

Vitor Laércio de Sá Leal Santos

**Diagnóstico do Vírus da Reticuloendoteliose Aviária
por Imunoistoquímica e Hibridização *In Situ***

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da
UFMG, como requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre em Ciência Animal.

Área: Patologia Animal

Orientador: Prof. Renato de Lima Santos

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2007**

S237d Santos, Vitor Laércio de Sá Leal, 1980-
Diagnóstico do vírus da reticuloendoteliose aviária por imunistoquímica e
hibridização in situ / Vitor Laércio de Sá Leal Santos. – 2007.
34 p. : il.

Orientador: Renato de Lima Santos

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Ave doméstica – Doenças – Diagnóstico – Teses. 2. Viroses em ave doméstica –
Teses. 3. Imunohistoquímica – Teses. I. Santos, Renato de Lima. II. Universidade Federal
de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.508 9

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Aos meus pais, Helvécio Leal Santos e Ivone de Sá Leal Santos, e irmãos, Helvécio Leal Santos Junior e Luciana Leal Santos Corrêa, pelo imenso amor, sem o qual, quão longe for, eu não teria chegado.

Ao orientador e amigo Dr. Renato de Lima Santos, pela imensa oportunidade, orientação e paciência.

Aos Doutores Susan Williams, Guillermo Zavala e Corrie Brown pela orientação.

Aos doutores Shivaprasad, Aly Fadly e Scott Hafner pelo fornecimento de material e sugestões.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro que possibilitou minha dedicação integral a este programa de mestrado, parte realizado na Universidade da Geórgia (Athens, GA, E.U.A.), no âmbito do convênio CAPES (Brasil) / FIPSE (E.U.A.).

SUMÁRIO

	RESUMO	9
	ABSTRACT	10
	INTRODUÇÃO	11
1.	CAPÍTULO 1 – Detecção do Vírus da Reticuloendoteliose por métodos de imunistoquímica e hibridização <i>in situ</i> em fibroblastos de embriões de galinha (<i>Gallus gallus</i>) experimentalmente inoculados.	14
1.1	Introdução	14
1.2	Material e Métodos	15
1.2.1	Linhagem celular, cepas virais e inoculação	15
1.2.2	Hibridização <i>in situ</i>	16
1.2.3	Imunistoquímica	19
1.3	Resultados	19
1.3.1	Hibridização <i>In Situ</i>	19
1.3.2	Imunistoquímica	20
1.4.	Discussão	20
2.	CAPÍTULO 2. – Detecção do Vírus da Reticuloendoteliose por métodos de imunistoquímica e hibridização <i>in situ</i> em embriões de codorna experimentalmente inoculados e tecidos arquivados fixados em parafina 10% e incluídos em parafina	20
2.1	Introdução	20
2.2	Material e métodos	22
2.2.1	Hibridização <i>in situ</i> e imunistoquímica	22
2.3	Resultados	23
2.3.1	Hibridização <i>In Situ</i>	23
2.3.2	Imunistoquímica	23
2.4	Discussão	27
3.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
4.	Anexo 1	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Identificação das variantes do VRE e subgrupos virais representativos do grupo do VLA utilizados neste estudo.	17
Tabela 2	Iniciadores utilizados para amplificação das sondas utilizadas para hibridização <i>in situ</i> no presente estudo, com o tamanho dos respectivos produtos.	18
Tabela 3	Órgãos positivos para VRE pela hibridização <i>in situ</i> de acordo com as diversas variantes do VRE utilizadas.	24
Tabela 4	Órgãos positivos para VRE pela imunistoquímica de acordo com as diversas variantes do VRE utilizadas.	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fibroblastos de embriões de galinha DF-1 experimentalmente infectados com variantes do VRE. 1a, 2a, 3a, 4a e 5a: Controles negativos inoculados com PBS estéril; 1b, 2b, 3b, 4b e 5b: imunistoquímica de células inoculadas com as variantes VRE-T, VRE-RU, VRE-APC 566 e VRE-397 A, respectivamente; 1c, 2c, 3c, 4c e 5c: hibridização <i>in situ</i> de células inoculadas com as variantes VRE-T, VRE-RU, VRE-APC 566 e VRE-397 A, respectivamente.	21
Figura 2	Embrião de codorna experimentalmente infectados com a variante VRE-RU. Proventrículo de embrião infectado corado pela hematoxilina e eosina (1a e 2a), com células epiteliais positivas pela hibridização <i>in situ</i> (1b e 2b) e pela imunistoquímica (1c e 2c).	25
Figura 3.	Bolsa de Fabricius de galinha experimentalmente inoculada com a variante SNV do VRE no dia da inclusão e com amostras colhidas aos 140 dias de idade, com infiltração neoplásica de células linfóides com imunomarcção de antígenos do VRE.	27

