

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *AVIPOXVIRUS*
ISOLADOS DE CASOS CLÍNICOS DE BOUBA AVIÁRIA EM
AVES DOMÉSTICAS**

Belo Horizonte
Escola de Veterinária
2018

TALITA GOMES DA SILVA BATISTA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *AVIPOXVIRUS*
ISOLADOS DE CASOS CLÍNICOS DE BOUBA AVIÁRIA EM
AVES DOMÉSTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientação: Nelson Rodrigo da Silva Martins

Co-Orientação: Sandra Yuliet Marín Gómez

Belo Horizonte

Escola de Veterinária

2018

B333c Batista, Talita Gomes da Silva, 1988-
Caracterização molecular de avipoxvirus isolados de casos clínicos de boubá aviária em aves domésticas / Talita Gomes da Silva Batista. – 2018.
40 p. : il.

Orientador: Nelson Rodrigo da Silva Martins

Co-orientador: Sandra Yuliet Marín Gómez

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Ave doméstica – Doenças – Teses. 2. Poxvírus – Teses. 3. Reação em cadeia de polimerase – Teses. 4. Boubá aviária – Teses. I. Martins, Nelson Rodrigo da Silva. II. Marín Gómez, Sandra Yuliet. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

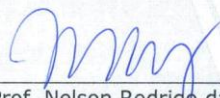
CDD – 636.508 96

FOLHA DE APROVAÇÃO

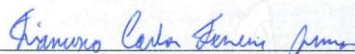
TALITA GOMES DA SILVA BATISTA

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA.

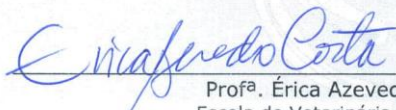
Aprovada em 08 de Fevereiro de 2018, pela banca constituída pelos membros:



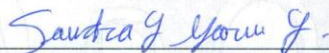
Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins
Presidente - Orientador



Dr. Francisco Carlos Ferreira Junior
Pós-Doutorado - UFMG



Profª. Érica Azevedo Costa
Escola de Veterinária - UFMG



Profª. Sandra Yuliet Marin Gomez
Escola de Veterinária - UFMG

“A vida da gente vai em erros, como um relato sem pés nem cabeça, por falta de sisudez e alegria. Vida devia de ser como sala do teatro, cada um inteiro fazendo com forte gosto seu papel, desempenho”.

João Guimarães Rosa (Riobaldo)

SUMÁRIO

RESUMO E ABSTRACT	7
1.INTRODUÇÃO	8
2.OBJETIVOS	10
3.REVISÃO DE LITERATURA	11
3.1 O AVIPOXVIRUS.....	11
3.1.2 Classificação Filogenética.....	13
3.1.3 Hospedeiros.....	14
3.2 A BOUBA AVIÁRIA.....	16
3.2.1 Patogenia.....	16
3.2.2 Formas de Manifestação	17
3.2.3 Epidemiologia.....	18
3.2.4 Diagnóstico.....	19
3.2.4.1 Isolamento viral e histopatologia.....	19
3.2.4.2 Sorologia.....	20
3.2.4.3 Diagnóstico molecular.....	21
3.2.5 Prevenção.....	22
3.2.6 Tratamento.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 LABORATÓRIOS	23
4.2 AMOSTRAS.....	23
4.3 COMITÊ DE ÉTICA.....	24
4.4 IDENTIFICAÇÃO VIRAL.....	24
4.4.1 Isolamento viral.....	24
4.4.2 Extração de DNA.....	25
4.4.3 PCR	26
4.5 SEQUENCIAMENTO.....	26
4.6 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE DNA.....	27
4.7 BUSCA DE SIMILARIDADE EM BANCOS DE DADOS.....	27
4.8 ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE DNA.....	27
4.9 ANÁLISES FILOGENÉTICAS.....	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
6. CONCLUSÕES	36
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Amostras de bouba aviária usadas nesse estudo, oriundas do Laboratório de Doenças das Aves da UFMG.....	24
Tabela 2. Sequências genômicas de P4b de estirpes do vírus de bouba aviária oriundas do Genbank, usadas para comparação com as estirpes caracterizadas nesse estudo.....	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura esquemática do genoma de um poxvirus. Sequências únicas formam a região central composta de uma molécula de DNA dupla fita complementar. As regiões terminais encontram-se repetidas em orientação inversa que são unidas entre si, dando continuidade à molécula de DNA.....	12
Figura 2. Membrana corioalantóide após 6 dias de inoculação de poxvírus oriundo de lesão cutânea de um pombo (estirpe 589 BH). Setas: pequenos pontos brancos e hemorrágicos; Círculo: área de extenso edema.....	28
Figura 3. Membrana corioalantóide após 6 dias de inoculação de poxvírus oriundo de lesão cutânea de galinha (amostra 726 BH). Setas: lesões virais puntiformes; Círculo: área de extenso edema.....	29
Figura 4. Eletroforese dos produtos amplificados a partir do gene 4b. L: marcador de tamanho de DNA (100 bp); linha 1: controle positivo (vacina comercial (Virus pombo, amostra forte, Biovet); linha 2: estirpe 742 BH; linha 3: estirpe 561 BH; linha 4: estirpe 726 BH; linha 5: estirpe 401 BH; linha 6: estirpe 659 BH; linha 7: controle negativo; Seta: marcação de aproximadamente 600 bp (tamanho esperado do primer:578bp).	30
Figura 5. Árvore Filogenética reconstruída no programa MEGA 7.0 pelo método Neighbor- Joining. Dados submetidos ao teste de confiança em topologia (Bootstrap) com 1000 reamostragens e o método de substituição de nucleotídeos Kimura-2 parâmetros. A estirpe U60315 MOCV foi usada como grupo externo. As estirpes desse estudo estão mencionadas com o número de registro e final BH.....	32
Figura 6. Árvore Filogenética reconstruída no programa MEGA 7.0 pelo método Neighbor- Joining Dados submetidos ao teste de confiança em topologia (Bootstrap) com 1000 reamostragens e o método de substituição de nucleotídeos Kimura-2 parâmetros. As estirpes desse estudo estão mencionadas com o número de registro e final BH.....	33

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. Certificado de aprovação na Comissão de Ética e Uso de Animais.....	40
--	----

RESUMO

Os poxvírus formam uma complexa família de vírus (Poxviridae), dentre os mais antigos conhecidos, capazes de infectar diversas classes de animais. Os avipoxvírus (APV) são membros do gênero *Avipoxvirus*, caracterizados, como todos poxvirus, por grandes vírions envelopados, de genoma DNA de fita dupla linear. Os APV causam a boubá aviária, uma doença nodular de caráter proliferativo, em mais de 200 espécies de aves comerciais e silvestres, acarretando prejuízos econômicos e ambientais. Esse trabalho descreve a caracterização molecular de dez isolados do gênero *Avipoxvirus* diagnosticadas em casos clínicos naturais de aves domésticas atendidas no laboratório de doenças das aves da Universidade Federal de Minas Gerais. Quatro estirpes de galinhas, duas de perus, duas de pombos e duas de canários foram submetidas à diagnóstico de PCR e sequenciamento. A reconstrução filogenética, a partir do sequenciamento do gene que codifica a proteína 4b mostrou que essas estirpes se agruparam nos clado A e clado B. Enfatiza-se a importância de estudos destinados a caracterização de isolados de APV, principalmente em espécies de grande capacidade de disseminação de agentes, como os pombos analisados nesse estudo.

Palavras- chave: poxvírus, sequenciamento, reconstrução filogenética

ABSTRACT

The poxviruses form a complex family of viruses, among the oldest known, capable of infecting several classes of animals. Avipoxviruses (APV) are members of genus *Avipoxvirus* and, as all poxviruses, characterized as large enveloped viruses with a double - stranded DNA. APV cause avian pox, a nodular disease of a proliferative nature, in more than 200 species of commercial and wild birds, causing economic and environmental losses. This study describes the molecular characterization of ten isolates of APV diagnosed in natural clinical cases birds attended at the avian diseases laboratory of the Federal University of Minas Gerais. Four strains of chickens, two of turkeys, two of pigeons and two of canaries were submitted to PCR and sequencing analyses. The phylogenetic reconstruction, from the sequencing of the gene encoding the 4b protein (fwp167), showed that these strains clustered in clade A and clade B. We emphasize the importance of studies for the characterization of APV isolates, especially in species with great capacity for agent dissemination, such as the pigeons analyzed in the study.

Keywords: poxvirus, sequencing, phylogenetic reconstruction

1. INTRODUÇÃO

A avicultura é uma das atividades agrícolas mais importantes do país, sendo responsável pelo emprego de cerca de 3,5 milhões de trabalhadores. O Brasil é o segundo maior produtor e o maior exportador de carne de frango no mundo, chegando a produzir mais de 12 milhões de toneladas de carne por ano (ABPA, 2016). Além da importância da avicultura comercial há também extensa atividade familiar de subsistência que envolve a criação de animais de corte e postura em todo território nacional.

Além da importância da avicultura comercial e de subsistência, o Brasil é um dos berços da biodiversidade no mundo. Juntamente com outros dezessete países agrega cerca de 70% dessa biodiversidade. Entre esses, nosso país é considerado o mais importante por sua grande extensão (quinto maior) e maior cobertura florestal tropical do mundo. O país abriga 1.832 espécies de aves, das quais cerca de 10% são endêmicas, com múltiplos diferentes biomas e imenso litoral, isso nos torna um dos países mais importantes para a conservação de aves (Mittermeier *et al.*, 1997; Turner, *et al.*, 2007).

A ordem mais prevalente entre as aves apreendidas do tráfico é a de Passeriformes (Vilela, 2012; Barreto, 2014), possivelmente em razão da cultura popular de manter pássaros canoros em gaiolas (Renctas, 2002). Entre os muitos impactos à saúde de aves cativas ou em conservação da ordem, estão os problemas sanitários, inclusive as doenças infecciosas.

