Espécie;
 - b.3) Tipo de tecido coletado, usar abreviações: M (músculo), L (fígado), K (rim), S (pele) e H (coração).

Deve ser anexada na amostra uma ficha (conforme sugestão abaixo) contendo o máximo das informações a seguir:

- 1) Nome e endereço do coletor;
- 2) Número de campo;

- 3) Data da coleta contendo: dia (número), mês (letras) e ano (número de 4 dígitos);
- 4) Local da coleta: localidade específica da coleta, coordenadas do GPS, altitude (principalmente se a coleta for realizada em montanhas (Winker, 2000), habitat;
- 5) Espécie;
- 6) Tipo de tecido coletado;
- 7) Observações: Causa da morte, sexo, comportamento, presença de parasitos, número de frascos (epps) enviados, estado de conservação da carcaça, etc.

IV. SEGURANÇA DO PROFISSIONAL E DO MEIO AMBIENTE

A manipulação de animais silvestres expõe o pesquisador a riscos, pois, eles podem ser portadores de agentes patogênicos, inclusive zoonoses (Müller 2005). Além disto, também o pesquisador pode introduzir doenças na fauna silvestre (Cranfield et al. 2002).

Em relação à manipulação de animais, os mecanismos mais comuns de exposição são (Müller 2005):

- ✦ Inoculação direta por agulhas, contaminações de cortes ou arranhões pré-existentes através de instrumentos ou objetos contaminados e agressão animal.
- ✦ Inalação de aerossóis durante o manejo do animal.
- ✦ Contato das membranas mucosas dos olhos, boca ou narinas com gotículas de materiais, mãos e superfícies contaminadas.
- ✦ Contaminação indireta através de insetos ou ectoparasitas que se alimentam dos animais infectados.

O procedimento correto para descarte de resíduos biológicos gerados no trabalho de campo (que apresentem risco potencial à saúde humana e ambiental, e.g. algodão e seringas contaminadas com sangue*) é colocá-los em sacos plásticos resistentes, de cor branca, contendo o símbolo de risco biológico. Estes devem ser encaminhados para a instituição de pesquisa para a devida descontaminação.

* Quebrar a ponta da agulha e recolocar a proteção de plástico, certificando-se que esteja bem firme, para evitar e prevenir acidentes (isto evitará contaminações ocasionadas por reutilização indevida).

V. ENVIO DO MATERIAL

Caso tenha dúvida sobre como enviar o material, por favor, entre em contato conosco.

VI. Considerações Finais

Para informações adicionais ou dúvidas, favor entrar em contato conosco pelo fone (51) 33203500, ramais 4417/4727 ou pelos e-mails citados acima.

LITERATURA CONSULTADA:

Campbell, T. W. 1994. *Hematology*. in Ritchie, B. W., Harrison J.G. & R. Harrison. *Avian Medicine: Principles and Applications*. Wingers Publishing.

Carter, R. E. 2000. *General Molecular Biology*. in Backer, A.J. (ED) *Molecular Methods in Ecology*. Blacwell Science.

Cranfield, M., Gaffikin, L., Sleeman J. & m. Rooney. *The Mountain Gorilla and Conservation Medicine*. 2002. In Aguirre A. A. et. al. 2002. *Conservation Medicine: Ecological Health In Practice*. Oxford University Press. USA.

Dessauer, H.C., Cole, C. J. & M. S. Hafner. 1990. *Collection and Storage of Tissues*. in Hillis, D. M. & C. Moritz.(ED.) *Molecular Systematics*. Sinanauer Associates.

Müller C. A. 2005. Desafios nas pesquisas em animais silvestres. *Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária* 34:77-82.

Zhang, D. & G. M. Hewitt. 1998. *Isolation of DNA from Preserved Specimens*. in Karp, A., Isaac, P. G. & Ingram, D.S (ED).. *Molecular Tolls for Screening Biodiversity*. Chapman & Hall. London.

Winker, K. 2000. Obtaining, preserving, and preparing birds specimens. *Journal of field Ornithology*.vol 71 n°2

