

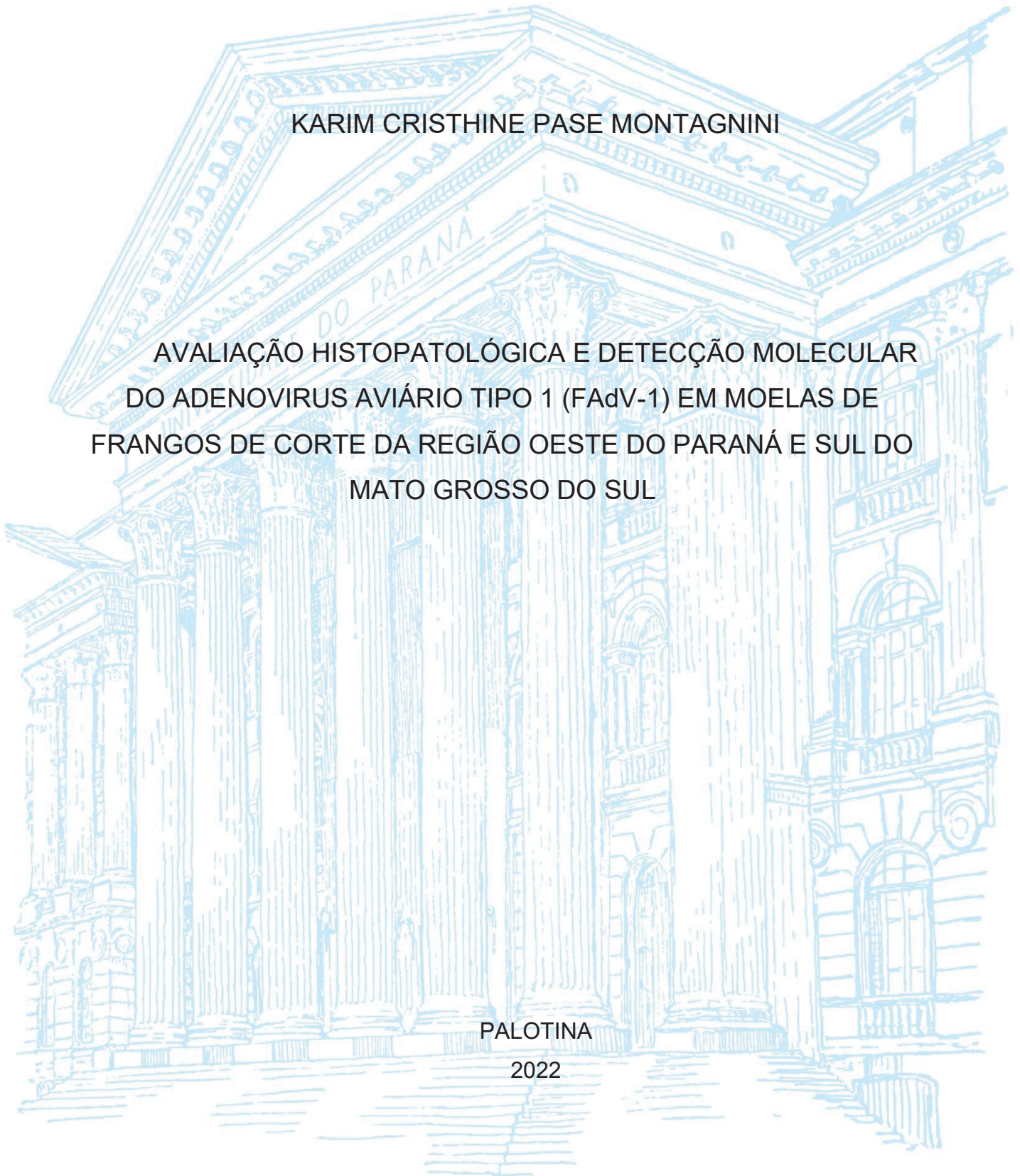
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KARIM CRISTHINE PASE MONTAGNINI

AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E DETECÇÃO MOLECULAR
DO ADENOVIRUS AVIÁRIO TIPO 1 (FAdV-1) EM MOELAS DE
FRANGOS DE CORTE DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ E SUL DO
MATO GROSSO DO SUL

PALOTINA

2022



KARIM CRISTHINE PASE MONTAGNINI

AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E DETECÇÃO MOLECULAR
DO ADENOVIRUS AVIÁRIO TIPO 1 (FAdV-1) EM MOELAS DE
FRANGOS DE CORTE DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ E SUL DO
MATO GROSSO DO SUL

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, no
Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Setor de
Palotina, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dra. Aline de Marco Viott

PALOTINA

2022

Universidade Federal do Paraná. Sistemas de Bibliotecas.
Biblioteca UFPR Palotina.

M758 Montagnini, Karim Cristhine Pase
Avaliação histopatológica e detecção molecular do adenovirus
aviário tipo 1 (fadv-1) em moelas de frangos de corte da região
Oeste do Paraná e Sul do Mato Grosso do Sul / Karim Cristhine
Pase Montagnini.– Palotina, PR, 2022.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor Palotina, PR, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.
Orientadora: Prof. Dra. Aline de Marco Viott.

1. Adenovirus. 2. Avicultura. 3. Patologia. I. Viott, Aline
de Marco. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDU 636.5



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA ANIMAL -
40001016077P6

ATA Nº109

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRA EM CIÊNCIA ANIMAL

No dia trinta e um de março de dois mil e vinte e dois às 09:00 horas, na sala virtual, via Plataforma Zoom, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação da mestranda **KARIM CRISTHINE PASE MONTAGNINI**, intitulada: **Avaliação histopatológica e detecção molecular do Adenovírus aviário tipo 1 (FAdv-1) em moelas de frangos de corte da Região oeste do Paraná e Sul do Mato Grosso do Sul**, sob orientação da Profa. Dra. **ALINE DE MARCO VIOTT**. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: **ALINE DE MARCO VIOTT (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)**, **LUCIANA KAZUE OTUTUMI (UNIVERSIDADE PARANAENSE)**, **ELISABETE TAKIUCHI (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)**. A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela **APROVAÇÃO**. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestra está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, **ALINE DE MARCO VIOTT**, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

PALOTINA, 31 de Março de 2022.

Assinatura Eletrônica

04/04/2022 11:47:34.0

ALINE DE MARCO VIOTT

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

05/04/2022 14:25:15.0

LUCIANA KAZUE OTUTUMI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE PARANAENSE)

Assinatura Eletrônica

31/03/2022 14:49:33.0

ELISABETE TAKIUCHI

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA ANIMAL -
40001016077P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **KARIM CRISTHINE PASE MONTAGNINI** intitulada: **Avaliação histopatológica e detecção molecular do Adenovirus aviário tipo 1 (FAdv-1) em moelas de frangos de corte da Região oeste do Paraná e Sul do Mato Grosso do Sul**, sob orientação da Profa. Dra. **ALINE DE MARCO VIOTT**, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 31 de Março de 2022.

Assinatura Eletrônica

04/04/2022 11:47:34.0

ALINE DE MARCO VIOTT

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

05/04/2022 14:25:15.0

LUCIANA KAZUE OTUTUMI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE PARANAENSE)

Assinatura Eletrônica

31/03/2022 14:49:33.0

ELISABETE TAKIUCHI

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

R. Pioneiro, 2153 - PALOTINA - Paraná - Brasil

CEP 85950-000 - Tel: (44) 3211-8529 - E-mail: ppgca.ufpr@gmail.com

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 170209

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 170209

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Karim Cristhine Pase Montagnini, filha de Adelmari Janete Hartmann Pase e Neuri João Pase, nasceu na cidade de Palotina, Paraná, no dia 30 de agosto de 1993.

Em abril de 2013, ingressou na Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor Palotina, no curso de Medicina Veterinária, a qual concluiu em janeiro de 2018. Em março deste mesmo ano, ingressou no Programa de Residência Multiprofissional na área de Anatomia Patológica, na Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor Palotina, sob orientação da Prof. Dra. Aline de Marco Viott, com conclusão em março de 2020.

Em abril de 2020, iniciou o curso de mestrado Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* Ciência Animal, na Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por toda sabedoria, saúde e bençãos recebidas, sempre me guiando e dando forças para superar cada obstáculo.

Aos meus pais, Neuri e Jane, por todo o apoio e estímulo para que eu sempre me aprimorasse nos estudos, sei o quanto vocês sempre fizeram das “tripas ao coração” para que eu chegasse até aqui e sou eternamente grata a vocês.

Ao meu marido, José Benedito Montagnini, por todo o apoio e compreensão nesta etapa, sempre me apoiando e auxiliando em todas as decisões. Você é sensacional e não poderia ter escolhido melhor companheiro.

A minha orientadora, Profa. Dr. Aline de Marco Viott, por todos os ensinamentos e a paciência, desde a época da residência. A senhora é uma inspiração e exemplo da frase “amor pelo que se faz”, o que torna a área de patologia animal de difícil a fascinante.

A Profa. Dr. Elisabete Takiuchi, por todo o apoio e suporte durante esta fase. A senhora foi imprescindível na realização deste projeto. Ao Prof. Dr. Nelson Luis Mello Fernandes, obrigada por todo os ensinamentos, auxílios e compreensão. Admiro-o grandemente.

A minha amiga e comadre, Ana Paula, por todo o companheirismo desde a época da graduação e pós-graduação. Você é uma pessoa incrível que a faculdade me proporcionou, aquela que a gente quer ter sempre por perto. Aplaudirei em pé as tuas conquistas, pois és merecedora.

Aos meus amigos e familiares, que me apoiaram e torceram por mim.

Aos residentes e ex-residentes do Laboratório de Patologia Veterinária, Arthur, Crisan, Juliana e Marina; colegas de pós-graduação, Carolina, Joana e Leonardo, e aos estagiários, por toda a troca de conhecimento, desabafos e auxílio para que este projeto ocorresse.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

A todos vocês, a minha eterna gratidão.

RESUMO

Objetiva-se a identificação e graduação de lesão por Adenovírus espécie A sorotipo 1 (FAdV-1) em moelas de frangos de corte oriundos da região Oeste do Paraná (PR) e Sul do Mato Grosso do Sul (MS), através das técnicas de macroscopia, microscopia, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e avaliar o uso da Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) como ferramenta de diagnóstico. Foram analisadas 56 amostras de aves com idade entre um e 45 dias de vida, com suspeitas de erosão/ulceração em moela, em decorrência do baixo desempenho apresentado. As amostras foram classificadas em três grupos, conforme a idade: 1 (uma semana), 2 (duas a três semanas) e 3 (acima de três semanas). Fragmentos de moela foram fixados em formol 10%, incluídos em parafina e cortados a 5µm em lâminas de vidro comum para serem coradas em hematoxilina-eosina (HE) e em lâminas silanizadas para a realização da FISH; também, foram coletados fragmentos para a realização da PCR, sendo estes armazenados a -20°C. Tanto na macroscopia quanto na microscopia, as lesões foram analisadas e classificadas em grau 1,2,3 e 4 conforme a lesão da membrana de coelina, presença de infiltrado inflamatório em mucosa com associação ou não de fibrose em lâmina própria, assim como a presença/ausência de corpúsculo de inclusão e o grau de marcação na FISH, o qual foi agrupado conforme a intensidade da presença do agente no tecido em discreta (até 10% do tecido), leve (11 a 30%), moderada (31 a 60%), acentuada (61 a 90%) e severa (91 a 100%). Das amostras analisadas, apenas 5,35% (3/56) apresentavam alterações macroscópicas leves a moderadas, pertencentes ao grupo 1 e 2 respectivamente; microscopicamente, 92,85% (52/56) das amostras apresentavam lesão, sendo no grupo 1 visualizadas alterações de grau 1 e 2, totalizando 9,61% (5/52) e 28,84% (15/52); no grupo 2, alterações de grau 2 totalizando 21,15% (11/52) e no grupo 3, em 7,69% (4/52) não havia qualquer alteração histológica e em 40,38% (21/52) apresentavam lesão grau 3. A presença de corpúsculo de inclusão foi visualizada em 28,84% (15/52) das amostras, com predomínio no grupo 1, totalizando 46,66% (7/15); 40% (6/15) no grupo 2 e 13,33% (2/15) no grupo 3. A marcação do FISH foi positiva em 57,14% (32/56) das amostras, sendo 40,62% (13/32) no grupo 1; 15,62% (5/32) no grupo 2 e 43,75% (14/32) no grupo 3. A marcação da FISH foi positiva em 57,14% (32/56) das amostras, sendo 40,62% (13/32) no grupo 1; 15,62% (5/32) no grupo 2 e 43,75% (14/32) no grupo 3. A marcação moderada foi a com maior predomínio, obtida em aves do grupo 1 e 3. Na PCR, 30,35% (17/56) revelaram resultados positivos, sendo 47,06% (8/17) no grupo 1; 41,18% (7/17) no grupo 2 e 11,76% (2/17) no grupo 3. Desta forma, conclui-se que as técnicas utilizadas foram eficazes para a detecção do FAdV-1, sendo a FISH uma ferramenta de diagnóstico passível a ser utilizada e a confirma-se a presença do FAdV-1 em granjas de frango de corte na região oeste do PR e Sul do MS.

Palavras-chave: adenovírus; avicultura; diagnóstico; patologia.