Há uma diversidade de espécies de *Avipoxvirus* (Poxviridae, Chordopoxvirinae) descritas na classe das aves. A infecção por avipoxvírus ou boubá aviária, é distribuída mundialmente e acomete não só as espécies domésticas comerciais, como frangos e perus, mas também a grande maioria das aves silvestres e passeriformes. É uma doença viral de morbidade e mortalidade baixas, com exceção da infecção em canários, espécie que normalmente apresenta sinais mais graves e elevada mortalidade (Skinner, 2008).

A infecção, apesar de normalmente branda, acarreta em prejuízos econômicos para indústria, pois diminui o crescimento e ganho de peso das aves de corte e reduz a taxa de postura das aves poedeiras. Seu curso clínico normalmente é de 3 a 4 semanas e a cura ocorre, na maioria dos casos, de forma espontânea. Não há tratamento específico e recomenda-se apenas cuidados paliativos e tratamento sintomático.

Pouco se sabe sobre sua prevalência em diferentes ordens de aves, sua capacidade de causar infecção em diferentes hospedeiros ou mesmo sobre a virulência de cada estirpe em diferentes espécies. São necessários mais estudos acerca do gênero *Avipoxvirus* para que sua dinâmica de infecção e epidemiologia seja elucidada (Gyuranecz *et al*, 2013).

2. OBJETIVOS

1. Caracterização de estirpes de avipoxvirus oriundas de diferentes espécies de aves que fazem parte do banco de amostras do Laboratório de Doenças das Aves da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).
2. Caracterizar espécies isoladas por meio de sequenciamento genético e comparação com resultados disponíveis no GenBank.
3. Classificar os isolados e estirpes de acordo com os agrupamentos encontrados na análise filogenética.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O AVIPOXVÍRUS

Os poxvírus formam uma complexa família de vírus, dentre os mais antigos conhecidos, capazes de infectar diversas espécies de animais. A primeira vacina da história, feita por Edward Jenner em 1796, foi primeiramente produzida a partir de uma cepa natural de um poxvírus, o *cowpoxvirus*, causador da varíola bovina. Posteriormente, o vírus da vaccínia – outro poxvírus – foi usado como agente de imunização contra a varíola humana, levando-a a ser a primeira doença viral erradicada no mundo, no ano de 1980 (Canal e Diel, 2017).

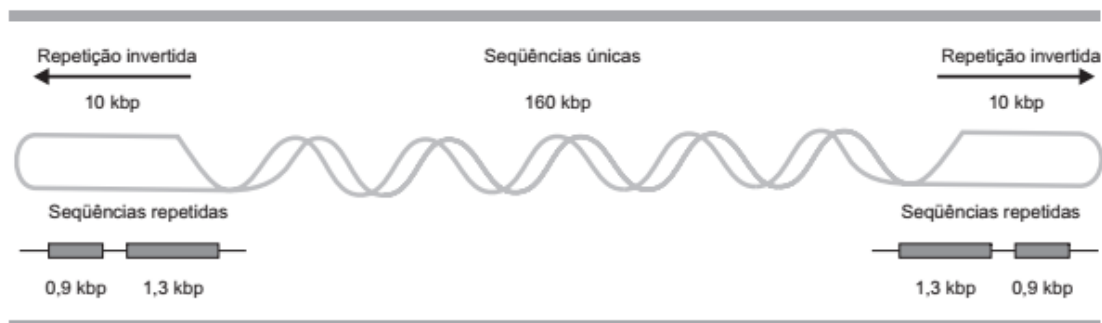
Atualmente, a família *Poxviridae* se encontra dividida em duas subfamílias: subfamília *Entomopoxvirinae*, responsável pela infecção de animais não vertebrados; e subfamília *Chordopoxvirinae*, cujos hospedeiros são animais vertebrados. Doze gêneros compõem a subfamília *Chordopoxvirinae*: *Orthopoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Molluscipoxvirus*, *Yatapoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Cervidpoxvirus*, *Crocodylidpoxvirus*, *Centapoxvirus*, um gênero ainda não definido que possui duas espécies (*Squirrelpox virus* e *Pteropox virus*) e o *Avipoxvirus* (ICTV, 2016).

O gênero *Avipoxvirus* é o único dentro da subfamília *Chordopoxvirinae*, capaz de infectar espécies de animais não mamíferos. Esse gênero engloba atualmente 10 espécies descritas: *Canarypox* vírus, *Fowlpox* vírus, *Juncopox* vírus, *Mynahpox* vírus, *Pigeonpox* vírus, *Psittacinepox* vírus, *Quailpox* vírus, *Sparrowpox* vírus, *Starlingpox* vírus e *Turkeypox* vírus. Há ainda três outras espécies esperando para serem classificadas nessa família: *Peacockpox* vírus, *Penguinpox* vírus, *Crowpox* vírus (ICTV, 2016).

Os avipoxvírus são vírus envelopados, de genoma composto por ácido desoxirribonucleico – DNA – de fita dupla linear. O comprimento de seu genoma pode chegar a 350 kbp (mil pares de bases) e estão entre os maiores vírus já descritos. Sua morfologia se assemelha, assim como outros poxvírus, ao formato de um tijolo arredondado e suas medidas chegam a 330 x 280 x 200 nm, sendo facilmente retidos em filtros de 200 nm de porosidade (Skinner, 2008; Tripathy e Reed, 2013).

Os vírus da subfamília *Chordopoxvirinae* possuem uma região central muito conservada entre seus membros, responsável pela estrutura básica de replicação e por regiões terminais variáveis que possuem genes codificantes de estruturas determinantes de virulência e especificidade de

hospedeiros, que modulam os mecanismos de defesa da célula infectada, porém que não são essenciais a replicação.



Fonte: adaptado de Canal e Diel, 2017.

Figura 1. Estrutura esquemática do genoma de um poxvírus. Sequências únicas formam a região central composta de uma molécula de DNA dupla fita complementar. As regiões terminais encontram-se repetidas em orientação inversa que são unidas entre si, dando continuidade à molécula de DNA.

Sua replicação ocorre, diferente do observado na maioria de outros DNA vírus, obrigatoriamente no citoplasma da célula hospedeira gerando, microscopicamente, corpúsculos de inclusão basofílicos que, quando corados com o método hematoxilina-eosina permitem a visibilização de partículas virais (corpúsculos de Borrel). Essa peculiaridade se deve ao fato dos poxvírus possuírem em seu genoma todo conteúdo enzimático necessário para a transcrição e síntese do RNA mensageiro (mRNA), não havendo necessidade de utilização de mecanismos da célula hospedeira (Skinner, 2008).

Estudos feitos com o vírus da vaccínia (protótipo de vírus para a subfamília *Chordopoxvirinae*) demonstram que após apenas 20 minutos de infecção celular já ocorre a transcrição de moléculas de mRNA responsáveis pela tradução de proteínas que promovem o desnudamento do genoma viral e também a modulação da resposta imune do hospedeiro. Na fase intermediária e tardia da replicação há tradução de proteínas estruturais. A replicação do genoma ocorre em até duas horas após infecção do vaccínia vírus. Porém os avipoxvírus são mais lentos e têm a replicação do genoma iniciada após 12 a 16 horas de infecção. Os locais do citoplasma onde ocorrem a replicação viral são chamados de viroplasmas e são acoplados ao retículo endoplasmático rugoso.

Existem duas formas virais infectantes: os chamados IMV (*intracellular mature virions*) que podem ser liberados da célula por meio de lise ou brotamento. Quando liberados por brotamento essas partículas de vírions incorporam parte da membrana plasmática do hospedeiro e passam a ser chamadas EEV (*extracellular enveloped virus*). Esses últimos são mais virulentos e conseguem infectar novas células mais rapidamente (Canal e Diel, 2017).

A espécie protótipo usada para caracterizar o gênero *Avipoxvirus* é o *Fowlpox* vírus, que teve seu genoma completamente sequenciado por Afonso *et al.* (2000). Além desse, a espécie *Canarypox virus* também teve seu genoma completamente sequenciado por Tulman *et al.* (2004).

3.1.2 Classificação Filogenética

Normalmente, a nomenclatura dos avipoxvirus segue em acordo com a espécie em que eles foram primeiramente descritas e caracterizadas, no entanto, estudos moleculares recentes indicam que nem sempre o hospedeiro natural de determinada estirpe é aquele onde ela é frequentemente, ou foi primeiramente encontrada (Jarmin *et al.*, 2006; Gyuranecz *et al.*, 2013).

A primeira classificação molecular proposta para o gênero *Avipoxvirus* foi apresentada por Lüshow e colaboradores em 2004. Em um estudo realizado na Alemanha, eles isolaram dez estirpes de avipoxvirus que infectavam diferentes espécies de aves. A análise filogenética derivada desse sequenciamento mostrou que essas amostras se agrupavam em cinco grupos distintos que foram nomeados com algarismos romanos, de I a V.

No grupo I se agruparam as estirpes de galinhas, uma estirpe de peru e uma de pardal. O Grupo II recebeu as estirpes de pombo e avestruz. No grupo III ficou apenas uma amostra de falcão. No grupo IV houve agrupamento de uma estirpe de pardal, além de outras duas oriundas de um canário e uma ave aquática da família dos Burhinidae, chamado *stone curlew*. Essa foi uma observação muito importante, pois se tratava de um dos primeiros relatos de que estirpes diferentes do gênero *Avipoxvirus* poderiam causar infecção em uma mesma espécie. Por último no grupo V uma estirpe oriunda um agaporne (*Agapornis* sp.) se alinhou.