RESUMO

O vírus da reticuloendoteliose (VRE) é um retrovírus que infecta várias aves domésticas e silvestres. A infecção pelo VRE pode resultar em imunossupressão, síndrome do definhamento, alta mortalidade ou neoplasia aguda de células reticulares e/ou linfomas de células B ou T. Casos de linfomas causados pelo VRE são semelhantes aos observados na Leucose Aviária (LA) e doença de Marek (DM), o que impossibilita a diferenciação histopatológica entre estas doenças. A metodologia diagnóstica adotada atualmente para o VRE não permite detecção de infecções ativas causadas por este vírus. O presente estudo objetivou o desenvolvimento de métodos de diagnóstico para a detecção de infecções ativas pelo VRE. Foram utilizadas amostras, fixadas em formalina a 10% e embebidas em parafina, de fibroblastos de embriões de galinhas - DF-1 CEF e de tecidos de embriões de codorna experimentalmente infectados com o VRE, além de tecidos provenientes de arquivo referentes a infecções naturais e experimentais pelo VRE em galinhas e perus. Os métodos de hibridização *in situ* e imunistoquímica foram desenvolvidos utilizando, sonda de RNA construída a partir da variante APC 566 e, anticorpo policlonal anti-VRE disponível comercialmente, respectivamente. Os protocolos de HIS e IHQ desenvolvidos neste estudo foram adequados para a detecção do genoma e antígenos virais das variantes do VRE testadas em células e tecidos embrionários inoculados experimentalmente. Reações cruzadas ou de vírus representativos do grupo Leucose/sarcoma aviário não foram evidenciadas, confirmando a especificidade dos métodos. Em casos de arquivo com transformação neoplásica e diagnóstico prévio de VRE, observou-se marcação positiva em apenas uma amostra (de um total de 10), sugerindo ausência de infecção ativa nestes casos negativos, o que pode comprometer a sensibilidade da HIS e IHQ. Portanto, os métodos de HIS e IHQ desenvolvidos neste estudo, são eficazes para a identificação de infecções ativas pelo VRE.

ABSTRACT

Reticuloendotheliosis virus (REV) is a retrovirus that infects a variety of domestic and wild birds. REV infection can result in immunosuppression, runting syndrome, high mortality, or acute reticular cell neoplasia and/or T- or B-cell lymphomas. Lymphomas caused by REV resemble those associated with Avian Leucosis (AL) and Marek's disease (MD). Therefore, histopathologic differentiation of these diseases is not possible. Currently available diagnostic methods for REV do not detect active infections. In order to develop diagnostic methods for REV active infections, namely *in situ* hybridization (ISH) and immunohistochemistry (IHC), sections from experimentally inoculated 10% formalin-fixed, and paraffin embedded cultured DF-1 chicken embryo fibroblasts (DF-1 CEF), as well as tissues from experimentally infected Japanese quail embryo tissues, and archive tissues from birds with natural and experimental infections were used. ISH and IHC assays were developed using riboprobes and a commercially available polyclonal avian REV antiserum, respectively. These ISH and IHC protocols were adequate to detect REV genomic sequences and antigens in cultured cells and embryo tissues experimentally inoculated. No evidence of cross reactions or labeling of cells infected with representative strains of Avian Leucosis/sarcoma group of viruses (ALV) were observed, confirming the specificity of these methods. Only one case (in a total of 10 cases) of archive paraffin embedded tissues with previous diagnosis of reticuloendotheliosis was positive by ISH and IHC, indicating lack of active infection, which can impair the sensitivity of the ISH and IHC developed in this study. In conclusion, the diagnostic assays described here were suitable to identify active REV infections.