ABSTRACT

The objective of this study was to identify and classify Adenovirus species A serotype 1 (FAdV-1) lesions in gizzards of broilers from western Paraná (PR) and southern Mato Grosso do Sul (MS) regions, using macroscopy, microscopy and Polymerase Chain Reaction (PCR) techniques, and to test the use of Fluorescent In situ Hybridization (FISH) as a diagnostic tool. For this, samples were collected from 56 birds aged between one and 45 days with suspected gizzard erosion/ulceration, due to the low performance presented. The samples were classified into three groups, according to age: 1 (birds one week old), 2 (birds two to three weeks old) and 3 (birds three weeks old until slaughter). Gizzard fragments were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin and cut at 5µm on glass slides to be stained with hematoxylin-eosin (HE) and on silanized slides for FISH; fragments were also collected for PCR and stored at -20°C. Both macroscopically and microscopically, the lesions were analyzed and classified in grades 1,2,3 and 4 according to the coilin membrane lesion, presence of inflammatory infiltrate in mucosa with association or not of fibrosis in lamina propria, The degree of FISH staining was grouped according to the intensity of the presence of the agent in the tissue as mild (up to 10% of the tissue), light (11 to 30%), moderate (31 to 60%), severe (61 to 90%) and severe (91 to 100%). Of the samples analyzed, only 5.35% (3/56) presented mild to moderate macroscopic alterations, belonging to group 1 and 2, respectively; microscopically, 92.85% (52/56) of the samples presented lesions, with 9.61% (5/52) and 28.84% (15/52) of grade 1 and 2 alterations being seen in group 1; In group 2, grade 2 alterations totaling 21.15% (11/52) and in group 3, in 7.69% (4/52) there were no histological alterations and in 40.38% (21/52) there were grade 3 lesions. The presence of inclusion bodies was visualized in 28.84% (15/52) of the samples, with a predominance in group 1, totaling 46.66% (7/15); 40% (6/15) in group 2 and 13.33% (2/15) in group 3. FISH staining was positive in 57.14% (32/56) of the samples, 40.62% (13/32) in group 1; 15.62% (5/32) in group 2, and 43.75% (14/32) in group 3. Moderate marking was the one with the highest predominance, obtained in birds from group 1 and 3. As for PCR, 30.35% (17/56) were positive, 47.06% (8/17) in group 1, 41.18% (7/17) in group 2 and 11.76% (2/17) in group 3. Thus, we conclude that the techniques used were effective for the detection of FAdV-1, and FISH is a diagnostic tool that can be used to confirm the presence of FAdV-1 in broiler farms in the western region of PR and southern MS.

Keywords: adenovirus; diagnostic; poultry; pathology.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

- Figura 1 - Macroscopia, erosão de moela, *Gallus gallus domesticus*. Observa-se presença de áreas multifocais esbranquiçadas, medindo aproximadamente 0,4cm de diâmetro (seta preta).54
- Figura 2 - Microscopia, erosão de moela, *Gallus gallus domesticus*. Observa-se a membrana de coilina com moderada rarefação, presença de corpúsculos de inclusão intranucleares nas células do epitélio superficial da mucosa, medindo até 11µm (seta preta) e infiltrado inflamatório linfocitário e granulocítico leve em lâmina própria (cabeça de seta) (HE, 40x).....55
- Figura 3 - Fotomicrografia com marcação positiva para FAdV-1 em moela de frango de corte (*Gallus gallus domesticus*) pela técnica de FISH. (A) Marcação positiva específica para FAdV-1 em moela. (B). Contra-prova de marcação no corte-histológico apresentado em (A) (FISH, 14x).56

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 – Principais gêneros e respectivas espécies de adenovírus que acometem os animais.	18
Tabela 2 - Membros da família <i>Adenoviridae</i> que acometem aves, com seus respectivos sorotipos e cepas/isolados.	20

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Alterações macroscópicas, microscópicas, resultado da técnica de FISH e PCR para FAdV-1, obtidas dos ventrículos de 56 frangos de corte, oriundos da região Oeste do Paraná e Sul do Mato Grosso do Sul, de acordo com a idade dos animais.	53
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - Graus Célsius

µm – Micrometros

µL – Microlitros

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

ELISA – Ensaio imunoenzimático

EM – Erosão de moela

FAdV – *Aviadenovirus* / Adenovirus aviário

FISH – Hibridização fluorescente *in situ*

HCl – Ácido clorídrico

HCl – Hepatite por corpúsculo de inclusão

HE – Hematoxilina-eosina

ISH – Hibridização *in situ*

Kb - Quilobase

NV – Neutralização viral

M – Molar

mL – Mililitros

NaCl – Cloreto de sódio

ng – Nanograma

nm - Nanômetro

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PCR – RFLP – Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição

pH – Potencial hidrogeniônico

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

SHH – Síndrome hepatite-hidropericárdica

UFPR – Universidade Federal do Paraná

Tris – Tris hidroximetil aminometano

LISTA DE SÍMBOLOS

% - Porcentagem

® - Marca registrada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. CAPÍTULO I	17
2.1 Adenovirose aviária.....	17
2.2 Agente etiológico.....	18
2.3 Transmissão.....	21
2.4 Manifestações clínicas	22
2.5 Lesões anatomopatológicas.....	22
2.6 Métodos de diagnóstico.....	23
2.7 Prevenção e controle.....	26
3. REFERÊNCIAS	28
4. OBJETIVOS	34
4.1 Objetivo geral	34
4.2 Objetivos específicos.....	34
5. PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	35
6. CAPÍTULO II - DETECÇÃO DE ADENOVÍRUS AVIÁRIO TIPO 1 (FAdV-1) EM FRANGOS DE CORTE COM DEFINIÇÃO DE PADRÃO LESIONAL E CONFIRMAÇÃO ATRAVÉS DA HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE <i>IN SITU</i> (FISH) E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	36
7. CONCLUSÃO.....	57
APÊNDICE A - TAMPÃO DE HIBRIDIZAÇÃO	58
APÊNDICE B – TAMPÃO DE LAVAGEM.....	59
APÊNDICE C – PROTOCOLO FISH.....	60

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a produção brasileira de frango de corte tem se destacado dentre os demais setores produtivos (TREMEEA; SILVA, 2020). Em 2020, o Brasil foi considerado o terceiro maior produtor e maior exportador de carne de frango, alojando 55.334.975 matrizes, produzindo 13,845 milhões de toneladas de carne, onde 31% foram destinadas à exportação (ABPA, 2021). Dentre as áreas responsáveis por esse avanço, destaca-se o melhoramento genético, a nutrição, as técnicas de manejo e a sanidade, onde qualquer falha em um desses âmbitos pode afetar o desempenho das aves e, conseqüentemente, aumentar o custo de produção (PESSOA et al., 2012). Neste cenário, sabe-se que as doenças infecciosas afetam o desenvolvimento das aves e culminam com prejuízos na mortalidade, sendo que as de origem viral compreendem um dos principais causadores de deficiências imunológicas, além de predispor a infecções secundárias (HIRSCHMANN et al., 2019).

Os adenovírus são agentes infecciosos comuns tanto em aves domésticas, quanto em selvagens e dentre os gêneros que as acometem, são descritos o *Siadenovirus*, *Atadenovirus* e *Aviadenovirus* (FAdV), sendo este último dividido em 5 espécies (A-E) e 12 sorotipos, embora espécies adicionais sejam conhecidas em perus, gansos, patos e pássaros selvagens (FITZGERALD, 2020). Os FAdV são disseminados vertical e horizontalmente e distribuem-se mundialmente na indústria avícola, sendo a maioria patógenos oportunistas com infecções subclínicas (CHEN et al., 2019). No entanto, investigações recentes afirmaram o papel emergente de algumas cepas de FAdV como patógenos primários, principalmente em galinhas, como as cepas da espécie A, sorotipo 1 (FAdV-1), causando erosão em moela (EM); cepas da espécie C, sorotipo 4 (FAdV-4), causando síndrome da hepatite-hidropericárdica (SHH); além de cepas das espécies D (FAdV-D) e E (FAdV-E), causadores da hepatite por corpúsculo de inclusão (HCI) (HESS, 2020; KICHOU et al., 2020).

A EM em frangos de corte, causada pelo FAdV-1, na maioria dos casos, é uma doença infecciosa emergente com impacto negativo na produtividade da granja (MIRZAZADEH et al., 2021). Os animais afetados podem apresentar manifestações clínicas inespecíficas, como retardo no crescimento causando desuniformidade do

lote ou serem assintomáticos, sendo a lesão visualizada no abatedouro. Quando acometidos, apresentam a moela distendida, com fluido hemorrágico e múltiplas erosões na membrana de coilina (HESS, 2020).

De modo geral, o diagnóstico dos FAdV baseia-se em dados epidemiológicos, curso clínico patológico e a confirmação é feita por histopatologia, isolamento viral em cultivo celular, sendo a identificação realizada por meio do ensaio de imunofluorescência e/ou a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (KICHOU et al., 2020). Ainda, conforme Hess (2020), além da PCR e isolamento viral, a sorotipagem por neutralização viral (NV), imuno-histoquímica e hibridização *in situ* (ISH) são técnicas muito utilizadas em laboratórios. No entanto, de acordo com Borzorg-Ghalati et al. (2019), dentre as técnicas de ISH disponíveis, a mais utilizada é a hibridização fluorescente *in situ* (FISH), porém até o presente momento, não há relatos do emprego desta para detecção de FAdV em frangos de corte.

No Brasil, pesquisas recentes apontaram a presença do *Aviadenovirus* em granjas avícolas, no entanto, os relatos são escassos quando relacionados ao FAdV-1. Diante disso, objetiva-se a identificação e graduação de lesão por FAdV-1 em moelas de frango de corte através da macroscopia e microscopia, e confirmação pelos métodos Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH), avaliando este último como ferramenta de diagnóstico em aves oriundas de granjas do Oeste do Paraná e Sul do Mato Grosso do Sul.

2. CAPÍTULO I

Capítulo dedicado à revisão de literatura sobre adenovírus aviário.

2.1 Adenovirose aviária

O adenovírus aviário ou *Fowl Aviadenovirus* (FAdV) é conhecido por infectar aves na indústria avícola causando perdas significativas, além de possivelmente afetar uma ampla variedade de espécies selvagens (MCFERRAN; SMITH, 2000; CORREDOR; NAGY, 2019; FITZGERALD, 2020). Na avicultura, surtos ocasionados por FAdV estão associados à alta mortalidade e retardo no crescimento, resultando em perdas econômicas substanciais (KICHOU et al., 2020). O primeiro isolado de FAdV em aves doentes, foi proveniente de uma epidemia de doença respiratória em codornas no ano de 1950 (FITZGERALD, 2020). A partir deste ano, casos envolvendo infecções por FAdV foram relatados no mundo todo, como a HCI descrita pela primeira vez nos Estados Unidos em 1963 e a SHH relatada em 1988 no Paquistão (CORREDOR; NAGY, 2019).

Os quadros de EM eram atribuídos à gizzerosina encontrada na farinha de peixe da ração, a qual semelhante a histamina, estimula a produção de ácido e diminui o pH; no entanto, nos últimos anos, as infecções por FAdV foram as mais diagnosticadas (GJEVRE et al., 2013). O primeiro caso de EM com origem adenoviral foi relatado por Tanimura et al. (1993) no Japão, em galinhas poedeiras de 60 a 70 dias de vida, sendo caracterizado por lesões histológicas, marcação por imunohistoquímica e visualização em microscopia eletrônica. Porém, somente em 2001, Ono e colaboradores, identificaram o FAdV-1 como o agente causador da EM em frangos de corte no Japão, através do *polimorfismo de fragmentos de restrição* utilizando a *reação em cadeia da polimerase* (PCR - RFLP). Desde então, há diversos relatos por todo o mundo, tanto em galinhas poedeiras quanto em frangos e corte. Em sua maioria, o FAdV-1 foi identificado como o agente etiológico e excepcionalmente outras cepas foram diagnosticadas, como o FAdV-8a e FAdV-8b (HESS, 2020). Recentemente, no entanto, os sorotipos 2 e 3 foram envolvidos em quadros de EM em galinhas poedeiras na Índia (CHITRADEVI et al., 2020).

2.2 Agente etiológico

Os adenovírus são classificados como vírus não envelopados, icosaédricos, que medem de 70-90nm de diâmetro e possuem o genoma composto por DNA de fita dupla, que mede 26 a 54Kb, sendo classificado como tamanho médio entre os vírus DNA, com replicação no núcleo (DAVISON et al., 2003; WIGAND et al., 1982). O capsídeo do adenovírus é formado por três proteínas principais: hexon, bases pentônicas e fibra. O hexon é a principal proteína do capsídeo e desempenha um papel importante na organização do genoma, além de ter uma região relacionada à neutralização do vírus e especificidade do sorotipo (NICZYPORUK, 2018; LI et al., 2018). A proteína da fibra, por sua vez, é responsável pela ligação na célula primária e pode estar envolvida na patogenicidade, enquanto as bases pentônicas desempenham um papel importante durante a penetração e entrada do vírus na célula (CHEN et al., 2019). Essas três proteínas do capsídeo contribuem para a maioria das atividades necessárias nos estágios iniciais da infecção por adenovírus (MEDINA-KAUWE, 2013).