Atualmente, a classificação mais aceita é a proposta por Jarmin *et al.* (2006), onde subdivide-se as espécies de avipoxvírus em três grupos genéticos maiores. Esses grupos são representados como clados A, B e C, e neles estão agrupados, respectivamente: as estirpes de galinha (Fowlpox-

like), as estirpes de canários (Canarypox-like) e a estirpe de psitacídeos (*Psittacinepox* vírus). O grupo A é subdividido em A1, A2, A3 e A4 em que, normalmente, estão compreendidas as estirpes que acometem a ordem dos Galliformes e Columbiformes. O grupo B é subdividido em B1 e B2, nos quais, normalmente, se encontram as espécies que acometem Passeriformes. Já o grupo C é o mais distinto geneticamente e é onde se encontram as estirpes de psitacídeos (Jarmin *et al.*, 2006; Manarolla *et al.*, 2010).

No entanto, novas pesquisas de caracterização molecular têm corroborado a ideia de que uma mesma estirpe pode sim, acometer diferentes espécies de aves. Weli *et al.*, (2004) demonstraram que uma amostra *pigeonpox* vírus oriunda de um pombo-torcaz (*Columba palumbus*) foi agrupado no clado B (Canarypox-like vírus); já Jarmin *et al.* (2006) demonstraram que uma amostra de *pigeonpox* vírus, também oriunda de lesões de pombos (*Columba* sp.) foi agrupada no clado A (Fowlpox-like vírus).

Há também trabalhos como os de Slocombe *et al.* (2013) e Fukui *et al.* (2016), em que as estirpes encontradas em um carmesim rosela australiano e em um corvo de zoológico do Japão, respectivamente, não se encaixam em nenhum dos três grupos citados acima. Esses estudos corroboram a importância de mais estudos moleculares em casos de avipoxvirus.

Um estudo recente sobre isolados de Avipoxvirus de surtos bouba em plantéis de galinhas vacinadas em Moçambique reforçou a necessidade de reavaliação das estirpes vacinais adotadas naquele país, possivelmente a inclusão da estirpe variante, em razão do surgimento de uma clade E de avipoxvirus sem proteção cruzada com clado A (Mapaco *et al.*, 2017).

A permanente atenção à evolução de Avipoxvirus, com o isolamento e caracterização de diferentes estirpes, é uma estratégia necessária para o adequado enfrentamento de eventual emergência de bouba aviária.

3.1.3 Hospedeiros

Segundo Bolte *et al.* (1999) e Tripathy e Reed (2013) o gênero *Avipoxvirus* infecta mais de 232 espécies de aves pertencentes a mais de 23 ordens de aves diferentes mundialmente, incluindo espécies de aves silvestres ameaçadas de extinção. A família Poxviridae é muito heterogênea quanto a capacidade de infectar diferentes hospedeiros. Há gêneros que possuem alta especificidade, como o *Orthopoxvirus* da varíola humana e o *Molluscipoxvirus* causador do

molusco contagioso, que infectam estritamente humanos. E há também estirpes com amplo espectro de hospedeiros, capazes de causar infecções em diferentes espécies, tais como o vaccínia vírus e o vírus da varíola bovina (também estirpes do gênero *Orthopoxvirus*) que podem infectar bovinos, humanos, macacos e até mesmo felídeos.

O próprio gênero *Avipoxvirus* possui estirpes com diferentes níveis de especificidade (Jarmin *et al.*, 2006; Haller *et al.*, 2014). Sua virulência também é muito variável de acordo com a estirpe e espécie do hospedeiro infectado, porém essa dinâmica de interação estirpe viral-hospedeiro ainda não é muito bem elucidada (Canal e Diel, 2017).

Existe, dentro da família Poxviridae, um conjunto de genes que são relacionados a capacidade de infecção de diferentes hospedeiros. Esses genes são conhecidos como *host range genes* e atualmente, são descritos cerca de 15 diferentes genes agrupados em 12 famílias (Haller *et al.*, 2014). Esses genes não são muito conservados, pois nenhum deles é encontrado em todos os gêneros de poxvírus e são relacionados com uma maior virulência da estirpe viral.

Nos avipoxvirus os *host range genes* mais comumente encontrados são os genes que codificam as proteínas serpinas (serinas inibidoras de proteinases que inibem a resposta inflamatória celular) e ankyrin/F-box (atuam se ligando a complexos de ubiquitina-ligase na superfície celular) modulando a resposta imune celular (Mercer *et al.*, 2005; Sonnberg *et al.*, 2008). No entanto não há trabalhos que relacionem *in vivo* a presença/expressão desses genes com maior amplitude de hospedeiros infectados ou maior virulência para o gênero *Avipoxvirus*.

Tratando-se de poxvírus aviários, pouco se sabe sobre a diversidade de hospedeiros que cada estirpe viral pode infectar (Bolte *et al.*, 1999; Jarmin *et al.*, 2006). Testes de especificidade eram baseados em testes cruzados de virulência e proteção, ou seja, a partir da inoculação de determinada estirpe viral em um hospedeiro distinto do qual ela foi isolada, foram avaliadas a virulência e a capacidade de promover proteção cruzada contra estirpes sabidamente virulentas para aquele hospedeiro. Por exemplo, o poxvírus isolado de papagaios é capaz de causar infecção branda em galinhas, porém não confere proteção cruzada para as mesmas quando expostas ao poxvírus de galinhas (*fowlpox* vírus) (Tripathy e Reed, 2013).

Esses testes citados anteriormente levaram à crença de que os avipoxvírus eram espécie-específicos, ou que, ao máximo, eram capazes de infectar somente aves de uma mesma ordem. No entanto, estudos moleculares recentes demonstraram que nem sempre essa especificidade ocorre, pois, algumas famílias de aves são susceptíveis a diferentes estirpes virais.

Segundo Landolt e Kocan (1976) em um abrigo com mais de 100 espécies de pássaros, apenas os estorninhos-de-bali (*Leucospar rothchildii*) desenvolveram sinais clínicos de boubá aviária quando em contato com um *starlingpox* vírus introduzido no aviário por meio da entrada de estorninhos-comuns (*Sturnus vulgaris*) portadores. Esse mesmo *starlingpox* vírus não foi capaz de causar doença em galinhas. Sugerindo que a estirpe *starlingpox* seja altamente específica para a família de passeriformes Sturnidae, da qual pertencem ambas as espécies. Canários são altamente susceptíveis ao *canarypox* vírus, chegando a 100% de letalidade, porém são resistentes ao *turkeypox*, *fowlpox*, e ao *pigeonpox* vírus. Da mesma forma que pombos são altamente sensíveis ao *pigeonpox* vírus, no entanto resistentes ao *turkeypox* e ao *fowlpox* vírus (Tripathy e Reed, 2013).

Gyuranecz *et al.*, (2013) sugere que essa variedade de estirpes capazes de causar doença em mais de uma espécie de aves seja resultado da capacidade do vírus de se recombinar com diferentes estirpes quando em contato contínuo, como no caso de espécies animais com relação de presa-predador.

3.2 A BOUBA AVIÁRIA

A boubá ou varíola aviária, também conhecida popularmente como pipoca, bexiga ou caroço é uma doença infectocontagiosa de aves causada pelo avipoxvírus. A infecção ocorre em diversas espécies de aves, desde aves da avicultura comercial até pets e aves silvestres.

A boubá aviária é uma doença de baixa taxa de transmissão e mortalidade, com exceção das infecções em canários e codornas– onde a letalidade pode chegar a 100%. Pode causar perdas econômicas por queda na postura e redução da taxa de crescimento das aves (Skinner, 2008).

3.2.1 Patogenia

Muito do que se sabe sobre a patogenia dos poxvirus vem de estudos do vírus da vaccínia que são extrapolados para toda a subfamília Chordopoxviridae, porém sabemos que existe uma significativa variação genética entre os poxvirus, em especial no gênero *Avipoxvirus*.

A replicação viral se inicia assim que ocorre a invasão da célula hospedeira e o poxvírus é capaz de induzir mudanças no metabolismo celular que são importantes para sua sobrevivência e

disseminação para outras células. O início da replicação do genoma viral ocorre após 12 a 24 horas de infecção e tem seu auge após 72 horas, essa rapidez se deve ao fato de os poxvirus possuírem em seu DNA toda a maquinaria necessária para sua replicação, não necessitando de se utilizar dos componentes da célula hospedeira (Buller e Palumbo, 1991). As primeiras 36 horas são marcadas por intensa resposta inflamatória com hiperplasia celular que cessa após 96 horas de infecção. A partir daí tem-se início a fase de produção de proteínas virais e montagem de partículas virais maduras que se disseminam ao deixarem a célula hospedeira por meio de brotamento ou lise (Buller e Palumbo, 1991; Tripathy e Reed, 2013).

O período de incubação do vírus pode variar de acordo com a estirpe viral e a espécie hospedeira, mas, em geral, varia de quatro a dez dias em galinhas e perus e em média apenas quatro dias em canários. O curso da infecção, quando em sua forma branda, até a cicatrização total das lesões dura em média de três a quatro semanas, porém pode se prolongar em casos mais graves (Tripathy e Reed, 2013).

3.2.2 Formas de Manifestação

A infecção da bouba aviária pode se apresentar em três diferentes formas: a cutânea (seca), a forma diftérica (úmida) e a forma septicêmica (Tripathy e Reed, 2013).

A primeira forma é a apresentação mais clássica da doença e ocorre pela transmissão mecânica do vírus por meio da picada de insetos, principalmente mosquitos e ácaros, ou contato de pele lesionada com o vírus presente em descamações e crostas. Normalmente afeta áreas glabras do corpo, tais como patas, olhos, pálpebras, barbelas e crista. As lesões têm, inicialmente, aspecto vesicular e com a proliferação viral em células epiteliais, essas adquirem aparência nodular e ocorre espessamento da área afetada devido a hiperplasia envolvendo células da epiderme e folículos pilosos e ao recrutamento de células inflamatórias (Skinner, 2008).

As lesões são, em sua fase vesicular, brancas ou amareladas, passando para lesões mais escuras e crostosas na fase de hiperplasia e posteriormente se tornam hemorrágicas e descamam com facilidade. Essa fase dura cerca de duas semanas e é principal fase de transmissão, pois esses restos celulares que se desprendem são ricos em partículas virais e podem facilmente ser ingeridos ou inalados por outros animais (Tripathy e Reed, 2013).