INTRODUÇÃO

Os linfomas em aves podem ser decorrentes de infecções por diferentes vírus, além de causas não infecciosas que incluem agentes físicos, químicos, ou alterações genéticas. O herpesvírus aviário, conhecido como vírus da Doença de Marek (VDM), além de diversos retrovírus como o vírus da reticuloendoteliose (VRE), o vírus da Leucose Aviária (VLA), demais retrovírus pertencentes ao grupo da leucose/sarcoma aviário (VLSA) e o vírus da Doença Linfoproliferativa (VDLP), este último descrito somente em perus, são alguns agentes oncogênicos e imunossupressores em aves (Payne, 1998; Davidson e Borenstein, 1999; Payne e Venugopal, 2000; Witter e Fadly, 2003, Zavala et al., 2006b).

O VRE, classificado como um gamma-retrovírus, inclui um grupo de variantes de retrovírus patogênicos, denominado grupo da reticuloendoteliose, que compartilha similaridades estruturais, morfológicas e antigênicas com os retrovírus tipo C de mamíferos. Porém, o VRE não é estrutural, imunológica ou morfológicamente semelhante aos vírus pertencentes ao grupo leucose/sarcoma aviário (Purchase e Witter, 1975; Payne, 1998; Witter e Fadly, 2003). O VRE afeta galinhas, perus, patos, gansos, faisões, codornas e várias aves silvestres (Ley et al., 1989; Hayes et al., 1992; Peterson et al., 2002; Witter e Fadly, 2003; Zavala et al., 2006a; Barbosa et al. 2007a,b). A doença clínica é mais comum em perus, porém em alguns casos a etiologia não pode ser determinada, sendo estes casos presuntivamente considerados infecções por VRE (Sarma et al., 1975; Paul et al.,

1976; Witter e Glass, 1984; Witter e Salter, 1989; Hafez, 2001), que é amplamente disseminado (Witter e Fadly, 2003). A manifestação clínica da infecção pelo VRE pode variar de síndrome de refugagem, caracterizada por atrofia acentuada de tecidos linfóides; à neoplasia aguda de células do sistema reticuloendotelial e/ou linfomas de células B ou T, de acordo com as propriedades oncogênicas das diversas variantes virais (Witter e Fadly, 2003).

O VRE pode ser classificado, de acordo com sua capacidade de replicação, em (i) variantes não-defectivas, lentamente transformantes, que induzem leucose de células B ou T por inserção viral randômica dentro do genoma da célula hospedeira, resultando em ativação de um proto-oncogene ou desativação de um anti-oncogene (Witter et al., 1986); e (ii) variantes defectivas, rapidamente transformantes, que carregam um ou mais oncogenes virais e induzem a doença dentro de alguns dias após a infecção. Variantes defectivas do VRE necessitam de variantes não-defectivas, auxiliares (*helpers*) para sua replicação. A maioria dos isolados de campo são não-defectivas para replicação em cultivos celulares e, portanto, não possuem oncogenes virais (Robinson e Twiehaus, 1974; Payne, 1998; Witter e Fadly, 2003).

A doença clínica causada pelo VRE, mesmo esporádica, pode ocorrer por transmissão natural durante a fase aguda da doença, de forma vertical, com contaminação das células germinativas do ovário e/ou no oviduto infectado, ou horizontal, através do alimento, excreções e/ou mecanicamente por insetos (McDougall et al., 1981; Witter e

Salter, 1989; Davidson e Braverman, 2005). Porém, a maioria dos casos está relacionada à administração de vacinas contaminadas com o VRE a animais jovens, o que confere à reticuloendoteliose importância econômica (Yuasa et al., 1976; Jackson et al., 1977; Taniguchi et al., 1977; Isfort et al., 1992; Fadly, 1997; Hertig et al., 1997; Garcia et al., 2003; Singh et al., 2003; Singh et al., 2005; Wang et al., 2006; Witter e Fadly, 2003). Portanto, infecções pelo VRE podem resultar em interferência negativa na avicultura comercial, devido às perdas de produção ou contaminação de células provenientes de aves, que são utilizadas em laboratórios (Fadly, 1997; Witter e Fadly, 2003).