Quanto à classificação, conforme o Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV), a família *Adenoviridae* é dividida em cinco gêneros, de acordo com a distância filogenética, fragmentos de restrição enzimática, gama de hospedeiros suscetíveis, patogenicidade, neutralização cruzada e possibilidade de recombinação (HESS, 2020). Os gêneros são *Mastadenovirus*, *Siadenovirus*, *Atadenovirus*, *Ichtdenovirus* e *Aviadenovirus*, e infectam diversas espécies de animais domésticos e selvagens (Tabela 1).

Tabela 1 – Principais gêneros e respectivas espécies de adenovírus que acometem os animais.

Animal	Gênero	Nome da espécie
Cães	Mastadenovirus	Adenovírus canino 1 Adenovírus canino 2
Cavalos	Mastadenovirus	Adenovírus equino 1 e 2
Gado	Mastadenovirus Atadenovirus	Adenovírus bovino 1
Suíno	Mastadenovirus	Adenovirus suíno
Ovino	Mastadenovirus Atadenovirus	Adenovirus ovino
Caprino	Mastadenovirus Atadenovirus	Adenovirus caprino

Cervo	Atadenovirus	Adenovirus do cervo
Coelhos	Mastadenovirus	Adenovirus 1
Camundongos	Mastadenovirus	Adenovirus murino 1 e 2
Porquinho-da-Índia	Mastadenovirus	Adenovirus do Porquinho-da-Índia
Galinhas	Aviadenovirus	Adenovirus das aves
	Atadenovirus	
	Siadenovirus	
Perus	Aviadenovirus	Adenovirus da Turquia 1-3
	Siadenovirus	
Codorna	Aviadenovirus	Adenovirus aviário 1
Faisões	Siadenovirus	Sorologicamente indistinguível do Adenovirus tipo 3 da Turquia
Patos	Atadenovirus	Adenovirus do pato tipo 1 e 2
	Aviadenovirus	

Fonte: Adaptado de THE JOINT PATHOLOGY CENTER (JPC) (2013).

O gênero *Mastadenovirus*, compreende os adenovirus dos mamíferos, onde já foram detectados em bovinos, suínos, ovinos, caprinos, roedores, homem, entre outras espécies; o *Siadenovirus*, antigamente denominado adenovirus aviário grupo II, fazem parte os vírus causadores da enterite hemorrágica dos perus, síndrome do baço marmóreo dos faisões e da esplenomegalia das galinhas, além de acometer sapos e várias espécies de aves selvagens; o *Atadenovirus*, antigamente designado como adenovirus aviário grupo III, inclui o vírus da síndrome da queda de postura em galinhas, além de já ter sido diagnosticado em patos, bovinos, ovinos, veados, gambás e cobras; o *Ichtdenovirus* afeta peixes, em específico, o esturjão-branco; e por fim, o *Aviadenovirus* (FAdV), antigamente conhecido como adenovirus aviário do grupo I, o qual está relacionado com a HCI, síndrome do hidropericárdio, vírus da bronquite de codornas e EM, afetando galinhas, perus, patos, gansos, pombos e várias espécies de pássaros (FITZGERALD, 2020).

Nas aves, os gêneros *Siadenovirus*, *Atadenovirus* e *Aviadenovirus* são descritos (Tabela 2). O gênero FAdV integra cinco espécies de vírus diferentes (A, B, C, D e E) com vários genótipos e 12 sorotipos. Em galinhas, algumas cepas do FAdV foram identificadas como agentes patogênicos primários, como é o caso da FAdV-1 (espécie A), causando EM; algumas cepas do FAdV-4 (espécie C) desempenham papel importante na SHH e outras cepas, principalmente as das espécies D e E, causam graves danos hepáticos que levam a condição de HCI (HESS, 2020; KICHOU et al., 2020).

Tabela 2 - Membros da família *Adenoviridae* que acometem aves, com seus respectivos sorotipos e cepas/isolados.

Gênero	Sorotipos e abreviação	[Cepas/isolados]
Adenovírus aviário A	Adenovírus aviário 1 (FAdV-1)	[112, CELO, Phelps, QBV, OTE, H1, Fontes, PLA2]
Adenovírus aviário B	Adenovírus aviário 5 (FAdV-5)	[340, M2, Tipton, TR22]
	Adenovírus aviário 4 (FAdV-4)	[341, 506, Da60, H2, J2, K31, K1013, KR5]
	Adenovírus aviário 10 (FAdV-10)	[C-2B, CFA20, M11, SA2]
Adenovírus aviário C	Adenovírus aviário 2 (FAdV-2)	[685, GAL-1, H3, IDA1, P7, SR48]
	Adenovírus aviário 3 (FAdV-3)	[75, H5, SR49]
	Adenovírus aviário 9 (FAdV-9)	[93, A2]
	Adenovírus aviário 11 (FAdV-11)	[161, 380, UF71]
	Adenovírus aviário 6 (FAdV-6)	[168, CR-119, WDA6]
	Adenovírus aviário 7 (FAdV-7)	[122, X11, YR36]
Adenovírus aviário E	Adenovírus aviário 8A (FAdV-8a)	[58, T8, TR59]
	Adenovírus aviário 8B (FAdV-8b)	[764, B3, CFA3]
Adenovírus do pato tipo B	Adenovírus do pato tipo B (DAdV-2)	[GR]
Adenovírus do falcão tipo A	Adenovírus do falcão tipo A (FaAdV-1)	
Adenovírus do ganso tipo A	Adenovírus do ganso tipo A (GoAdV-1)	[P29, N1, 569]
Adenovírus do pombo	Adenovírus do pombo (PiAdV-1)	[IDA4, IDA5]
Adenovírus do peru tipo B	Adenovírus do peru tipo B (TAdV-1, TAdV-2)	[D90/2, T2]
Gênero <i>Atadenovirus</i>		
Adenovírus do pato tipo A	Adenovírus do pato tipo A (DAdV-1, vírus da síndrome da queda dos ovos)	[127, AAV-2]
Gênero <i>Siadenovirus</i>		
Adenovírus da ave de rapina tipo A	Adenovírus da ave de rapina tipo A	[RAdV-1]
Adenovírus do peru tipo A	Adenovírus do peru tipo A (TAdV-3)	[Vírus da doença do baço de mármore, vírus da esplenomegalia do adenovírus aviário, vírus da enterite hemorrágica dos perus]

Fonte: Adaptado de HESS (2020).

Todos os adenovírus são resistentes a solventes lipídicos, sódio desoxicolato, tripsina, fenol 2%, etanol 50% e variações de pH de 3 a 9. No entanto, são inativados por formol a 1:1000 (MCFERRAN; SMYTH, 2000; PEREIRA, 2011).

2.3 Transmissão

De modo geral, os FAdV compartilham características comuns quanto à sua transmissão (KICHOU et al., 2020). Estes vírus podem ser transmitidos por via horizontal e vertical, sendo esta última uma via muito importante para a infecção (MCFERRAN; SMITH, 2000). Em um estudo realizado por Grgic et al. (2006), onde coletou-se fígado, baço, rim e bolsa cloacal de pintainhos de um dia de vida, provenientes de seis lotes de matrizes geograficamente separadas em Ontário, Canadá, constatou-se a presença do DNA do FAdV em 24% das amostras submetidas à PCR, ressaltando que a transmissão vertical pode ocorrer em galinhas, além do estabelecimento da infecção latente. Segundo McFerran & Smyth (2000), após um período de excreção, o vírus pode tornar-se latente, presumivelmente devido ao desenvolvimento da imunidade local e a reativação pode ocorrer em decorrência do declínio do anticorpo materno. Os autores também afirmam que os adenovírus são frequentemente isolados em galinhas durante o pico de produção de ovos, o que garante a transmissão máxima do vírus para a próxima geração através do ovo. Tal fato consolida os achados de Grafl et al. (2012), os quais detectaram o FAdV-1 diretamente em moelas de embriões de progênies de uma granja de matrizes soropositivas, durante um surto de EM na Alemanha.

Além da transmissão vertical, a horizontal é outra via de propagação do FAdV, uma vez que o vírus está presente em todas as excreções, incluindo sêmen, fezes, mucosa traqueal e nasal (CORREDOR; NAGY, 2019). Neste cenário, as fezes destacam-se como principal via de contaminação fecal-oral, visto que o vírus permanece viável por semanas no ambiente (HESS, 2020), o que torna a transmissão por fômites uma importante fonte de disseminação (CORREDOR; NAGY, 2019). Ressalta-se que a excreção do vírus depende da cepa de FAdV envolvida e a idade das aves, onde aves mais velhas apresentaram menores titulações do adenovírus presente nas fezes e a excreção persiste por um período mais curto (HESS, 2020).

2.4 Manifestações clínicas

Os adenovírus infectam mundialmente tanto a população de aves domésticas quanto as aves selvagens. A maioria desses vírus se replicam em aves saudáveis causando pouco ou nenhum sinal aparente de infecção como patógenos primários, embora possam assumir rapidamente o papel de patógenos oportunistas concomitante a outras infecções (FITZGERALD, 2020), como em um estudo realizado em Trinidad e Tobago, conduzido por Jordan et al. (2019), onde detectou-se a presença e circulação de cepas de FAdV patogênicas (sorotipo 8a, 8b, 9 e 11) em combinação com o Vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas. De acordo com McFerran e Smyth (2002), em alguns casos de infecções subclínicas, estas podem ser atribuídas à uma baixa virulência do vírus ou pelo fato das aves ainda possuírem imunidade materna no momento da infecção.

De modo geral, os FAdV podem causar imunossupressão severa em aves infectadas, resultando em uma série de manifestações clínicas, incluindo taxa de crescimento lenta, diminuição do peso corporal, apatia e a taxa de mortalidade pode chegar a mais de 70% em granjas (JORDAN et al., 2019). Porém, geralmente as manifestações estão associadas ao genótipo e sorotipo do FAdV envolvido. No caso da EM nenhuma manifestação clínica evidente é conhecida, exceto as perdas econômicas devido ao atraso no crescimento, mortalidade e condenação de moelas em frangos de corte no abatedouro (CORREDOR; NAGY, 2019), corroborando com os estudos de infecções experimentais com FAdV-1, onde não houve manifestações clínicas ou estas foram leves, como perda de peso, depressão e anorexia (OKUDA et al., 2001; OKUDA et al., 2002; NAKAMURA et al., 2002).

Quando galinhas poedeiras foram acometidas, taxas de mortalidade elevadas, diminuição no peso de ovos e redução no desempenho da postura foram relatadas em aves de 38 semanas (MATCZUK et al., 2017).

2.5 Lesões anatomopatológicas

Tanto frangos de corte, quanto galinhas poedeiras, quando acometidas por FAdV-1 apresentam as lesões macro e microscópicas semelhantes. O quadro de erosão de moela caracteriza-se por distensão do órgão, múltiplas áreas marrons ou enegrecidas devido à erosão da camada queratinóide bem como inflamação e/ou ulceração da mucosa da moela, muitas vezes podendo ser visualizado sangue no lúmen ventricular, proventricular e intestinal e até mesmo a perfuração da moela (HESS, 2020; SCHACHNER et al., 2018). Segundo o estudo realizado por Grafl et al. (2013), ao inocularem por via oral um isolado patogênico de FAdV-1 em frangos de corte, as mudanças nas moelas foram observadas a partir dos sete dias pós infecção, onde apresentavam erosão da camada de coilina e inflamação/ulceração da mucosa da moela.

Histologicamente, pode-se visualizar infiltração de células inflamatórias, como macrófagos e linfócitos na mucosa, submucosa e/ou camada muscular de moelas afetadas; erosão e perda da camada queratinóide, bem como degeneração e necrose de células epiteliais glandulares com ou sem corpúsculos de inclusão intranucleares basofílicos (SCHACHNER et al., 2018).

Ainda, conforme Hess (2020), quadros de erosão de moela adenoviral associado a pancreatite focal já foram relatadas; microscopicamente, corpúsculos de inclusão puderam ser visualizadas em células acinares pancreáticas necróticas, além de infiltrado inflamatório presente no próprio pâncreas, fígado, vesícula biliar e ductos biliares.

2.6 Métodos de diagnóstico

Técnicas convencionais na pesquisa e diagnóstico do adenovírus aviário envolvem o isolamento viral, técnicas histológicas e microscópicas e métodos imunológicos (KAJAN, 2016).

As amostras de escolha para o isolamento do vírus são as fezes, tonsilas cecais, faringe, rins e demais órgãos afetados. A maioria dos isolados são obtidos a partir da inoculação em células primárias dos frangos, como as células embrionárias do fígado, rim ou fibroblastos, além de células do rim de pintainhos. No caso dos ovos embrionados, estes são insensíveis ao isolamento primário na maioria dos FAdV, embora o saco da gema ou membrana corioalantóide foi evidenciado em alguns

isolados de FAdV. Para a confirmação do isolamento, pode-se utilizar métodos imunológicos e moleculares, além da microscopia eletrônica ou a coloração de HE para visualizar os corpúsculos de inclusão característicos (HESS, 2020; KAJAN, 2016). Porém, conforme Latimer et al., (1997), a microscopia eletrônica é cara e não está universalmente disponível, no entanto, a localização do vírus, tamanho, morfologia e arranjo do capsídeo são muito característicos do FAdV; e quanto aos corpúsculos de inclusão, dependendo da espécie da ave envolvida, podem ser confundidas com as do herpesvírus, circovírus ou poliomavírus.