A forma úmida ou diftérica ocorre, principalmente quando há inalação ou ingestão de partículas virais presentes no ambiente e infecção do trato respiratório e digestivo superior. Há infecção da membrana mucosa da boca, língua, esôfago e traqueia, gerando lesões nodulares caseosas que interferem no processo de alimentação e respiração das aves, podendo acarretar quadros de inanição, desidratação e até mesmo morte por asfixia. Essa forma de apresentação ocorre com maior frequência em criações com alta densidade populacional e a taxa de mortalidade tende a ser mais elevada. Não é incomum animais que apresentam, simultaneamente, as duas formas da doença (Skinner, 2008; Tripathy e Reed, 2013).

Há ainda uma terceira forma de apresentação da doença, mais comum em canários e codornas, onde a infecção sistêmica e, principalmente, do trato respiratório tem manifestação superaguda com desenvolvimento de pneumonia, cianose e morte em poucos dias. Essa manifestação pode alcançar letalidade de 100% dos animais (Tripathy e Reed, 2013).

3.2.3 Epidemiologia

Os *Avipoxvirus* possuem distribuição mundial, atingindo diversas espécies de aves dentre espécies comerciais e silvestres. Por ser uma doença de baixa morbidade, normalmente assume caráter endêmico em várias regiões. Parker *et al.*, (2011) analisaram aves coletadas entre os anos de 1891 e 1906 nas Ilhas Galápagos que pertenciam às coleções da Academia Californiana de Ciência e do Museu Zoológico de Munique e encontraram lesões sugestivas de boubá aviária em 6,3% das 3973 espécimes de tentilhões e *mockingbirds* avaliadas, dos quais 35,6% foram positivas para a presença da estirpe *Cararypoxvirus*, analisadas por meio de diagnóstico molecular.

Apesar dos muitos relatos de infecção nas mais diversas espécies de aves em muitos países, são escassos os relatos que documentem a prevalência da doença na fauna aviária. Dentre os trabalhos existentes, destacam-se o de Fukui *et al.* (2016) que durante os anos de 2006 a 2012 pesquisou a presença de lesões cutâneas sugestivas de boubá aviária em corvos das regiões Sapporo e Asahikawa no Japão, encontrando prevalência média de 17,6% (358/2036) de animais com lesões, dentre esses, 40,0% eram animais jovens. Antes de 2006 a boubá aviária nunca tinha sido relatada em corvos no Japão, o que caracteriza a emergência de uma epizootia de boubá aviária na população de corvos japoneses.

Em trabalho semelhante realizado na Espanha por Ruiz-Martínez *et al.* (2016), avaliou-se a prevalência de lesões de avipoxvirus em pardais-domésticos da região sul e da região central do país, encontrando prevalência de 3,2% (de 2,341) e de 3% (de 338), respectivamente.

Recentemente tem sido relatado casos de reemergência do agente viral em planteis comerciais de frangos, causado doença clinicamente mais grave e com maiores índices de mortalidade, além de significativas perdas econômicas em regiões dos EUA onde a doença já se encontrava controlada com a prática da vacinação preventiva. Estudos de proteção cruzada sugerem que as variantes responsáveis por esses surtos são imunologicamente distintas das cepas vacinais, o que pode indicar tanto a introdução de uma nova estirpe como também a mutação das estirpes circulantes (Tripathy e Reed, 2013).

Lüschow *et al.* (2004) relataram a reemergência do avipoxvirus em plantéis comerciais da Alemanha, onde após 25 anos sem nenhum relato de ocorrência da doença, entre os anos de 2000 a 2004 mais de 40 surtos foram observados.

Lawson *et al.*, (2012) relatam a emergência de infecção por avipoxvirus de elevada severidade em aves silvestres da família Paridae, principalmente os chapins-reais na região do Reino Unido. Durante os anos de 2006 a 2010, dos 302 relatos de incidentes suspeitos de avipoxviroses, 211 envolviam aves da família *Paridae*.

3.2.4 Diagnóstico

Os sinais da boubá aviária, quando em sua forma cutânea ou diftérica, são bastante característicos e permitem o diagnóstico presuntivo da doença. Ainda assim existem disponíveis métodos de detecção viral e de anticorpos ou caracterização das lesões que podem auxiliar na confirmação do diagnóstico, principalmente em casos não clássicos.

3.2.4.1 Isolamento viral e histopatologia

As duas técnicas de escolha para confirmação do diagnóstico da boubá aviária consistem no isolamento viral em cultivos celulares ou em ovos embrionados e na caracterização histopatológica das lesões (Tripathy e Reed, 2013).

O isolamento viral pode ser feito tanto em inoculação em ovos embrionados como em meios celulares. O vírus pode ser isolado a partir do inóculo preparado por meio da maceração e

tratamento das lesões cutâneas ou diftéricas de animais infectados. A solução contendo o macerado deve ser centrifugada a baixa rotação e então adicionada de antibióticos para que não haja morte embrionária por infecção bacteriana (OIE, 2016).

A inoculação em membrana corioalantóide (CAM) dos ovos embrionados SPF (*Specific Pathogen Free*) deve ser feita em ovos de nove a doze dias de idade e esses devem ser incubados a 37° C por cinco a sete dias. Após esse período é possível observar as lesões pontuais em forma de placas e espessamento da membrana devido à replicação viral (OIE, 2016).

A propagação viral também pode ser feita em cultivos celulares de origem aviária, tais como fibroblastos ou células de rim de aves, células secundárias de codorna (QT35) e embriões de pato. O processamento do inóculo é feito da mesma maneira que para isolamento em ovos embrionados. O efeito citopático, que consiste, inicialmente, em perda da morfologia celular com arredondamento das células e posterior degeneração por necrose, pode ser observado após quatro a seis dias de inoculação. Porém nem todas as estirpes de *Avipoxvirus* tem capacidade de se replicarem nessas células (OIE, 2016).

Histopatologicamente, a principal característica dessas lesões é a hiperplasia do epitélio com demonstração de corpúsculos de inclusões eosinofílicas do tipo A (Bollinger) e corpos elementares virais (Borrel) em citoplasma celular por meio de técnicas de coloração por Hematoxilina-Eosina ou Wright. Essas mesmas inclusões podem ser encontradas em cortes ou até mesmo esfregaços de fragmentos das lesões colhidas diretamente dos animais acometidos corados pela técnica de Gimenez ou Wright (Tripathy e Reed, 2013).

3.2.4.2 Sorologia

Os exames sorológicos visam a detecção de anticorpos contra o vírus da bouba e são testes indicados para triagem de planteis positivos (OIE, 2016).

Um dos primeiros testes usados para detecção de anticorpos precipitáveis contra poxvírus foi o de imunodifusão em gel de ágar (IDGA). Essa técnica indicada, principalmente, quando se deseja testar o estado imunológico de um animal ou a imunidade geral de determinado lote de animais, como em respostas vacinais, por exemplo. Porém, trata-se de uma técnica de baixa sensibilidade em relação a outros testes, além do fato de que anticorpos precipitáveis não são

facilmente detectados em todos estádios de infecção, sendo indicado a realização do exame no período de 15 a 20 dias pós-infecção (Tripathy e Reed, 2013; OIE, 2016).

Outra técnica utilizada para diagnóstico de boubá aviária é a hemaglutinação passiva. Esse é um teste de sensibilidade muito boa, e a detecção de anticorpos ocorre já em estádios iniciais da infecção, porém não é possível a diferenciação entre as diferentes estirpes de *Avipoxvirus* (Tripathy e Reed, 2013).

A técnica de neutralização viral também pode ser usada quando se objetiva a detecção precoce de anticorpos e consiste em promover a interação do vírus previamente purificado em laboratório com os soros teste e posteriormente proceder a inoculação em ovos embrionados ou cultivos celulares para observar a taxa de proteção conferida por soros reagentes (Tripathy e Reed, 2013; OIE, 2016).

O imunoblotting é uma técnica que, apesar de não muito usada rotineiramente por sua complexidade e alto custo, tem a grande vantagem de possibilitar a discriminação entre diferentes estirpes de poxvírus, inclusive entre estirpes de campo e estirpes vacinais (OIE, 2016).

Dentre todos os exames citados, o de escolha para detecção precoce de anticorpos, tanto por sua maior sensibilidade quanto pela capacidade de detecção precoce, e que varia entre sete e dez dias após infecção, é o Ensaio Imunoenzimático Indireto, ELISA. (Tripathy e Reed, 2013; OIE, 2016).

3.2.4.3 *Diagnóstico Molecular*

O diagnóstico molecular tem sido amplamente utilizado quando se deseja confirmação do diagnóstico boubá aviária em determinado caso clínico devido sua alta sensibilidade e ao fato de ser, atualmente, uma técnica mais acessível (Skinner, 2008).

Os pares de *primers* mais utilizados nessa técnica tem sido o do gene de que codifica a proteína de núcleo viral P4b (*fpvI67* locus) oriundo da estirpe vacinal de Vaccinia vírus A3L, que produz um produto 578 pares de base (bp) de comprimento. Esse é um gene muito conservado dentre os

avipoxvírus gerando, para todas as espécies que compõem esse gênero, um fragmento de mesmo tamanho (Lüschow *et al.* 2004; Welli *et al.* 2004).

3.2.5 Prevenção

Os avipoxvírus são, em geral, extremamente resistentes no ambiente, descamações de pele e crostas de feridas por um longo período, além de resistirem também a grande maioria dos desinfetantes comerciais. Logo, o manejo sanitário de áreas de plantéis acometidos pela doença é extremamente difícil e falho na maioria das vezes (Tripathy e Reed, 2013).

A principal forma de controle da disseminação do vírus é a prevenção por meio de vacinas. Atualmente, estão disponíveis comercialmente dois diferentes tipos de vacinas para plantéis de galinhas e perus: vacina de origem de fowlpox virus (vírus de galinha), esta vacina pode ser produzida a partir de inoculação em CAM de ovos SPF ou pode ser produzida por passagens em cultivos celulares, o que acarreta em sua atenuação. E a vacina de pigeonpoxvirus (vírus de pombo) conhecida como vacina “forte”, pois se trata de um vírus vivo sem atenuação (naturalmente menos virulento em galinhas e perus) (Tripathy e Reed, 2013).

A vacinação com as vacinas vivas deve ser feita em animais de quatro semanas ou em poedeiras duas semanas antes do início de produção. Em animais que permanecerão mais de um ano em produção é recomendada a revacinação. A vacina de fowlpox atenuada (de cultivo celular) pode ser aplicada em animais de um dia. A via clássica de inoculação dessas vacinas é a da membrana da asa (Tripathy e Reed, 2013).

A vacinação pode ainda ser realizada “*in ovo*” no 18^a dia de incubação. Essa técnica é bastante promissora pois reduz os custos da vacinação e acaba com o estresse da manipulação gerado durante a vacinação de pintainhos (Tripathy e Reed, 2013).

Existe ainda dois outros tipos de vacinas recentemente comercializadas: uma de quailpoxvirus (vírus de codorna) e uma de canarypoxvirus (vírus de canários). Sua utilização tem sido pequena e ao que estudos indicam, embora não tenham este objetivo, elas não conferem proteção cruzada com as estirpes mais comuns de fowlpoxvirus (Tripathy e Reed, 2013).

Atualmente, com o uso frequente de vacinas vetoradas em que o vetor é um canarypoxvirus o conhecimento do status imunológico dos plantéis e de ocorrência de proteção cruzada dentro do

gênero *Avipoxvirus* é importante, pois o sucesso da vacinação depende da replicação viral no hospedeiro vacinado.

3.2.6 Tratamento

O tratamento da bouba consiste apenas em cuidados sintomáticos e prevenção da infecção secundária, tendo em vista que não há um tratamento específico capaz de inibir ou reduzir a replicação viral e desenvolvimento das lesões (Skinner, 2008).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LABORATÓRIOS

O projeto foi realizado no Laboratório de biologia molecular do Setor de Doenças das Aves da Universidade federal de Minas Gerais-UFMG. O sequenciamento das amostras foi realizado pelo Laboratório de Genética Animal da Escola de Veterinária da UFMG.

4.2 AMOSTRAS

As amostras biológicas que foram analisadas são oriundas do banco de amostras Laboratório de Doenças das Aves da Universidade federal de Minas Gerais-UFMG durante os anos de 2010 a 2014. Foram utilizados todos os casos de bouba que chegaram para diagnóstico durante esse período e que havia material adequado para ser reprocessado e submetido as análises de PCR, sequenciamento e isolamento viral. Essas amostras são descritas na tabela 1.

Tabela 1. Amostras de bouba aviária usadas nesse estudo, oriundas do Laboratório de Doenças das Aves da UFMG.

Número de identificação da amostra/Ano	Hospedeiro	Natureza do material clínico	Origem
401 / 2010	<i>Columba livia</i>	Lesão cutânea	Belo Horizonte/MG
561 / 2012	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Lesão cutânea	Belo Horizonte/MG
589 / 2012	<i>Columba livia</i>	Lesão cutânea	Belo Horizonte/MG
659 / 2013	<i>Meleagris gallopavo</i>	Lesão cutânea	Belo Horizonte/MG
717 / 2014	<i>Meleagris gallopavo</i>	Lesão cutânea	Belo Horizonte/MG
726 / 2014	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Lesão cutânea	Campinas / SP
742 / 2014	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Lesão cutânea	Pompéu/MG
784 / 2014	<i>Serinus canaria</i>	Lesão cutânea	Belo Horizonte/MG
875 / 2014	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Lesão cutânea	Belo Horizonte/MG
941 / 2014	<i>Serinus canaria</i>	Lesão cutânea	Belo Horizonte/MG

4.3 COMITÊ DE ÉTICA

Esse projeto de pesquisa teve aprovação do Comitê de Ética e Experimentação Animal da UFMG sob protocolo de identificação 327/2017. O anexo A mostra o certificado emitido pela entidade.

4.4 IDENTIFICAÇÃO VIRAL

4.4.1 Isolamento viral

As amostras colhidas e armazenadas sob congelamento (-20°C) a partir de lesões cutâneas de aves com diagnóstico clínico prévio bouba aviária, foram reprocessadas por meio de maceração em gral e pistilo com solução de PBS previamente autoclavado. Essa suspensão foi então centrifugada a baixa rotação (300 rpm por 2 minutos) e acrescida de solução antibacteriana e antifúngica (penicilina, estreptomicina e anfotericina B) na concentração de 2%. Para cada amostra foram

usados 6 ovos e para cada ovo inoculado foi usado 100 µL dessa suspensão, que, após realizado o deslocamento da membrana corioalantóide com auxílio de um ovoscópio, foram inoculadas via membrana corioalantóide de ovos embrionados de plantel controlado (livres de patógenos específicos) de 9 a 12 dias de idade e após incubados a 37°C por 6 dias foi avaliado o desenvolvimento das lesões características de poxvírus na membrana corioalantóide (OIE, 2016).

4.4.2 Extração de DNA

A extração do DNA das lesões cutâneas de mucosa sugestivas de infecção por poxvírus, e as membranas dos ovos SPF inoculados com esses materiais, foi executada pelo método de sílica e iodeto de sódio. Os tecidos armazenados foram macerados e acrescidos de 800 µL de iodeto de sódio (NaI) 6M. Essa solução foi aquecida a 55 °C em termobloco por 20 minutos e centrifugada a 3500 rpm (rotações por minuto) por 2 minutos. O sobrenadante foi retirado com auxílio de uma pipeta e colocado em num novo tubo de microcentrífuga juntamente com 40 µL de sílica. Essa solução foi então homogeneizada em vórtex e incubada em um agitador por 15 minutos. Em seguida foi realizada uma nova centrifugação a 3500 rpm por 2 minutos e o sobrenadante foi então descartado.

O sedimento (DNA ligado a sílica) passou por duas lavagens em solução de lavagem etanol (Etanol 60%, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0) e centrifugação a 1500 rpm por 90 segundos. Descartou-se o tampão de lavagem e foi adicionado 1 mL de acetona. Após homogeneização em vórtex e mais uma centrifugação a 1350 rpm por 60 segundos a acetona foi evaporada em termobloco a 55°C por 20 minutos. O sedimento é então adicionado de 80 µL de tampão eluição TE 1x (5 mM Tris-HCl pH 8.0, 0,5 mM EDTA pH 8.0) em seguida os tubos foram centrifugado a 1350 rpm por 2 minutos e o sobrenadante foi removido e transferido para um novo tubo (Vogelstein e Gillespie, 1979; Boom *et al.*, 1990).

A quantidade de pureza do DNA foi aferida em espectrofotômetro NanoVue® (GE, Healthcare, Reino Unido) para padronização de 200 ng/µL de DNA.

4.4.3 PCR

A detecção do DNA viral foi realizada após extração por meio da amplificação da sequência genômica que codifica a proteína de núcleo P4b. Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados foram o M2925 5'-CAGCAGGTGCTAAACAACAA-3' e M2925 5'-CGGTAGCTTAACGCCGAATA-3', que geram produtos de comprimento de 578 bp, segundo metodologia previamente descrita (Lee e Lee, 1997). O controle positivo foi extraído da vacina comercial (vírus pombo, amostra forte, Biovet) utilizada contra a boubá aviária. Como controle negativo foi utilizada o inóculo preparado com inóculo a partir da CAM dos ovos inoculados apenas com PBS autoclavado.

A amplificação ocorreu em termociclador modelo PTC 100, MJ Research, Watertown, MA) sob as seguintes condições: fase inicial 94° C por 5 minutos seguida de 35 ciclos de amplificação (94°C por 1 minutos), 50 °C por 1 minuto, 72°C por um minuto e extensão final a 72°C por 5 minutos com posterior resfriamento para 8 °C.

O produto amplificado foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,5X (100mM Tris-base pH8,3, 25 mM EDTA e 50 mM ácido bórico). Anteriormente à corrida, o gel foi corado com solução corante GelRed® (Biotium) e os resultados foram visualizados em transiluminador UV (Macrovue, Hoefer/Pharmacia, EUA).

4.5 SEQUENCIAMENTO

Para sequenciamento dos produtos purificados e amplificados foi empregado o método de dideoxinucleotídeos (Sanger *et al.*,1977) em sequenciador automático capilar ABI 310G (Perkin Elmer, EUA) utilizando o kit Big Dye Terminator Mix (Applied Biosystems, EUA) de acordo com as condições de reação e leituras indicadas pelo fabricante.

O produto da reação de amplificação foi purificado por precipitação utilizando isopropanol e etanol e homogeneizado em formamida, com desnaturação rápida a 95°C por dois minutos e imediatamente resfriado em banho de gelo. Cada amostra foi sequenciada em ambas as direções da dupla fita. As análises foram realizadas no laboratório de Genética do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

4.6 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE DNA

A análise da qualidade das sequências foi feita com o programa BioEdit (Hall, 1999). Todos os alinhamentos foram revisados e editados manualmente quando necessário.

4.7 BUSCA DE SIMILARIDADE EM BANCOS DE DADOS

Todas as sequências DNA consenso obtidas foram comparadas com sequências disponíveis no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando os algoritmos dos programas BLAST 2.0 (Basic Local Alignment Search Tool), BLASTn e BLASTx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), para a busca de similaridade entre os nucleotídeos (Altschul *et al.*, 1997).

4.8 ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE DNA

As sequências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos foram alinhadas com as sequências de depositadas no GenBank com o auxílio do programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1997). O qual está implementado no programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 7.0/ www.megasoftware.net) versão 7.0 para Windows.