Diversas técnicas sorológicas têm sido usadas para diagnosticar infecções por FAdV em aves, as quais incluem o teste de imunodifusão em gel de ágar, teste de precipitação em gel de ágar, contraímunoeletroforese, hemaglutinação indireta, teste NV, ensaio de imunofluorescência indireta e várias modificações de ensaio imunoenzimático (ELISA) (LI et al., 2017), além da imunohistoquímica (SHADE et al., 2012). No entanto, algumas técnicas apresentam desvantagens, como por exemplo o VN, que apesar de sensível e precisa, é cara e demorada (LI et al., 2017); o teste de precipitação em gel de ágar possui baixo custo de materiais e mão de obra, em contrapartida, possui baixa sensibilidade e detecção de grupo antígeno (MCFERRAN; SMYTH, 2000) e por fim o ELISA, o qual de acordo com Pereira (2011), há dificuldade na interpretação dos resultados, visto que a presença de anticorpos anti-FAdV são comuns em galinhas saudáveis e doentes. Diante de tal situação, houve a necessidade de testes diagnósticos que possibilitem uma maior sensibilidade e especificidade para detecção do agente e com menor tempo para obtenção de resultado, como por exemplo os testes moleculares.

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), revolucionou a biologia devido à sua capacidade de amplificar exponencialmente fragmentos genômicos a partir de quantidades infinitesimais do DNA alvo (CLARK et al., 2019). O gene hexon dos adenovírus compreende as regiões conservadas (P1 e P2) e os *loops* variáveis (L1-L4) e é o principal gene alvo utilizado para a detecção molecular de FAdV por PCR (LI et al., 2017).

De acordo com Pereira et al. (2014), a PCR é uma ferramenta molecular de alta sensibilidade e especificidade na detecção do genoma FAdV, com vantagens de custo-benefício em relação aos testes diagnósticos de rotina tradicionais, porém Li et al. (2017) afirmam que ela não permite quantificar as cargas virais. Neste caso, a

nested-PCR foi considerada benéfica para aumentar a sensibilidade em comparação ao isolamento viral e a PCR em tempo real podendo quantificar (HESS, 2020).

Outra técnica utilizada para a detecção do DNA de adenovírus em amostras de tecido é a hibridização *in situ* (ISH). A ISH é uma técnica molecular onde uma sequência de ácido nucleico de interesse dentro de uma célula intacta ou uma seção de tecido é hibridizada com uma sonda marcada com digoxigenina para dar um sinal mensurável (RODRIGUEZ-MATEOS et al., 2020). A ocorrência generalizada de FAdV destaca a importância desta técnica, além da imunohistoquímica, para esclarecer etiologias, especialmente em quadros que os animais apresentam erosão de moela (HESS, 2020). Em contrapartida, esse método não é comumente utilizado devido a sua complexidade de operação e disponibilidade de métodos de diagnóstico mais convenientes e confiáveis (LI et al., 2017).

A técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) é baseada no mesmo princípio de qualquer método de hibridização de DNA que usa a capacidade do DNA de fita simples de se anelar com o DNA complementar (GARIMBERTI; TOSI, 2010). Esta técnica permite a visualização, identificação, quantificação e localização simultânea de micro-organismos *in situ*, sem a necessidade de cultivos celulares, utilizando microscópios ópticos epifluorescentes a partir de cortes histológicos (MOTER; GOBEL, 2000; NEVES; GUEDES, 2012).

A FISH detecta a sequência de ácidos nucleicos por uma sonda marcada com fluorescência que hibridiza especificamente com sua sequência alvo complementar, dentro da célula intacta. O procedimento inclui os seguintes passos: fixação da amostra, evitando a degradação do material genético alvo da técnica; preparação da amostra e pré-tratamento, que consiste nas fases de emblocamento, corte histológico e desparafinização; hibridização, onde ocorrerá o anelamento da sonda com a sequência alvo do tecido avaliado, sendo que este procedimento é realizado em uma câmara úmida escura em temperatura controlada, esta etapa pode levar de minutos a horas, dependendo da sonda utilizada; e por fim, lava-se as lâminas com o objetivo de retirar as sondas que não se ligaram ao material, desidratação e montagem das lâminas, onde a leitura deverá ocorrer em um microscópio fluorescente (MOTER; GOBEL, 2000; GRUCHOUSKEI, 2017).

Embora a sua aplicação seja rápida e barata, controles minuciosos são cruciais para garantir a qualidade dos resultados. Portanto, o desenvolvimento e avaliação da

técnica para fins de diagnóstico devem ser restritos a laboratórios tecnificados, com instalações para cultura e técnicas moleculares (MOTER; GOBEL, 2000).

Até então, a ISH tem sido aplicada para a detecção de adenovírus aviário, possuindo alta sensibilidade, conforme Latimer et al. (1997); além disso, Grafl et al. (2012), identificaram o DNA do FAdV-1 em corpúsculos de inclusão intranucleares em moelas de pintainhos que apresentavam erosão, sendo esta técnica usada adicionalmente para especificações diagnósticas. No entanto, não foi encontrado nenhum trabalho até o momento que empregou a FISH, para o diagnóstico do FAdV em frangos de corte.

2.7 Prevenção e controle

De modo geral, os adenovírus são resistentes a inativação e persistem no ambiente por um longo período. Por isso, as práticas de manejo e biossegurança são de extrema importância, no entanto, a transmissão vertical e coinfeção com outros vírus aumentam a patogenicidade (CORREDOR; NAGY, 2019). De acordo com Hess (2020), o controle necessário deve-se iniciar na reprodução primária, assim como, caso haja algum vírus associado, deve-se realizar o controle e eliminação do mesmo.

Diante disto, a vacinação é geralmente recomendada e praticada com sucesso promissor (CORREDOR; NAGY, 2019). Estudos foram realizados com o intuito de melhorar as estratégias de vacinação, onde desenvolveu-se experimentalmente vacinas de subunidades, geradas a partir de componentes recombinantes do capsídeo do vírus, utilizando proteínas estruturais e não-estruturais; neste contexto, bases pentônicas de antígenos estruturais e fibra derivadas de FAdV-4 conferiram altos níveis de anticorpos diante de um severo desafio de SHH, diferentemente de quando utilizado subunidades baseadas no hexon, as quais provocaram respostas fracas (SCHACHNER et al., 2018).

Quando relacionado ao FAdV-1, estudos realizados por Grafl et al. (2014), demonstraram a proteção completa contra EM após a vacinação viva de aves com um dia de vida, utilizando a cepa referência de FAdV-1 não patogênica (CELO).

As vacinas comerciais para o controle de infecções por FAdV são inúmeras, porém as vacinas autógenas são promessas na indústria avícola, uma vez que

melhoram a cobertura de certas cepas presentes no campo (HESS, 2020; KISS et al., 2021). Até o presente momento, sabe-se que este é um meio com alta eficácia no controle do FAdV-1.

3. REFERÊNCIAS

Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA) - **Relatório Anual ABPA 2021**. Disponível em: <http://abpa-br.org/wp-content/uploads/2021/04/ABPA_Relatorio_Anual_2021_web.pdf>. Acesso em 20/10/2021, às 16h50min.

BOZORG-GHALATI, F.; MOHAMMADPOUR, I.; RANJBARAN, R. Applications of fluorescence in situ hybridization in detection of disease biomarkers and personalized medicine. **Comparative Clinical Pathology**, v.28, p.3-10, 2019.

CHEN, L.; YIN, L.; ZHOU, Q.; PENG, P.; DU, Y.; LIU, L.; ZHANG, Y.; XUE, C.; CAO, Y. Epidemiological investigation of fowl adenovirus infections in poultry in China during 2015-2018. **BMC Veterinary Research**, v.15, p.1-7, 2019.

CHITRADEVI, S.; SUKUMAR, K.; SURESH, P.; BALASUBRAMANIAM, G.A.; KANNAN, D. Molecular typing of fowl adenovirus associated with gizzard erosion in commercial layer grower chicken in Tamil Nadu. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 90, n.7, p. 977-981, 2020.

CLARK, D.P.; PAZDERNIK, N.J.; MCGEHEE, M.R. Polymerase Chain Reaction. **Molecular Biology**. p.168-198., 2019.

CORREDOR, J.C; NAGY, E. Avian adenoviruses. In: SAMAL, S.K (ed). **Avian Virology: Current Research and Future Trends**. 1 ed. Caister Academic Press, 2019. Cap 10. p. 283-316.

DAVISON, A.J.; BENKO, M.; HARRACH, B. Genetic content and evolution of adenoviruses. **Journal of General Virology**, v. 84, n. 11, p. 2895-2908, 2003.

FITZGERALD, S.D. Aviadenovirus Infections. In: SWAYNE, D.E. (ed.). **Diseases of Poultry**. 14 ed. Wiley-blackwell, 2020. Cap 9. p. 321-322.

GARIMBERTI, E.; TOSI, S. Fluorescence in situ Hybridization (FISH), Basic Principles and Methodology. **Protocols and Applications, Methods in Molecular Biology**. Cap. 1. p. 3-20, 2010.

GJVRE, A.G.; KALDHUSDAL, M.; ERIKSEN, G.S. Gizzard erosion and ulceration syndrome in chickens and turkeys: a review of causal or predisposing factors. **Avian Pathology**, v. 42, n. 4, p. 297-303, 2013.

GRAFL, B. AIGNER, F.; LIEBHART, D.; MAREK, A.; PROKOFIEVA, I.; BACHMEIER, J.; HESS, M. Vertical transmission and clinical signs in broiler breeders and broilers experiencing adenoviral gizzard erosion. **Avian Pathology**, v. 41, n.6, p. 599-604, 2012.

GRAFL, B.; LIEBHART, D.; GÜNES, A.; WERNSDORF, P.; AIGNER, F.; BACHMEIER, J. HESS, M. Quantity of virulent fowl adenovirus serotype 1 correlates with clinical signs, macroscopical and pathohistological lesions in gizzards following experimental induction of gizzard erosion in broilers. **Veterinary Research**, v.44, n.1, p.1-8, 2013.

GRAFL, B.; PROKOFIEVA, I.; WERNSDORF, P.; STEINBORN, R.; HESS, M. Infection with an apathogenic fowl adenovirus serotype-1 strain (CELO) prevents adenoviral gizzard erosion in broilers. **Veterinary microbiology**, v.172, p.177-185, 2014.

GRGIC, H.; PHILIPPE, C.; OJKIC, D.; NAGY, E. Study of vertical transmission of fowl adenoviruses. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.70, n.3, p.230-233, 2006.

GRUCHOUSKEI, L. **Diagnóstico de *Brachyspira pilosicoli*, *Brachyspira hyodysenteriae* e *Brachyspira intermedia* em aves de postura comercial e matrizes comerciais pela técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH)**. Palotina, 30p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal. Palotina: 2017. Disponível

em: <<https://www.acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/53993/R%20-%20D%20-%20LEONARDO%20GRUCHOUSKEI.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>

HESS, M. Aviadenvirus Infections. In: SWAYNE, D.E. (ed.). **Diseases of Poultry**. 14 ed. Wiley-blackwell: 2020. Cap 9. p. 322-332.

HIRSCHMANN, L.C.; FISCHER, G.; HUBNER, S.O.; LIMA, M.; VARGAS, G.A. Fatores de risco associados com a presença de infecções virais em aves domésticas na região Sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.47. p. 1-9, 2019.

JORDAN, B.A.; BLAKE, L.; BISNATH, J.; RAMGATTIE, C.; CARRINGTON, C.V. OURA, C.A.L. Identification of four serotypes of fowl adenovirus in clinically affected commercial poultry co-infected with Chicken Infectious Anemia Virus in Trinidad & Tobago. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.66, p. 1341-1348, 2019.

KAJAN, G.L. Poultry Adenoviruses. In: LIU, D. (ed.). **Molecular detection of animal viral pathogenesis**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2016. Cap 83. p. 735-745.

KICHOU, F.; ZRO, K.; MOUAHID, M.; BERRADA, J. Emerging and Reemerging Fowl Aviadenvirus Infections. In: ENNAJI, M. M. (ed). **Emerging and Reemerging Viral Pathogens**. Academic Press: 2020, vol.1. Cap 35. p. 781-803.

KISS, I.; HOMONNAY, Z.G.; MATÓ, T.; BÁNYAI, K.; PALYA, V. Research note: an overview on distribution of fowl adenoviruses. **Poultry science**, v.100, p.1-5. 2021.

LATIMER, K.S.; NIAGRO, F.D.; WILLIAMS, O.C.; RAMIS, A.; GOODWIN, M.A.; RITCHIE, B.W.; CAMPAGNOLI, R.P. Diagnosis of avian adenovirus infections using DNA in situ hybridization. **Avian Diseases**, v.41, p. 773-782, 1997.

LI, P.H.; ZHENG, P.P.; ZHANG, T.F.; WEN, G.Y.; SHAO, H.B.; LUO, Q.P.; Fowl adenovirus serotype 4: Epidemiology, pathogenesis, diagnostic detection, and vaccine strategies. **Poultry Science**, v. 96, p. 2630-2640, 2017.