4.9 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

A análise filogenética dos nucleotídeos deduzidos foi realizada utilizando o método Neighbor-Joining, com o programa MEGA7.0. Como grupo externo foi utilizado o vírus *Molluscum contagiosum* virus (MOCV). Os dados foram submetidos ao teste de confiança em topologia (Bootstrap) com 1000 reamostragens, para testar a confiabilidade dos agrupamentos obtidos nas árvores filogenéticas, com o método de substituição de nucleotídeos Kimura 2- parâmetros (Kimura, 1980).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A infecção por avipoxvírus tem sido relatada como uma doença reemergente em diversos países do mundo. Em alguns casos, como nos EUA e na Alemanha, até mesmo plantéis já previamente vacinados desenvolveram infecção clínica (Lüschow *et al.*, 2004; Tripathy e Reed, 2013).

A inoculação em ovos embrionados SPF permitiu o isolamento viral em duas das dez amostras inoculadas. A partir do material das membranas foi então realizado PCR e purificação para posterior sequenciamento. Das amostras que não foram possíveis de serem isoladas em ovos embrionados foi realizado PCR do material armazenado das lesões cutâneas. Segundo Tripathy e Reed (2013) nem todas as estirpes virais podem ser isoladas em membrana corioalantoide ou mesmo em cultivos celulares por não serem adaptadas aos hospedeiros dos quais essas células são oriundas.

As figuras 3 e 4 abaixo mostram o resultado do isolamento das amostras 589 e 726. Evidenciando as lesões puntiformes e o edema da membrana corioalantoide, características da infecção por poxvírus.

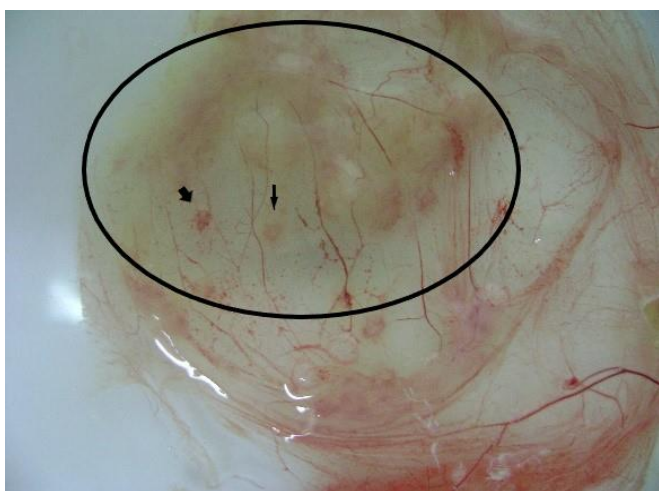


Figura 2. Membrana corioalantoide após 6 dias de inoculação de poxvírus oriundo de lesão cutânea de um pombo (estirpe 589 BH). Setas: pequenos pontos brancos e hemorrágicos; Círculo: área de extenso edema.

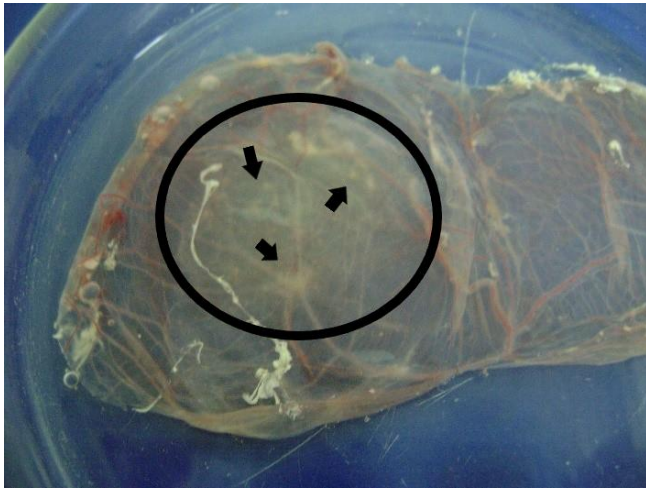


Figura 3. Membrana corioalantóide após 6 dias de inoculação de poxvírus oriundo de lesão cutânea de galinha (amostra 726 BH). Setas: lesões virais puntiformes; Círculo: área de extenso edema.

Os oligonucleotídeos iniciadores derivados do gene que codifica a proteína de núcleo 4b (*fpv167*) foram utilizados para a amplificação e sequenciamento do DNA dos isolados, tanto das lesões cutâneas e diftéricas quanto das membranas corioalantoides dos ovos embrionados inoculados. Esse *primer* é muito utilizado no diagnóstico e caracterização dos avipoxvirus de diferentes espécies de aves por se tratar de um gene muito conservado dentro da família Poxviridae, sendo capaz de gerar um produto amplificado de 578 bp para todas as amostras. A figura 4 mostra o resultado da PCR de algumas das amostras obtidas nesse trabalho.

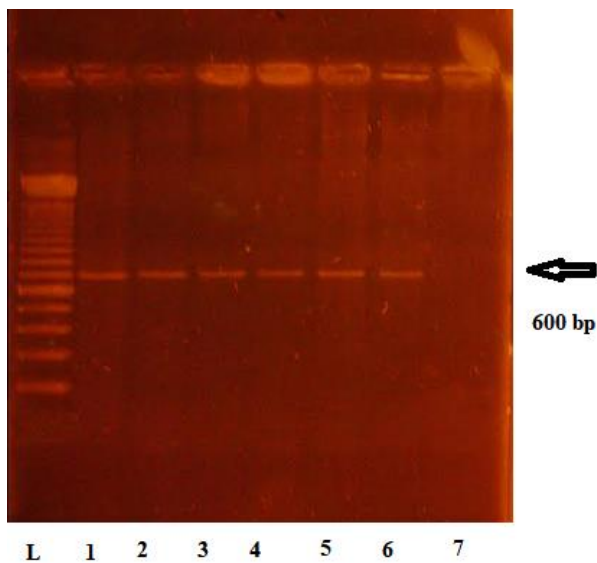


Figura 4. Eletrofese dos produtos amplificados a partir do gene 4b. L: marcador de tamanho molecular (100 bp); linha 1: controle positivo (vacina comercial (Virus pombo, amostra forte, Biovet); linha 2: estirpe 742 BH; linha 3: estirpe 561 BH; linha 4: estirpe 726 BH; linha 5: estirpe 401 BH; linha 6: estirpe 659 BH; linha 7: controle negativo; Seta: marcação de aproximadamente 600 bp (tamanho do fragmento amplificado: 578 bp).

Foi utilizada para interpretação dos resultados da reconstrução filogenética a divisão dos avipoxvírus em três grupos genéticos representados como A (fowlpox-like), B (caraypox-like) e C (estirpes de psitacídeos) seguindo a recomendação de Jarmin (2006) e Manarolla (2010).

À Tabela 2, apresentam-se as sequências extraídas do GenBank e usadas para as comparações com as estirpes caracterizadas nesse estudo.

Tabela 2. Sequências genômicas de P4b de estirpes do vírus de bouba aviária oriundas do Genbank, usadas para comparação com as estirpes caracterizadas nesse estudo.

Amostra	Acrônimo	Hospedeiro	Natureza	Origem	Número GenBank
Nobilis Variole W (Intervet)	FWPVN	Galinha/ <i>Gallus gallus domesticus</i>	Vacina comercial	Europa	AM050379.1
P78	CNPVC	<i>Pica hudsonia</i>	Lesão pulmonar	Colorado (USA)	KC018037.1
Canarypox 1445/97/33	CNPV1445	Canário/ <i>Serinus canarius</i>	Isolado clínico	Weybridge (Inglaterra)	AM050375.1
Falconpox virus	FLPV36202	Falcão/ <i>Falco peregrinus</i>	Isolado clínico	Emirados Árabes Unidos	AY530306
Peekham 19/11/75	PGPVP	Pombo/ <i>Columba livia</i>	Isolado clínico	Weybridge (Inglaterra)	AM050385
950 24/3/77	PGPV950	Pombo/ <i>Columba livia</i>	Isolado clínico	Weybridge (Inglaterra)	AM050386.1
Albatrosspox 353/87	ABPV	Albatroz-de-sobrancelha/ <i>Thalassarche melanophris</i>	Isolado clínico	Ilhas Malvinas	AM050392
Starlingpox /27	SLPV	Pardal/ <i>Passer domesticus</i>	Isolado clínico	Weybridge (Inglaterra)	AM050391.1
2/11/66	TKPV66	Peru/ <i>Meleagres gallopavo</i>	Isolado clínico	Weybridge (Inglaterra)	AM050387.1
Falconpox 1381/96	FLPV1381	Falcão/ <i>Falco peregrinus</i>	Isolado clínico	Emirados Árabes Unidos	AM050376.1
Diftosec CT (Merial)	FWPVD	Galinha/ <i>Gallus gallus domesticus</i>	Vacina comercial	Europa	AM050380.1
Duphar; (Fort Dodge)	CNPVV	Canário/ <i>Serinus canarius</i>	Vacina comercial	Europa	AM050384.1
IPVDF/LSA/2012/01	APV PVDF	Peru/ <i>Meleagres gallopavo</i>	Isolado clínico	Brasil	KM396387.1
Avipoxvirus Betim	MCPVbetim	Arara-vermelha/ <i>Ara chloropterus</i>	Isolado Clínico	Brasil	KT187552.1
P7	PGPVP7	Pombo/ <i>Columba livia</i>	Isolado clínico	Georgia (EUA)	KC017966.1
lsharqyia_PGPV	PGPV Elsharqyia	Pombo/ <i>Columba livia</i>	Isolado clínico	Egito	JQ665840.1
FLO 190	PEPV	Pinguim-de-magalhãe/ <i>Spheniscus magellanicus</i>	Isolado clínico	Santa Catarina (Brasil)	KC588956.1
P2	TKPVNV	Peru/ <i>Meleagris gallopavo</i>	Isolado clínico	Nevada (EUA)	KC017961.1
Asahikawa	ASAPV	Corvo-de-bico-grosso/ <i>Corvus macrorhynchos</i>	Isolado clínico	Asahikawa (Japão)	LC055564

Os produtos derivados da amplificação do gene *fpv167* e purificação foram sequenciados por método Sanger e suas sequências de nucleotídeos foram utilizadas para a reconstrução de árvores filogenéticas por análise Neighbor-Joining com teste de confiança em topologia (Bootstrap) com 1000 reamostragens. O vírus *Molluscum contagiosum* (MOCV) foi usado como grupo externo. A caracterização molecular por análise filogenética das dez amostras mostrou alinhamento com os grupos A e B, pode ser visualizada nas árvores filogenéticas às figuras 5 e 6.