LI, L.; WANG, J.; CHEN, P.; ZHANG, S.; SUN, J.; YUAN, W. Pathogenicity and molecular characterization of a fowl adenovirus 4 isolated from chicken associated with IBH and HPS in China. **BMC Veterinary Research**, v.14, n.1, p.1-8, 2018.

MATCZUK, A.K.; NICZKYPORUK, J.S.; KUCZKOWSKI, M.; WOŹNIAKOWSKI, G.; NOWAK, M.; WIELICZKO, A. Whole genome sequencing of Fowl Aviadenovirus A – a causative agent of gizzard erosion and ulceration, in adult laying hens. **Infection, Genetics and Evolution**. v. 48, p. 47-53, 2017.

MEDINA-KAUWE, L.K. Development of adenovirus capsid proteins for targeted therapeutic delivery. **Therapeutic Delivery**, v.4, n.2., p. 267-277, 2013.

MIRZAZADEH, A.; GRAFL, B.; ABBASNIA, M.; EMADI-JAMALI, S.; ABDI-HACHESOO, B.; SCHACHNER, A.; HESS, M. Reduced performance due to adenoviral gizzard erosion in 16-day-old commercial broiler chickens in Iran, confirmed experimentally. **Frontiers in Veterinary Science**, v.8, p. 1-8, 2021.

MOTER, A.; GÖBEL, U.B. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**. v. 41, p. 85-112, 2000.

MCFERRAN, J.B.; SMYTH, J.A. Avian adenoviruses. **Revue Scientifique et Technique**, v.19, n.2, p. 589-601, 2000.

NAKAMURA, K.; OHYAMA, T.; YAMADA, M.; ABE, T.; TANAKA, H.; MASE, M. Experimental gizzard erosions in specific-pathogen-free chicks by serotype 1 group I avian adenoviruses from broilers. **Avian Diseases**, v.46, n.4, p.893-900, 2002.

NEVES, S. M. N.; GUEDES, R. M. C. Hibridização in situ fluorescente: princípios básicos e perspectivas para o diagnóstico de doenças infecciosas em medicina veterinária. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 79, n. 4, p.627-632, 2012.

NICZYPORUK, J.S. Adenoviruses and Their Diversity in Poultry. **Application of Genetics and Genomics in Poultry Science**. Cap 7. 2018.

OKUDA, Y.; ONO, M.; YAZAWA, S.; SHIBATA, I.; SATO, S. Experimental infection of specific-pathogen-free chickens with serotype-1 fowl adenovirus isolated from a broiler chicken with gizzard erosions. **Avian Diseases**, v.45, n.1, p.19-25, 2001.

OKUDA, Y.; ONO, M.; YAZAWA, S.; IMAI, Y.; SHIBATA, I.; SATO, S. Pathogenicity of serotype 1 fowl adenovirus in commercial broiler chickens. **Avian Diseases**, v.45, n.4, p. 819-827, 2002.

ONO, M.; OKUDA, Y.; YAZAWA, S.; SHIBATA, I.; TANIMURA, N.; KIMURA, K.; HARITANI, M.; MASE, M.; SATO S. Epizootic outbreaks of gizzard erosion associated with adenovirus infection in chickens. **Avian Diseases**, v.45, p. 268-275, 2001.

PEREIRA, C.G. **Adenovírus na avicultura industrial, familiar e vacinas comerciais em Minas Gerais: detecção por reação em cadeia pela polimerase e avaliação histopatológica de fígados**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, 2011.

PEREIRA, C.G.; MARIN, S.Y.; SANTOS, B.M.; RESENDE, J.S.; RESENDE, M.; GOMES, A.M.; MARTINS, N.R.S. Occurrence of *Aviadenovirus* in chickens from the poultry industry of Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, n.3, p. 801-808, 2014.

PESSOA, G.B.S.; TAVERNARI, F.C.; VIEIRA, R.A.; ALBINO, L.F.T. Novos conceitos em nutrição de aves. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.13, n.3, p.755-774, 2012.

RODRIGUEZ-MATEOS, P.; AZEVEDO, N.F; ALMEIDA, C.; PAMME, N. FISH and chips: a review of microfluidic platforms for FISH analysis. **Medical Microbiology and Immunology**, v.209, p.373-391, 2020.

SCHACHNER, A.; MATOS, M.; GRAFL, B.; HESS, M. Fowl adenovirus-induced diseases and strategies for their control – a review on the current global situation. **Avian Pathology**, v. 47, n.2, p.111-126, 2018.

SHADE, B.; SCHMITT, F.; BOHM, B.; ALEX, M.; FUX, R.; CATTOLI, G.; TERREGINO, C.; MONNE, I.; CURRIE, R.J.W.; OLIAS, P. Adenoviral Gizzard Erosion in Broiler Chickens in Germany. **Avian diseases**, v.57, p.159-163, 2013.

TANIMURA, N.; NAKAMURA, K.; IMAI, K.; MAEDA, M.; GOBO, T.; NITTA, S.; ISHIHARA, T.; AMANO, H. Necrotizing pancreatitis and gizzard erosion associated with Adenovirus infection in chickens. **Avian Diseases**, v.37, p.606-611, 1993.

THE JOINT PATHOLOGY CENTER (JPC). Conferência 16. 2013. Disponível em: <https://www.askjpc.org/wsco/wsc_showcase2.php?id=VzdmOUZOeFZ2a1FaVTBGUjcxRE16Zz09> Acesso em 20/03/2022 às 18h00min.

TREMEA, F.T.; SILVA, A.C. O setor avícola no Brasil e sua distribuição mundial. **Economia & Região**, v.8, n.1, p. 183-200, 2020.

WIGAND, R.; BARTHA, A.; DREIZIN, R.S.; ESCHE, H.; GINSBERG, H.S; GREEN, M.; HIERHOLZER, J.C.; KALTER, S.S; MCFERRAN, J.B.; PETTERSON, U.; RUSSEL, W.C.; WADELL, G. Adenoviridae: Second Report. **Intervirolgy**, v.18, p. 169-176, 1982.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Objetiva-se identificar a presença do FAdV-1 em granjas de frango de corte no Oeste do Paraná e Sul do Mato grosso do Sul.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliação e graduação macro e microscópica em moelas lesionadas por FAdV-1;
- Confirmação do agente viral através da PCR com material genético extraído diretamente do tecido;
- Testar o uso da FISH como método de diagnóstico na identificação do FAdV-1.

5. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Este trabalho será apresentado sob forma de capítulo, sendo representado na forma de artigo científico, o qual será submetido a revista *Avian Diseases* seguindo suas normas, assim definido:

Capítulo II: Detecção de adenovírus aviário tipo 1 (FAdV-1) em frangos de corte com definição de padrão lesional e confirmação através da Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)".

6. CAPÍTULO II - DETECÇÃO DE ADENOVÍRUS AVIÁRIO TIPO 1 (FAdV-1) EM FRANGOS DE CORTE COM DEFINIÇÃO DE PADRÃO LESIONAL E CONFIRMAÇÃO ATRAVÉS DA HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU* (FISH) E REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

**DETECÇÃO DE ADENOVÍRUS AVIÁRIO TIPO 1 (FAdV-1) EM FRANGOS DE
CORTE COM DEFINIÇÃO DE PADRÃO LESIONAL E CONFIRMAÇÃO
ATRAVÉS DA HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU* (FISH) E REACÇÃO EM
CADEIA DA POLIMERASE (PCR)**

Karim Cristhine Pase Montagnini^a, Juliana das Chagas Goulart^a, Arthur Colombari Cheng^a, Carolina Fontana^a, Ana Paula Molinari Candeias^b, Leonardo Gruchouskei^a, Pietra Malu Franzener Detoni^a, Bianca Barroti^a, Amália Ferronato^a, Elisabete Takiuchi^b, Aline de Marco Viott^{a,c}

- a. Laboratório de Patologia Veterinária, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor Palotina, Rua Pioneiro, 2153, Jardim Dallas, 85950-000, Palotina, Paraná, Brasil.
- b. Laboratório de Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor Palotina, Rua Pioneiro, 2153, Jardim Dallas, 85950-000, Palotina, Paraná, Brasil.
- c. Autor correspondente. Laboratório de Patologia Veterinária, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor Palotina, Rua Pioneiro, 2153, Jardim Dallas, 85950-000, Palotina, Paraná, Brasil. E-mail: alinedemarco@yahoo.com.br

Diagnóstico de FAdV-1 em moelas de galinhas no Brasil

Resumo

Erosões de moela com origem adenoviral têm sido diagnosticadas mundialmente, acometendo tanto aves de criação quanto aves selvagens. O presente estudo tem por objetivo identificar e graduar a lesão no ventrículo causada por FAdV-1 em aves com diferentes faixas etárias, em granjas de frango de corte no Oeste do Paraná e Sul do Mato Grosso do Sul, Brasil, assim como validar a técnica de Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) como ferramenta de diagnóstico. Para isso, coletou-se 56 amostras de aves de um a 45 dias de vida, com baixo desempenho e suspeita de erosão/ulceração em moela. As amostras foram analisadas macroscopicamente,

microscopicamente e a confirmação do agente se deu através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e FISH. Das amostras analisadas, 92,85% apresentavam alterações microscópicas caracterizadas por ventriculite linfocitária e granulocítica, além da fragmentação/erosão da membrana de coelina, 57,14% obtiveram marcação positiva na FISH para o FAdV-1 e 30,35% foram positivas na PCR. Lesões agudas foram observadas em aves na primeira e segunda semana de vida e a cronicidade da lesão em aves a partir da terceira semana. Visto que, o FAdV-1 encontra-se difundido mundialmente, novas técnicas para detecção deste agente devem ser aperfeiçoadas. Desta forma, confirma-se a eficácia da técnica de FISH como método de diagnóstico para o FAdV-1, assim como foi possível identificar e graduar das lesões em moelas em diferentes idades de frangos de corte no Brasil.

Palavras-chave: Adenovírus aviário, diagnóstico, erosão de moela, frango de corte, histopatologia, molecular.

Abreviações: CELO = Vírus de Órgão Letal de Embrião de Galinha; DNA = Ácido Desoxirribonucleico; FAdV= Adenovírus aviário; FISH = Hibridização Fluorescente *in situ*; HE = Hematoxilina-eosina; HPLC = Cromatografia Líquida de Alta Performance; NaCl = Cloreto de sódio; PCR = Reação em Cadeia da Polimerase; VPL = Laboratório de Patologia Veterinária

Introdução

Os adenovírus aviários (FAdV) pertencem ao gênero *Aviadenovirus* da família *Adenoviridae*, os quais são divididos em cinco espécies (A, B, C, D, E) com vários genótipos e 12 sorotipos, e afetam diversas aves domésticas e selvagens por todo o mundo (Fitzgerald, 2020; Hess, 2020). A transmissão do FAdV pode ocorrer tanto vertical quanto horizontalmente e geralmente causam infecções subclínicas, sendo considerados patógenos oportunistas (Chen et al. 2020). No entanto, na indústria avícola algumas espécies de FAdV foram identificadas como agentes

primários, como o FAdV-1 (espécie A) causando erosão de ventrículo; algumas cepas de FAdV-4 (espécie C) causando a síndrome hepatite-pericárdica e cepas das espécies D e E causando a hepatite por corpúsculo de inclusão (Hess, 2020). Para a detecção do vírus, rotineiramente é utilizado uma combinação do isolamento viral e histopatologia, por vezes, associada à microscopia eletrônica e/ou reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Ojkic et al., 2008), e ainda, a sorotipagem por neutralização do vírus, imuno-histoquímica e hibridização *in situ* (ISH) são utilizados por muitos laboratórios (Fitzgerald, 2020). No entanto, a hibridização fluorescente *in situ* (FISH), a qual detecta a sequência de ácidos nucleicos a partir de uma sonda marcada com fluorescência que hibridiza especificamente com a sequência alvo complementar dentro da célula intacta (Moter e Gobel, 2000) ainda não foi relatada na medicina veterinária como método de diagnóstico para os FAdV.

O primeiro caso de erosão de ventrículo com origem adenoviral, foi descrita por Tanimura et al. (1993), onde foi observada a presença de corpúsculo de inclusão nas células epiteliais da mucosa. Porém, somente anos após, Ono et al. (2001) isolaram e identificaram o FAdV-1 como agente causador da condenação de moelas em abatedouros no Japão. Desde então, surtos de infecção natural em galinhas por FAdV-1 estão ocorrendo mundialmente, como na Polônia (Domanska-Blicharz et al., 2011), na Coreia (Lim et al., 2012), na Hungria (Kecskeméti et al., 2012), na Alemanha (Schade et al., 2013), Bélgica (Garmyn, et al. 2013) e no Irã (Mirzazadeh et al., 2019). Quando acometidas, as granjas de frango de corte relataram perdas econômicas significativas em decorrência do retardo do crescimento, maior taxa de mortalidade e condenações de moelas em abatedouros, assim como em galinhas poedeiras, onde além da alta mortalidade, há um impacto direto na saúde e na produção animal (Schachner et al., 2018).