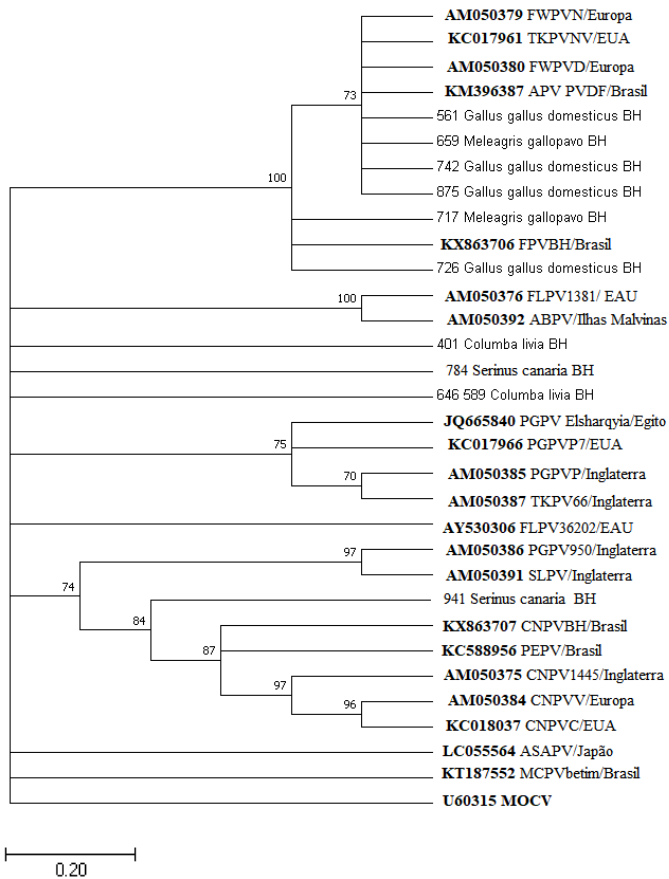


Figura 5. Árvore Filogenética reconstruída no programa MEGA 7.0 pelo método Neighbor- Joining. Dados submetidos ao teste de confiança em topologia (Boostrap) com 1000 reamostragens e o método de substituição de nucleotídeos Kimura-2 parâmetros. A aestirpes U60315 MOCV foi usada como grupo externo. As estirpes desse estudo estão mencionadas com o número de registro e final BH.

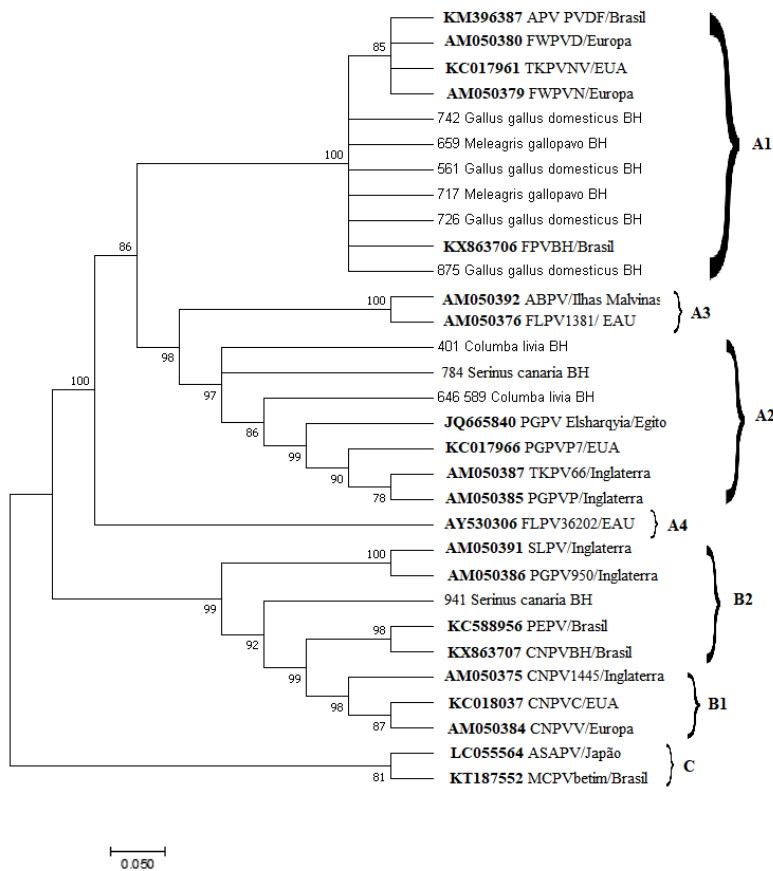


Figura 6. Árvore Filogenética reconstruída no programa MEGA 7.0 pelo método Neighbor- Joining Dados submetidos ao teste de confiança em topologia (Boostrap) com 1000 reamostragens e o método de substituição de nucleotídeos Kimura-2 parâmetros. As estirpes desse estudo estão mencionadas com o número de registro e final BH.

Das quatro estirpes oriundas de galinhas (*Gallus gallus domesticus*) usadas nesse estudo três eram provenientes de criação familiar e uma de uma granja comercial (estirpe 726) que mantinha um plantel de reprodutores. As duas estirpes de perus (*Meleagris gallopavo*) eram ambas oriundas de criações de subsistência.

Os relatos de diagnóstico de bouba aviária normalmente são feitos por meio dos sinais clínicos. O uso de métodos de reconstrução filogenética que diferenciam as estirpes é pouco relatado. O poxvírus na avicultura familiar pode produzir mortalidade em aves jovens e imunodeprimidas, sendo um problema para a produção familiar de aves que contam com pouca ou nenhuma assistência técnica, trazendo perdas econômicas aos pequenos produtores. Nesse tipo de produção muitas vezes não são usadas vacinas o que pode favorecer a perpetuação do vírus no ambiente.

No Brasil há apenas três relatos de surtos de boubá aviária com caracterização molecular das estirpes. Um em perus (Kunert-Filho *et al.*, 2016), um em psitacídeos (Esteves *et al.*, 2017) e uma em pinguins (Niemeyer *et al.*, 2013). As estirpes encontradas nesses relatos foram inseridas na árvore construída a partir das amostras desse trabalho.

As quatro estirpes de galinhas e as duas de perus se alinharam no subgrupo A1. As amostras de galinha apresentaram 99% de identidade com a estirpe oriunda de uma vacina comercial Nobilis Variole W (Intervet) utilizada na Europa (AM050379 FWPVN), com exceção da amostra 742 que teve 100% de identidade. Todas as amostras de galinha mostraram 99% de identidade com outra estirpe vacinal Diftosec CT (Merial) (AM050380). As amostras 742 e 561 mostraram, entre si, identidade de 100%.

As duas amostras de perus, 659 e 717 apresentaram identidade de 100 e 99%, respectivamente, com uma amostra isolada em Nevada (USA) no ano de 2005 (KC017961). A amostra 659 mostrou 100% de identidade com a amostra isolada em um surto em uma granja de perus no Rio Grande do Sul em 2016.

O subgrupo A1 é o que menos apresenta variação genética e as amostras tendem a ter maior identidade entre si. Essa aparente similaridade genética demonstrada entre as estirpes de perus e frangos está em concordância com outros trabalhos descritos previamente (Lüschow *et al.*, 2004; Jarmin *et al.*, 2006).

As duas amostras de pombo (*Columba livia*) 401 e 646 alinharam-se no subgrupo A2 juntamente com a amostra KC017966 isolada de pombo na Geórgia (EUA) em 1995 e com uma amostra JQ665840 também isolada de pombo no Egito em 2011.

Em trabalho realizado na Noruega em 2004 os pesquisadores caracterizaram duas estirpes de pombos que foram distintas entre si e ambas foram distintas da estirpe de referência de galinha (fowlpox). Entretanto, as galinhas inoculadas experimentalmente com essas estirpes isoladas de pombos apresentaram maiores títulos de anticorpos e mais extensas lesões, sugerindo maior patogenicidade para as estirpes de pombos nesse país (Weli *et al.*, 2004b). Tendo em vista a possibilidade de pombos serem atraídos pela disponibilidade de alimento e abrigo nas fábricas de ração, no entorno das granjas e mesmo nos galpões de criações industriais, o potencial maior risco com as estirpes de pombos deve recomendar para maior atenção e combate à presença de pombos nesses arredores.

As outras duas amostras analisadas foram isoladas de canários (*Serinus canaria*) (784, 941). Os poxvírus oriundos de canários normalmente se agrupam no grupo B. Porém a amostra 784 se agrupou no grupo A2 juntamente com as amostras isoladas de pombos. A questão de especificidade e variedade de hospedeiros que os avipoxvírus podem infectar ainda não é bem elucidada e há outros relatos de aves que se infectaram e adoeceram com estirpes não convencionais para sua espécie (Gyuranecz, *et al.* 2013). A infecção de um canário com uma estirpe pigeonpoxvírus vai de encontro às referências literárias que informam que essa espécie é resistente a estirpes de fowlpox, turkeypox e pigeonpoxvírus (Skinner, 2008; Tripathy e Reed, 2013).

As amostras 784 e as amostras de pombo do grupo A2 apresentaram 99% de similaridade. As estirpes 941 e a KX683707 CNPVBH também isolada no Brasil, se agruparam no clado B2, apresentaram 90% de identidade entre si e também 90% de identidade com a estirpe KC588956 isolada de um pinguim no Brasil em 2013.

Nenhuma das amostras analisadas nesse estudo se agrupou no clado C, caracterizado por causar infecção em Psitacídeos.

6. CONCLUSÕES

Os avipoxvirus estão presentes em plantéis brasileiros, tanto da avicultura industrial quanto a avicultura familiar. Ocorrem no Brasil estirpes pertencentes aos três grupos principais nos quais os avipoxvirus estão subdivididos. A diversidade de estirpes pode representar ameaça à conservação de espécies nativas, tanto em criatórios conservacionistas, comerciais ou aves selvagens em vida livre. Estirpes de *Avipoxvirus* de canários podem ser altamente virulentas para essa espécie e espécies hospedeiras filogeneticamente relacionadas, como as aves Passeriformes da família Fringilidae podem estar em risco. A avaliação, vigilância e prevenção de bouba aviária em criatórios comerciais de canários pode ser necessária à segurança biológica da fauna. Mais estudos de caracterização devem ser efetuados para que se elucide a etiologia das infecções causadas pelo gênero *Avipoxvirus* em seus hospedeiros.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFONSO, C. L. et al. The Genome of Fowlpox Virus. v. 74, n. 8, p. 3815–3831, 2000.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; HAFFER, A. A. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, v. 25 p. 3389-3402, 1997.
- BARRETO, C. Ocorrência e identificação de coccídeos em amostras fecais de passeriformes silvestres (Aves: Passeriformes) no Centro de Triagem de Animais Silvestres do IBAMA em Belo Horizonte / –2014.
- BOLTE, A. L.; MEURER, J.; KALETA, E. F. Avian host spectrum of avipoxviruses. *Avian pathology : journal of the W.V.P.A.*, v. 28, n. 5, p. 415–32, 1999.
- BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; et al. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 495–503, 1990. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC269651/pdf/jcm00051-0103.pdf>>. Acesso em: 16 abr. 2017.
- BULLER, R. M.; PALUMBO, G. J. Poxvirus pathogenesis. *Microbiological reviews*, v. 55, n. 1, p. 80–122, 1991.
- CANAL, C. W.; DIEL, D. G.; In: Flores, E. F. (org.) *Virologia Veterinária: virologia geral e doenças víricas*. 3ed. Santa Maria, UFSM, 2017. p. 585-620.
- ESTEVES, F., MARÍN, S. Y., RESENDE, M., SILVA, A., COELHO, H., BARBOSA, M. B...MARTINS, N. (2017). Avian Pox in Native Captive Psittacines, Brazil, 2015. *Emerging Infectious Diseases*, 23(1), 154-156.
- FELSENSTEIN J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791, 1985.
- FUKUI, D.; NAKAMURA, M.; YAMAGUCHI, T.; An epizootic of emerging novel avian pox in carrion crows (*corvus corone*) and large-billed crows (*corvus macrorhynchos*) in japan. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 52, n. 2, p. 230–241, 28 abr. 2016.
- GYURANECZ, M.; FOSTER, J. T.; DÁN, Á.; et al. Worldwide Phylogenetic Relationship of Avian Poxviruses. *Journal of Virology*, v. 87, n. 9, p. 4938–4951, 2013.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, v.41, p. 95-98, 1999.
- HALLER, S. L.; PENG, C.; MCFADDEN, G.; Poxviruses and the evolution of host range and virulence. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 21, p. 15–40, 2014.
- ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses, 2016. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>> Acesso: 12/12/2018.
- JARMIN, S.; MANVEL, R.; GOUGH, R. E. et al.; Avipoxvirus phylogenetics: Identification of a PCR length polymorphism that discriminates between the two major clades. *Journal of General Virology*, v. 87, n. 8, p. 2191–2201, 2006.

- KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120, 1980.
- KUMAR S., STECHER G., and TAMURA K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874, 2016
- KUNERT-FILHO, H. C.; CIBULSKI, S. P.; FINKLER, F. *et al.* First phylogenetic analysis of Avipoxvirus (APV) in Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 36(5):357-362, 2016.
- LANDOLT, M.; KOCAN, R.M. Transmission of avian pox from starlings to Rothchild's mynahs. *J Wildl Dis.* 12:353–356, 1976.
- LAWSON, B. LACHISH, S.; COLVILE, Katie M.; et al. Emergence of a Novel Avian Pox Disease in British Tit Species. *PLoS ONE*, v. 7, n. 11, 2012.
- LEE, L. H.; LEE, K. H. Application of the polymerase chain reaction for the diagnosis of fowl poxvirus infection. *Journal of Virological Methods*, v. 63, n. 1–2, p. 113–119, 1997.
- LÜSCHOW, D.; HOFFMANN, T.; HAFEZ, H. M.; Differentiation of Avian Poxvirus Strains on the Basis of Nucleotide Sequences of 4b Gene Fragment. *Avian Diseases*, Vol. 48, No. 3, p. 453-462, 2004.
- MITTERMEIER RA, ROBLES Gil P, MITTERMEIER CG. 1997. Megadiversity. Mexico City (Mexico): CEMEX.
- MANAROLLA, G.; PISONI, G.; SIRONI, G.; RAMPIN, T.; Molecular biological characterization of avian poxvirus strains isolated from different avian species. *Veterinary Microbiology*, v. 140, p. 1–8, 2010.
- MAPACO, L. P.; LACERDA, Z.; MONJANE, I. V.A. *et al.*; Identification of Clade E Avipoxvirus, Mozambique, 2016. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 23, No. 9, 2017.
- MERCER, A. A.; FLEMING, S. B.; UEDA, N.; F-Box-Like Domains are Present in Most Poxvirus Ankyrin Repeat Proteins. *Virus Genes*, v. 31, n. 2, p. 127–133, out. 2005.
- Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, OIE. World Organization for Animal Health, Fowlpox, Chapter 2.3.10, 2016. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.03.10_%20Viruela_aviar.pdf
Acessado em: 19/01/2018
- NIEMEYER, C.; FAVERO, C.M.; KOLESNIKOVAS, C.K. *et al.* Two different avipoxviruses associated with pox disease in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) along the Brazilian coast. *Avian Pathol.* 42(6):546-51. 2013.
- PARKER, P. G. BUCKLES, E. L.; FARRINGTON, H. et al. 110 years of Avipoxvirus in the Galapagos Islands. *PLoS ONE*, v. 6, n. 1, 2011.
- RENTAS. 1º relatório nacional sobre o tráfico de fauna silvestre. Brasília: Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres (Rentas), 2002.108p.
- RUIZ-MARTINEZ, J.; Ferraguti, M.; FIGUEROLA, J.; et al. Prevalence and Genetic Diversity of Avipoxvirus in House Sparrows in Spain. *PLoS ONE*. p. 1–13, 2016.

SANGER, F; NICKLEN, S; COULSON, A R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 74, n. 12, p. 5463–7, 1977.

SAITOU N. and NEI M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.

SKINNER, M. A., In: Jordan, F (ed.), *Poxviridae*, in *Poultry Disease*, Philadelphia, Elsevier Ltd, USA, 2008. ISBN: 978-0-7020-2862-5

SLOCOMBE, R.; MCCOWAN, C.; WANG, J.; HOLZ, P.; Avian pox in crimson rosellas (*Platycercus elegans*) in southern Australia. *Avian Pathology*, v. 42, n. 2, p. 147–150, 2013.

SONNBERG, S.; Seet, B. T.; Pawson, T.; et al. Poxvirus ankyrin repeat proteins are a unique class of F-box proteins that associate with cellular SCF1 ubiquitin ligase complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, n. 31, p. 10955–10960, 2008.

SWAYNE, D. E. (ED.). *Diseases of Poultry*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013.

THOMPSON J.D.; HIGGINS D.G; GIBSON T.J.; CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22(22):4673-4680. 1994.

TRIPATHY, D. N.; REED, W. M Pox. In: *Diseases of Poultry*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2017. p. 333–349.

TULMAN, W. M.; TRIPATHY, D. N.; REED, E. R. et al. The genome of canarypox virus. *Journal of virology*, v. 78, n. 1, p. 353–66, 1 jan. 2004.

TURNER, W. R.. K. BRANDON, T. M. BROOKS, R. COSTANZA, G. A. B. DA FONSECA, and R. PORTELA. Global conservation of biodiversity and ecosystem services. *BioScience* 57:868-873, 2007.

VILELA, D.A.R. Diagnóstico da avifauna encaminhada para os centros de triagem de animais silvestres (CETAS) do Brasil e ocorrência de clamidiose aviária no CETAS de Belo Horizonte, MG. 2012. 154f. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

VOGELSTEIN, B.; GILLESPIE, D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 615-619, 1979.

WELI, S. C.; TRAAVIK, T.; TRYLAND, M. et al. Analysis and comparison of the 4b core protein gene of avipoxviruses from wild birds : Evidence for interspecies spatial phylogenetic variation Brief Report. *Arch Virol*, p. 2035–2046, 2004.

WELI, S.C.; OKEKE, M.I.; TRYLAND, M.; et al. Characterization of avipoxviruses from wild birds in Norway. *Canadian Journal of Veterinary Research*;68(2):140-145, 2004b.

WELI S. C.; TRYLAND, M. Avipoxviruses: infection biology and their use as vaccine vectors. *Virol J.* 8:49. 2011.

ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Caracterização molecular de avipoxvirus em diferentes espécies de aves domésticas e silvestres", protocolo do CEUA: 327/2017 sob a responsabilidade de Nelson Rodrigo da Silva Martins que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 04/12/2017.

Vigência da Autorização	04/12/2017 a 03/12/2022
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Ave / Variada
Nº de animais	15
Peso/Idade	2kg / 6(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Variada

Considerações posteriores:

04/12/2017	Aprovado na reunião do dia 04/12/2017. Validade: 04/12/2017 à 03/12/2022
------------	--

Belo Horizonte, 30/01/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - ceua@prpq.ufmg.br