No Brasil, alguns autores já identificaram a presença do FAdV em galinhas domésticas. No Estado de São Paulo, Mettifogo et al. (2014), descreveram o primeiro relato da Síndrome Hepatite-Pericárdica em lotes comerciais de uma granja; em Minas Gerais, Pereira et al. (2014)

descreveram a ocorrência do agente no Estado, tanto no âmbito da avicultura industrial quanto no familiar e constataram alta disseminação em ambas. Em um estudo recente, De La Torre et al. (2018), detectaram as sequências moleculares do FAdV caracterizando os sorotipos do vírus que afetam as granjas comerciais no Brasil, obtendo como resultado os agentes FAdV-8a, FAdV-8b e FAdV-11. No entanto, os dados quanto a presença do FAdV-1 causando erosão de moela no Brasil são escassos, principalmente na região Sul, onde a avicultura é expressiva.

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi investigar os achados patológicos do FAdV-1 em ventrículos com suspeita de erosão/ulceração devido ao baixo desempenho de frangos de corte de diferentes faixas etárias, oriundos da região Sul e Centro-Oeste do Brasil, através da graduação de lesões macroscópicas e microscópicas e confirmação do agente pela PCR, além de validar o uso da técnica de FISH como ferramenta de diagnóstico, visto a necessidade do aprimoramento de métodos de diagnóstico.

Material e métodos

Amostras. Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética de Uso de Animais do Setor Palotina da Universidade Federal do Paraná (UFPR), sob protocolo CEUA/Palotina 04/2020. Foram avaliados 56 ventrículos de frangos de corte (*Gallus gallus domesticus*), em aves com baixo desempenho, com um a 45 dias de vida. As aves foram agrupadas conforme a idade em grupo 1 (uma semana de vida), grupo 2 (duas a três semanas) e grupo 3 (três semanas até o abate). Os animais de diferentes lotes e aviários, localizados na região Oeste do Paraná e Sul do Mato Grosso do Sul, eram provenientes de locais com medidas de biossegurança adequadas e bons índices zootécnicos.

Macroscopia. As amostras foram classificadas e pontuadas de acordo com o grau de lesão da membrana de coilina, conforme descrito por Nakamura et al. (2002), em: grau 0 (ausência de lesões), grau 1 (lesões leves: menos de um terço da membrana de coilina/mucosa afetada), grau

2 (lesões moderadas: de um terço a metade da membrana de coilina/mucosa afetada) e grau 3 (lesões severas: mais da metade da membrana de coilina/mucosa afetada).

Técnica histológica. Após a coleta e fixação, as amostras foram clivadas, armazenadas em cassetes histológicos e submetidas a banhos em diferentes concentrações de álcool e xilol, conforme Luna (1968). Em seguida, o material foi incluído em parafina e os blocos submetidos a cortes histológicos de 5 micras (μm) em micrótomo Leica® modelo Rm2245. As lâminas foram montadas de maneira usual e coradas em hematoxilina e eosina (HE), para avaliação sob microscópio de luz.

Avaliação microscópica. Realizou-se a avaliação das lesões em ventrículo, que possam sugerir a presença do agente. Neste contexto, as alterações foram classificadas em grau 0 (sem alterações histológicas), 1 (rarefação da membrana de coilina com debris celulares), grau 2 (rarefação da membrana de coilina com presença de infiltrado inflamatório linfocitário e granulocítico em lâmina própria) e grau 3 (rarefação/ulceração da membrana de coilina com debris celulares, associado a presença de infiltrado inflamatório linfocitário e granulocítico, além de fibrose em lâmina própria). A presença ou não de corpúsculo de inclusão nas células do epitélio superficial da mucosa foram considerados.

Sonda. Foi usado uma sonda sintetizada comercialmente (Invitrogen®) baseada no trabalho de Grafl et al. (2012), os quais utilizam originalmente na ISH, o gene de fibra longa FAdV-1 (5 - CGGGGTCGCAGCAGCTGCAGCTCGCGAGCGGAGAACTCG-3). A sonda foi marcada com o fluorocromo Alexa Fluor 555 (Thermo Fisher®) e purificada pela técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

Técnica de FISH. Foi realizada a técnica de FISH em todos os fragmentos de moela das aves que apresentaram lesões macro e microscópicas sugestivas de FAdV-1. Para tal, cortes histológicos de 5 μm foram realizados em lâminas silanizadas e desparafinizados em dupla

bateria de xilol (10 minutos cada), reidratadas na bateria de álcool absoluto, álcool 90%, 80% e 70% (5 minutos em cada) e por fim, 5 minutos em água destilada. Após secas em temperatura ambiente, as lâminas histológicas foram posicionadas na bandeja de incubação de imunohistoquímica. Para a diluição da sonda, foi necessário 495µL do tampão de hibridização (100 mM Tris, pH 7,2, 0,9 M NaCl, 0,1% de dodecil sulfato de sódio), utilizando pipetas RNase e DNase *free*, condicionados em um microtubos de 1,5mL e adicionados 5µL de sonda, contendo 2ng por µL na concentração final. Posteriormente, 100µL desta solução foi alocada em cada lâmina, as quais foram incubadas a 45°C *overnight*. Após este período, as lâminas foram triplamente lavadas, com tampão de hibridização e solução de lavagem (100 mM Tris, pH 7,2, 0,9 M NaCl), ambas pré-aquecidas a 45°C. A etapa final, consistiu na montagem da lâmina utilizando um meio de montagem próprio para a microscopia de fluorescência (PorLong Diamond Antifade Mountant, Thermo Fisher®), e imediatamente realizada a leitura em microscópio de fluorescência (Olympus, FSX 100, Japão) em filtro adequado para o fluorocromo (460-495nm), em aumento de 40x a 60x. As lâminas positivas no FISH foram classificadas conforme a intensidade da presença do agente no tecido em discreta (até 10% do tecido), leve (de 11 a 30%), moderada (de 31 a 60%), acentuada (de 61 a 90%) e severa (de 91 a 100%).

PCR. Como controle negativo das reações, foi utilizado água ultrapura autoclavada e como controle positivo, foi utilizada uma vacina autógena gentilmente cedida pelo Laboratório INATA, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. O protótipo de referência de FAdV utilizado é o subtipo I, sorotipo CELO. O DNA viral foi extraído usando o kit Nucleospin® Tissue (Macherey-Nagel, Alemanha), conforme instruções do fabricante. Para a realização da PCR, foram utilizados os *primers* FAdV-1A (*sense primer*) 5'TTCGAGATCAAGAGGCCAAGT3' e FAdV-1B (*antisense primer*) 5'GGTCGAAGTTGCGTAGGAAG3' com fragmento esperado de 178pb (Niczyporuk et al., 2010). As reações foram realizadas com um volume final de 25µL,

contendo 3,75µL de Buffer 10x, 1µL de MgCl₂, 2µL de dNTP 1x, 1µL de cada *primer*, 0,4µL de Taq Polimerase (Platinum[®] Taq DNA Polymerase – Invitrogen), 11,85µL de água ultrapura autoclavada e 4µL do DNA genômico. As amostras foram submetidas as seguintes condições: desnaturação inicial ocorreu a 95°C por 2 minutos, a desnaturação a 94°C por 1 minuto, o anelamento dos *primers* a 58°C por 1 minuto, extensão da cadeia a 72°C por 2 minutos e a extensão final a 72°C por 7 minutos. No total, 50 ciclos de replicação foram realizados no termociclador MyGenie96 Thermal Block (Bioneer, Korea). Para visualização, as amostras amplificadas foram submetidas em eletroforese em gel de agarose 2%, em tampão TBE pH 8,4 (Tris 89mM; ácido bórico 89mM; EDTA 2mM) á 150V e 80mA. Posteriormente, corou-se com brometo de etídio (0,5mg/mL) e visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta.

Resultados

Macroscopia. As lesões observadas na membrana de coilina, sugestivas de FAdV-1, foram observadas em apenas 3 moelas, totalizando 5,35% (3/56), sendo 2/3 pertencente ao grupo 1, ambas classificadas como grau 1 e apenas 1/3 pertencente ao grupo 2, com classificação em grau 2 (Tabela 1). Tais lesões caracterizam-se por áreas focais a multifocais, esbranquiçadas, medindo aproximadamente 0,4cm de diâmetro, semelhante a descolamento da membrana de coilina (Figura 1).

Microscopia. As alterações histológicas foram observadas em 92,85% (52/56) das amostras, sendo que em 9,61 % (5/52) havia apenas rarefação membrana de coilina (grau 1), sem a presença de corpúsculos de inclusão intranucleares; em 50% (26/52) apresentavam infiltrado inflamatório linfocitário e granulocítico em lâmina própria, além da rarefação da membrana de coilina (grau 2) e ainda, em 50% (13/26) havia a presença de corpúsculos de inclusão intranucleares; e por fim, em 40,38% (21/52) apresentavam rarefação/ulceração da membrana de coilina, presença de infiltrado inflamatório linfocitário e granulocítico e fibrose associada (grau 3), sendo possível visualizar em 9,52% (2/21) a presença de corpúsculos

de inclusão intranucleares. Quando presentes, os corpúsculos eram basofílicos, localizavam-se no núcleo das células do epitélio superficial da mucosa, mediam aproximadamente 11µm e não ultrapassavam a quantia de 1 a 6 por campo de grande aumento (Figura 2). A ausência de lesões foi observada em 7,14% (4/56) das amostras, todas pertencentes ao grupo 3. A classificação histopatológica de acordo com o grau, assim como a presença ou ausência do corpúsculo de inclusão referente a cada grupo, encontra-se detalhada na Tabela 1.

FISH. Do total de 56 ventrículos avaliados pela técnica de FISH, 57,14% (32/56) foram positivas para FAdV-1, sendo possível identificar no núcleo das células do epitélio superficial da mucosa, um sinal brilhante, forte e com formato ovalado, que desapareciam a troca de filtro de luz (Figura 3). Das 32 lâminas positivas, 40,62% (13/32) foram no grupo 1; 15,62% (5/32) no grupo 2 e 43,75% (14/32) no grupo 3. Os resultados de cada grupo encontram-se na tabela 1. Das 24 amostras negativas no FISH, apenas 4,17% (1/24) pertencente ao grupo 3, não havia qualquer alteração histológica; 8,33% (2/24), ambas pertencentes ao grupo 1, apresentavam lesão histológica classificada como grau 1; 45,83% (11/24) apresentavam lesão histológica classificada como grau 2, sendo 45,45% (5/11) pertencente ao grupo 1 e 54,54% (6/11) pertencente ao grupo 2 e 41,67% (10/24) apresentavam lesão histológica classificada como grau 3, sendo que todas as amostras pertenciam ao grupo 3.

PCR. Do total de ventrículos avaliados, 30,35% (17/56) obtiveram amplificação para FAdV-1, sendo 47,06% (8/17) pertencente ao grupo 1; 41,18% (7/17) ao grupo 2; 11,76% (2/17) ao grupo 3, conforme demonstrado na tabela 1.

Ao comparar os resultados das técnicas de PCR e FISH, houve concordância em 39,28 % (22/56) dos casos, onde em ambas o resultado foi positivo ou negativo, sendo 40,90% (9/22) pertencente ao grupo 1; 18,18% (4/22) ao grupo 2 e 40,9% (9/22) ao grupo 3. No entanto, houve divergência em 60,71% (34/56) dos casos, onde a amostra obteve resultado positivo em apenas

uma técnica, sendo 32,35% (11/34) pertencente ao grupo 1; 20,59% (7/34) ao grupo 2 e 47,06% (16/34) ao grupo 3.

Discussão

As alterações macroscópicas observadas, tanto nas aves infectadas experimentalmente com FAdV-1 quanto naquelas com infecção natural, são semelhantes. Na Itália, Manarolla et al. (2009) avaliaram 35 ventrículos de aves com idade de 42 a 63 dias de vida, obtidos ao longo 11 anos de 12 diferentes surtos ocorridos e constataram áreas de erosões que variavam em tamanho e caracterizavam-se por uma coloração amarronzada a enegrecida. Na Bélgica, Garmyn et al. (2013) diagnosticaram a presença do FAdV-1 em duas fazendas distintas de frangos de corte, causando erosão na membrana de coilina em aves de 27 e 35 dias, onde houve lesão em 60% (6/10) e 80% (8/10) dos ventrículos analisados, respectivamente. No presente estudo, observou-se poucos ventrículos de aves com uma a três semanas de vida com descoloração e descolamento da membrana de coilina. Nas demais aves não havia qualquer alteração macroscópica, no entanto apresentavam lesões histológicas. Tais dados podem estar relacionados a baixa carga viral no tecido, uma vez que Grafl et al. (2013) detectaram experimentalmente a carga viral máxima no ventrículo coincidindo com o aparecimento das lesões macro e microscópicas acentuadas, com declínio das lesões em idades mais avançadas. Ressaltamos a importância da avaliação histológica nestes casos, associada a outras ferramentas de diagnóstico, visto que apenas a avaliação macroscópica pode ser inconclusiva para o diagnóstico de FAdV-1 como visto no presente caso. Além de que outros fatores podem estar relacionados a erosão de ventrículo, como os congênitos, estrutura da fibra ingerida, deficiências nutricionais, substâncias tóxicas e colonização microbiana (Gjvre et al., 2013).

As alterações na histologia do ventrículo quando acometidos por FAdV-1 foram relatadas por Tanimura et al. (1993), Abe et al. (2001), Schade et al. (2013) e Matzcuk et al. (2017). De acordo com os autores, há a presença de necrose da membrana de coilina, infiltrado inflamatório

histiolinfocitário em lâmina própria, submucosa e/ou muscular e por vezes, presença de corpúsculo de inclusão intranuclear em células epiteliais glandulares. Tais achados corroboram com as alterações encontradas no presente estudo. As lesões classificadas como grau 1, onde apenas a membrana de coilina apresenta alterações, foram visualizadas apenas em aves do grupo 1, no entanto dentro do mesmo grupo havia ventrículos com alteração grau 2 com presença de infiltrado em lâmina própria, neste caso, acredita-se que fatores ambientais como o estresse ou qualidade da ração possam ter contribuído para a gravidade do quadro nestas aves. Independentemente do grupo de aves, quando presente, o infiltrado inflamatório limitava-se em lâmina própria e raramente acometia submucosa e muscular, assim como a presença de corpúsculos de inclusão, os quais mostravam-se em baixa quantidade, fato este que condiz com os achados de Ono et al. (2003) e Mirzazadeh et al. (2021), onde havia poucos ou nenhum corpúsculo de inclusão em surtos naturais. Quando aves foram infectadas experimentalmente, Grafl et al. (2013) detectaram a presença de corpúsculos de inclusão em até duas semanas após a infecção. No presente estudo, aves pertencentes ao grupo 3 apresentavam corpúsculos de inclusão, isto sugere que a infecção possa ter ocorrido de forma mais tardia e branda nestes animais. Além disso, estes ventrículos possuíam lesão histológica grau 3, apresentando fibrose em lâmina própria, neste contexto, a presença de fibrose também foi encontrada por Ono et al. (2001) no Japão, em aves de 51 e 53 dias, no entanto, a fibrose limitou-se na base das úlceras do ventrículo em casos mais avançados.

A ausência de lesões histológicas foi observada em 7,14% (4/56) das aves, todas pertencentes ao grupo 3, ou seja, aves com mais de três semanas de vida, sugerindo que a imunidade nestes animais é maior. Porém, houve marcação positiva em 75% (3/4) na FISH sendo todas negativas na PCR, desta forma, confirma-se a presença de animais positivos sem lesões anatomopatológicas, ressaltando a importância destes como portadores. A realização de novos

estudos deve ser considerada para a verificação destes animais atuando como agentes na disseminação do FAdV-1.

Em nossa pesquisa, a localização da marcação da FISH está de acordo com as verificadas na ISH por Grafl et al. (2012) e Grafl et al. (2013) em ventrículos de galinhas. A marcação observada indicando a presença do agente destacou-se em relação a fluorescência do tecido e a confirmação foi realizada através da troca do filtro verde para o azul, onde as marcações positivas desapareciam e não eram mais observadas no corte histológico, assim como observado nos estudos de Piccoli (2020). Moter e Gobel (2000) citaram que apesar desta técnica possuir alta sensibilidade e especificidade, alguns resultados falsos-positivos podem ocorrer, como nos tecidos contendo elastina, colágeno ou até mesmo eritrócitos e eosinófilos, devido a autofluorescência que estes componentes possuem. Porém, no presente trabalho, não houve qualquer dificuldade na visualização da marcação positiva para FAdV-1 devido a marcação intranuclear do agente.

Em 42,85% das amostras, não houve marcação alguma de FAdV-1 no FISH, no entanto, a maioria apresentava lesão histológica. De acordo com Neves e Guedes (2012), quando há penetração insuficiente da sonda no interior do microrganismo em decorrência da estrutura da parede celular ou quando há baixa concentração de DNA alvo para anelamento, falsos-negativos podem ocorrer.

A PCR para detecção de adenovírus em aves foi descrita por Jiang et al. (1999), os quais concluíram que o método possui alta sensibilidade e especificidade. No presente estudo, 30,35% dos ventrículos foram positivos no PCR. Resultados semelhantes foram encontrados por Mirzazadeh et al. (2019) no Irã, onde em 22,91% dos ventrículos foram positivos para FAdV-1 na referida técnica. No entanto, ao comparar as técnicas de FISH e PCR, houve divergência em 60,71% das amostras, sendo o grupo três com o maior percentual. Neste caso, acredita-se que a cronificação das lesões apresentadas, associada a baixa carga viral no tecido,

resultou em baixa quantidade de material genético extraído para a PCR, culminando com resultado negativo. Além disso, a maioria dos estudos disponíveis que abordam a detecção de FAdV-1 no PCR, realizam o isolamento viral através da inoculação em células embrionárias do fígado, rim ou fibroblastos de galinhas (Hess, 2020), o que possibilita que o vírus atinja elevados títulos quando cultivados em células suscetíveis (Leland et al. 2007). Possivelmente, este fator contribuiu na discrepância dos resultados das técnicas, visto que a detecção do FAdV-1 no presente estudo foi realizada diretamente de amostras de tecido muscular (ventrículos), sem a realização do isolamento.

Em conclusão, os resultados obtidos demonstraram a presença do FAdV-1 em granjas comerciais de frangos de corte no Sul e Centro-Oeste do Brasil, causando erosão de ventrículo nestes animais. Tanto a técnica de PCR com a extração de DNA realizada diretamente no tecido (ventrículo), quanto a FISH, até então não empregada como método de diagnóstico, foram eficientes para detecção e confirmação do agente. Até o presente momento, este é o primeiro estudo realizado em ventrículos de frangos de corte que visa a detecção e graduação da lesão por FAdV-1 nestas regiões do País, assim como a utilização da FISH como método de diagnóstico.

Referências

Abe T, Nakamura K, Tojo T, Yuasa N. Gizzard erosion in broiler chicks by group I avian adenovirus. *Avian Diseases*.45:234-239; 2001.

Chen L, Yin L, Peng P, Zhou Q, Du Y, Zhang Y, Xue C, Cao Y. Isolation and characterization of a novel fowl adenovirus serotype 8a strain from China. *Virologica Sinica*. 35:517-527; 2020.

De la Torre D, Nuñez LFN, Parra SHS, Astolfi-Ferreira CS, Ferreira AJP. Molecular characterization of fowl adenovirus group I in commercial broiler chickens in Brazil. *VirusDisease*, 29(1): 83-88; 2018.

Domanska-Blicharz K, Tomczyk G, Smietanka K, Kozaczynski W, Minta Z. Molecular characterization of fowl adenoviruses isolated from chickens with gizzard erosions. *Poultry Science*. 90(5):983-989; 2011.

Fitzgerald, S.D. Aviadenovirus Infections. In: Swayne, D.E., editor. *Diseases of Poultry*. Hoboken (NJ): Wiley-blackwell. p. 331-332; 2020.

Garmyn A, Bosseler L, Braeckmans D, Erum JV, Verlinden M. Adenoviral gizzard erosions in two Belgian broiler farms. *Avian Diseases*. 62:322-325;2013.

Gjvre AG, Kaldhusdal M, Eriksen GS. Gizzard erosion and ulceration syndrome in chickens and turkeys: a review of causal or predisposing factors. *Avian Pathology*. 42(4): 297-303; 2013.

Grafl B, Aigner F, Liebhart D, Marek A, Prokofieva I, Bachmeier J, Hess M. Vertical transmission and clinical signs in broiler breeders and broilers experiencing adenoviral gizzard erosion. *Avian Pathology*.41(6):599-604;2012.

Grafl B, Liebhart D, Gunes A, Wernsdorf P, Aigner F, Bachmeier J, Hess M. Quantity of virulent fowl adenovirus serotype 1 correlates with clinical signs, macroscopical and

pathohistological lesions in gizzards following experimental induction of gizzard erosion in broilers. *Veterinary Research*. 44 (38):1-8; 2013.

Hess, M. Aviadenovirus Infections. In: Swayne, D.E., editor. *Diseases of Poultry*. Hoboken (NJ): Wiley-blackwell. p. 322-332; 2020.

Jiang P, Ojkic D, Tuboldy T, Huber P, Nagy E. Application of the polymerase chain reaction to detect fowl adenoviruses. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 63: 124-128; 1999.

Kecskeméti S, Bistyák A, Matiz K, Glávits R, Gyozo LK, Benko M. Megfigyelések csirkék adenovírus okozta zúzógyomorfekélyével kapcsolatban. *Magy Allatorv Lapja*. 134 (3): 145-149; 2012.

Leland DS, Ginocchio CC. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clinical Microbiology Reviews*. 20(1):49-78; 2007.

Lim TH, Kim BY, Kim MS, Jang JH, Lee DH, Kwon YK, Lee JB, Park SY, Choi IS, Song CS. Outbreak of gizzard erosion associated with fowl adenovirus infection in Korea. *Poultry science*. 91 (5): 1113-1117; 2012.

Luna LG. Routine Staining Procedures. In: Luna LG, editor. *Manual of Histologic Staining Methods of The Armed Forces Institute of Pathology*. New York: McGraw- Hill Book Co. p. 24-58;1968.

Manarolla G, Pisoni G, Moroni P, Gallazi D, Sironi G, Rampin T. Adenoviral gizzard erosion in Italian chicken flocks. *Veterinary Record*. 164:754-756;2009.

Matczuk AK, Niczkyporuk JS, Kuczkowski M, Woźniakowski G, Nowak M, Wieliczko A. Whole genome sequencing of Fowl Aviadenovirus A – a causative agent of gizzard erosion and ulceration, in adult laying hens. *Infection, Genetics and Evolution*. 48: 47-53; 2017.

Mettifogo E, Nuñez LFN, Parra SHS, Astolfi-ferreira CS, Ferreira AJP. Fowl adenovirus group I as a causal agent of inclusion body hepatitis/hydropericardium syndrome (IBH/HPS) outbreak in Brazilian broiler flocks. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 34(8):733-737; 2014.

Mirzazadeh A, Asasi K, Schachner A, Mosleh N, Liebhart D, Hess M, Grafl B. Gizzard erosion associated with fowl adenovirus infection in slaughtered broiler chickens in Iran. *Avian Diseases*. 63:568-576; 2019.

Mirzazadeh A, Grafl B, Abbasnia M, Emadi-Jamali S, Abdi-Hachesoo B, Schachner A, Hess M. Reduced performance due to adenoviral gizzard erosion in 16-day-old commercial broiler chickens in Iran, confirmed experimentally. *Frontiers in Veterinary Science*. 8: 1-8; 2021.

Moter A, Gobel UB. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*. 41: 85-112; 2000.

Nakamura K, Ohyama T, Yamada M, Abe T, Tanaka H, Mase M. Experimental gizzard erosions in specific-pathogen-free chicks by serotype 1 group I avian adenoviruses from broilers. *Avian Diseases*. 46:893-90; 2002.

Neves SMN, Guedes RMC. Hibridização *in situ* fluorescente: princípios básicos e perspectivas para o diagnóstico de doenças infecciosas na medicina veterinária. *Arquivo do Instituto Biológico*. 79 (4): 627-632; 2012.

Niczyporuk JS, Samorek-Salamonowicz E, Czekaj H. Incidence and detection of aviadenoviruses of serotypes 1 and 5 in poultry by PCR and duplex PCR. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*. 54:451-455. Poland; 2010.

Ono M, Okuda Y, Yazawa S, Shibata I, Tanimura N, Kimura K, Haritani M, Mase M, Sato S. Epizootic outbreaks of gizzard erosion associated with adenovirus infection in chickens. *Avian Diseases*. 45:268-275; 2001.

Ono M, Okuda Y, Yazawa S, Shibata I, Sato S, Okada K. Outbreaks of adenoviral gizzard erosion in slaughtered broiler chickens in Japan. *Veterinary Record*. 153:775-779; 2003.

Ojkic D, Martin E, Swinton J, Vaillancourt JP, Boulianne M, Gomis S. Genotyping of Canadian isolates of fowl adenoviruses. *Avian Pathology*. 37(1): 95-100; 2008.

Pereira CG, Marin SY, Santos BM, Resende JS, Gomes AM, Martins NRS. Occurrence of *Aviadenovirus* in chickens from the poultry industry of Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 66(3):801-808;2014.

Piccoli RJ. *Uso de hibridização fluorescente in situ (FISH) na identificação de Clamydia sp. em tecido hepático de aves silvestres nativas e exóticas* [dissertação]. [Palotina (PR)]: Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina; 2020.

Schachner A, Matos M, Grafl B, Hess M. Fowl adenovirus-induced diseases and strategies for their control – a review on the current global situation. *Avian Pathology*. 47(2): 111-126; 2018.

Schade B, Schmitt F, Bohm B, Alex M, Fux R, Cattoli G, Terregino C, Monne I, Currie RJW, Olias P. Adenoviral gizzard erosion in broiler chickens in Germany. *Avian Diseases*. 57:159-163;2013.

Tanimura N, Nakamura K, Imai K, Maeda M, Gobo T, Nitta S, Ishihara T, Amano H. Necrotizing pancreatitis and gizzard erosion associated with Adenovirus infection in chickens. *Avian Diseases*. 37: 606-611;1993.

Tabela 1 - Alterações macroscópicas, microscópicas, resultado da técnica de FISH e PCR para FAdV-1, obtidas dos ventrículos de 56 frangos de corte, oriundos da região Oeste do Paraná e Sul do Mato Grosso do Sul, de acordo com a idade dos animais.

Grupo		1	2	3
Idade (semanas)		1 (n = 20)	2 a 3 (n = 11)	3 até o abate (n = 25)
Macroscopia	Grau 0	18	10	25
	Grau 1	2	0	0
	Grau 2	0	1	0
	Grau 3	0	0	0
Microscopia	Grau 0	0	0	4
	Grau 1	5	0	0
	Grau 2	15	11	0
	Grau 3	0	0	21
	Presença de corpúsculo de inclusão	7	6	2
Ausência do corpúsculo de inclusão		13	5	23
FISH*	Ausente	7	6	11
	Discreto	1	0	3
	Leve	4	3	3
	Moderado	7	2	7
	Acentuado	1	0	1
	Severo	0	0	0
PCR**	Positivo	8	7	2
	Negativo	12	4	23

*Hibridização fluorescente *in situ*; **Reação em Cadeia da Polimerase



Figura 1 - Macroscopia, erosão de moela, *Gallus gallus domesticus*. Observa-se presença de áreas multifocais esbranquiçadas, medindo aproximadamente 0,4cm de diâmetro (seta preta).

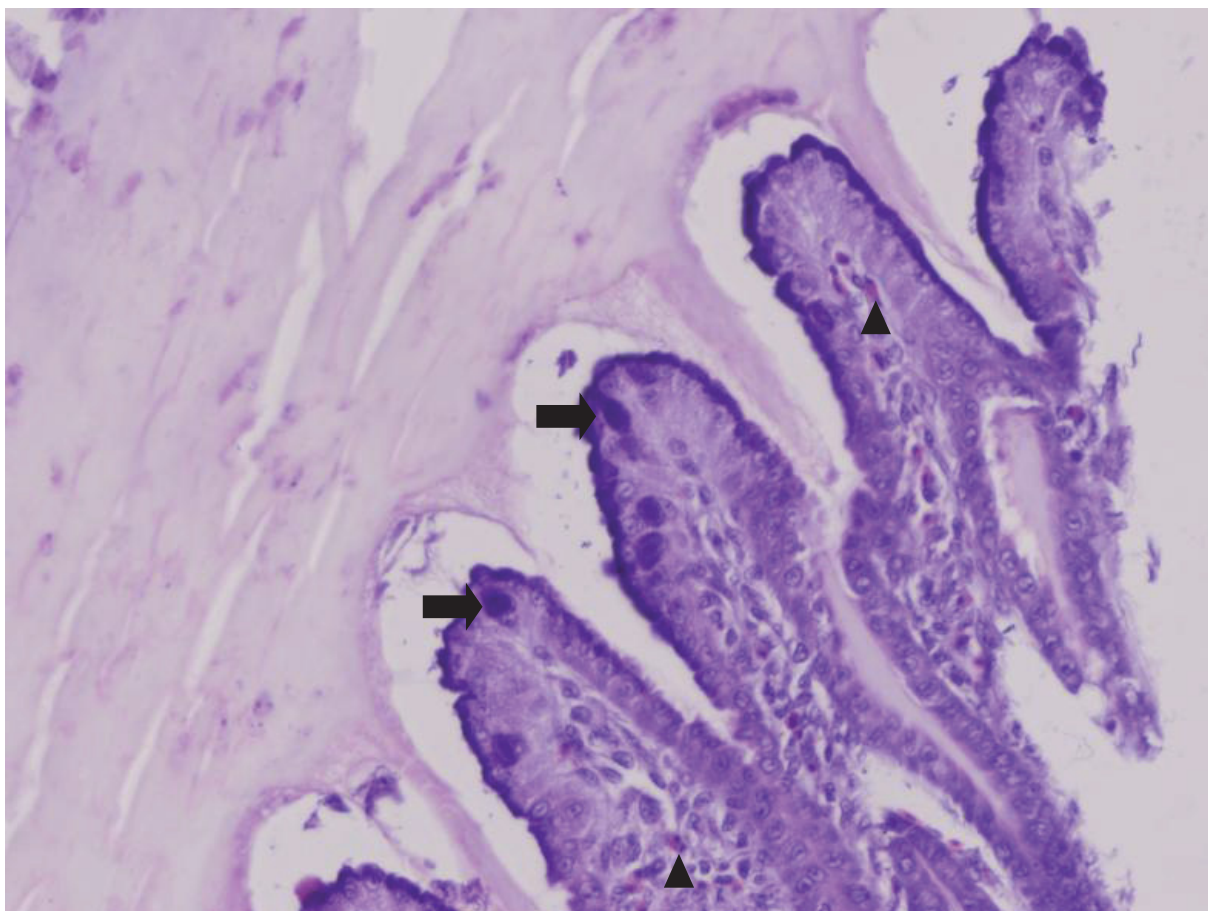


Figura 2 - Microscopia, erosão de moela, *Gallus gallus domesticus*. Observa-se a membrana de coilina com moderada rarefação, presença de corpúsculos de inclusão intranucleares nas células do epitélio superficial da mucosa, medindo até $11\mu\text{m}$ (seta preta) e infiltrado inflamatório linfocitário e granulocítico leve em lâmina própria (cabeça de seta) (HE, 40x).

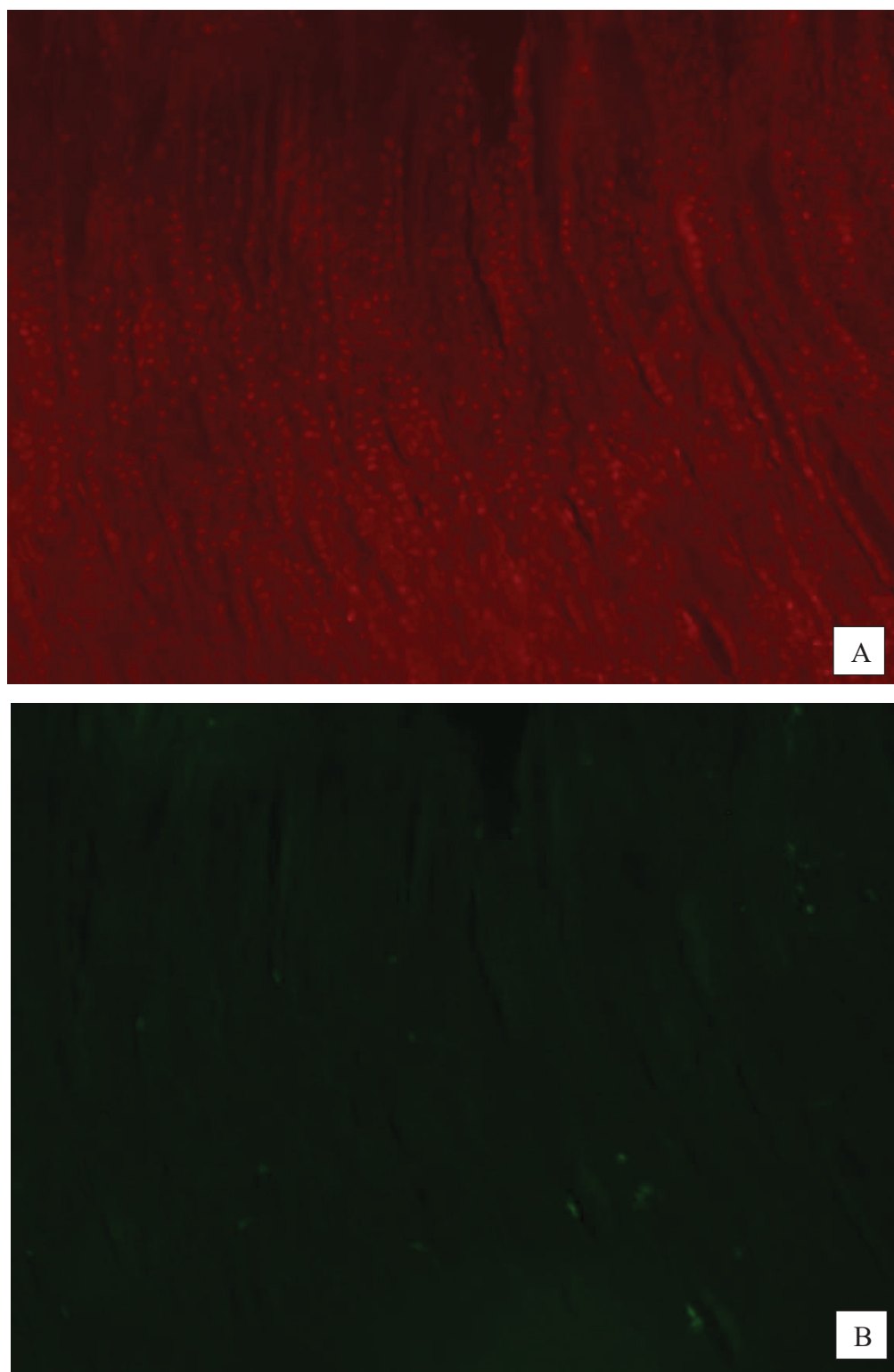


Figura 3 - Fotomicrografia com marcação positiva para FAdV-1 em moela de frango de corte (*Gallus gallus domesticus*) pela técnica de FISH. (A) Marcação positiva específica para FAdV-1 em moela. (B). Contra-prova de marcação no corte-histológico apresentado em (A) (FISH, 14x).

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos em nosso estudo, demonstraram a presença do FAdV-1 presente em granjas comerciais no Oeste do PR e Sul do MS, causando lesões que na maioria das vezes, não são visualizadas macroscopicamente. A confirmação através da PCR, utilizando material extraído diretamente do tecido, foi eficaz, no entanto novos estudos devem ser realizados para o aperfeiçoamento deste método.

Com o intuito da busca por novas técnicas de diagnóstico, a FISH mostrou-se eficiente na detecção do FAdV-1, pois permitiu além da visualização, a quantificação e localização do agente no tecido.

APÊNDICE A - TAMPÃO DE HIBRIDIZAÇÃO

Reagentes:

SDS 10%	5mL
NaCl [5M]	90mL
Tris [1M] pH 7,2	50mL
Água destilada	500mL
HCl [1M]	O suficiente para a reação

Modo de preparo:

Passo 1: Pesar os reagentes separadamente e diluir nas devidas concentrações: Tris (1M) 6,057 gramas para 50mL de água destilada; NaCl (5M) 26,298 gramas para 90 mL de água destilada;

Passo 2: Ajustar o pH da solução de Tris para 7,2 utilizando solução a 1M de HCl;

Passo 3: Colocar a solução de Tris em proveta de 500mL;

Passo 4: Adicionar à solução de NaCl na proveta de 500mL;

Passo 5: Adicionar 5mL do SDS 10% (cuidadosamente para evitar excesso de bolhas);

Passo 6: Completar com água destilada até 500mL (cuidadosamente para evitar excesso de bolhas).

APÊNDICE B – TAMPÃO DE LAVAGEM

Reagentes:

NaCl [5M]	90mL
Tris [1M] pH 7,2	50mL
Água destilada	Até 500mL
HCl [1M]	O suficiente para a reação

Modo de preparo:

Passo 1: Pesar os reagentes separadamente e diluir nas devidas concentrações: Tris (1M) 6,057 gramas para 50mL de água destilada; NaCl (5M) 26,298 gramas para 90 mL de água destilada;

Passo 2: Ajustar o pH da solução de Tris para 7,2 utilizando solução a 1M de HCl;

Passo 3: Colocar a solução de Tris em proveta de 500mL;

Passo 4: Adicionar à solução de NaCl na proveta de 500mL;

Passo 5: Completar com água destilada até 500mL.

APÊNDICE C – PROTOCOLO FISH

Passo 1: Após o corte, levar as lâminas para retirada da parafina em estufa a 65°C;

Passo 2: Desparafinizar e reidratar os cortes, mergulhando as lâminas no xilol I por 10 minutos, xilol II por 10 minutos, etanol absoluto por 5 minutos, etanol 90% por 5 minutos, etanol 80% por 5 minutos, etanol 70% por 5 minutos e água destilada por 5 minutos;

Passo 3: Secar as lâminas em temperatura ambiente e posicioná-las na bandeja de incubação de imuno-histoquímica;

Passo 4: Diluir a sonda na ausência de luz: 495µL do tampão de hibridização em 5 µL de sonda, obtendo a concentração de 2ng para cada 100µL;

Passo 5: Pipetar 100µL da sonda diluída na superfície da lâmina, preenchendo todo o tecido;

Passo 6: Preencher o fundo da bandeja com água destilada, fechá-la e em seguida, incubar *overnight* á 45°C;

Passo 7: Fazer três lavagens sucessivas com 100µL de solução tampão de hibridização pré-aquecido a 45°C na superfície da lâmina. Repetir o processo de lavagem, por três vezes, com 100µL de solução tampão de lavagem pré-aquecido a 45°C, e por fim realizar uma lavagem com água destilada.

Passo 8: secar as lâminas em estufa a 45°C até desaparecer toda a água, por tempo aproximadamente de 10 minutos;

Passo 9: Para a montagem das lâminas: Após a limpeza das lamínulas, instila-se uma gota do meio de montagem própria para microscopia de fluorescência, e acopla-se a lamínula a lâmina;

Passo 10: Fazer a leitura em microscópio de fluorescência, no aumento de 40x. Quando não se consegue fazer o foco verificar se a lâmina não está suja com o próprio meio de montagem.