A seqüência genômica do VRE pode, após retrotranscrição, sofrer integração ao genoma de alguns vírus de DNA, incluindo o Poxvírus aviário e o VDM, comumente controlados através de vacinação administradas a aves comerciais em todo o mundo (Witter e Fadly, 2003). Nestes casos, o VRE fica integrado ao DNA viral sob a forma de provírus, que corresponde ao genoma do VRE retrotranscrito em DNA e incorporado ao genoma do vírus DNA. Entretanto, para que ocorra doença clínica devido ao uso de vacina contaminada, a mesma tem necessariamente que carrear o provírus intacto (Yuasa et al., 1976; Jackson et al., 1977; Taniguchi et al., 1977; Isfort et al., 1992; Fadly et al., 1996; Hertig et al., 1997; Kim e Tripathy, 2001; Garcia et al., 2003; Singh et al., 2003; Witter e Fadly, 2003; Singh et al., 2005; Wang et al., 2006). Além disso, o VRE pode ser transmitido tanto vertical quanto horizontalmente, por secreções naturais, vetores mecânicos e biológicos,

incluindo insetos que podem disseminar o vírus entre as aves (Paul et al., 1976; Witter e Glass, 1984; Witter e Salter, 1989; Hayes et al., 1992; Payne, 1998; Peterson et al., 2002; Davidson e Braverman, 2005).

O VDM, um herpesvírus, causa linfoma de células T, enquanto o VLA, um retrovírus, assim como o VRE, causa linfoma de células B. Contudo, considerando-se que o VRE pode causar linfomas tanto de células B quanto T, a identificação de marcadores celulares por imunistoquímica (IHQ), como os CDs, por exemplo, não é suficiente para o diagnóstico diferencial dos agentes causadores destes tumores (Witter e Crittenden, 1979; Crespo et al., 2002).

Os métodos laboratoriais para o diagnóstico do VRE são limitados. Atualmente, apenas testes sorológicos são realizados em lotes comerciais de aves poedeiras e de corte e em perus (Hafez, 2001). Tais testes, que utilizam as técnicas de ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), permitem a detecção de anticorpos circulantes contra VRE, porém, não são capazes de identificar infecções ativas (Witter e Fadly, 2003). A avaliação histopatológica, permite o diagnóstico de linfoma, porém não é suficiente para a identificação do agente com base nas características morfológicas das lesões (Crespo et al., 2002). A PCR (*polymerase chain reaction*) (Aly et al., 1993; Davidson et al., 1995), o isolamento viral (Solomon et al., 1976; Cui et al., 1986; Chen et al., 1987; Cui et al., 1988) e a imunofluorescência indireta são também utilizados, porém sem sucesso para a detecção de infecções ativas (Witter et al., 1982; Witter e Salter, 1989; Crespo et al., 2002;

Peterson et al., 2002; Witter e Fadly, 2003; Zavala et al, 2006a).

Os retrovírus expressam cinco proteínas estruturais, uma proteína de envelope e uma polimerase. As proteínas estruturais são codificadas a partir do gene gag, sendo estas denominadas p10, p12, pp18, pp20 e p30, e consideradas grupo antígeno específico. Anticorpos contra p30 podem reagir cruzadamente com p30 de diferentes retrovírus, o que estabelece esta proteína como grupo-específica. A proteína componente do envelope viral é composta por dois peptídeos denominados (i) unidade de superfície (US), a gp90 (proteína viral imunodominante), que possui epitopo C-terminal localizado na superfície de células infectadas; e (ii) unidade transmembrana (UT), a gp20 (Davidson et al., 1996; Witter e Fadly, 2003).

A imunoistoquímica (IHQ) permite a localização de antígenos virais em tecidos, através da utilização anticorpo primário específico, conjugação enzimática e anticorpo secundário marcado ou biotinizado, com ou sem a utilização de métodos de amplificação. O anticorpo específico primário pode ser mono- ou policlonal e o anticorpo secundário, conjugado à biotina, reage contra a região Fc do anticorpo primário, permitindo a interação deste complexo com o sistema de detecção, que corresponde à enzimas e complexos avidina-biotina. A enzima pode ser conjugada com o anticorpo primário (método direto), ou ao anticorpo secundário (método indireto), ou ainda com o complexo avidina-biotina (métodos de amplificação), permitindo a visualização após adição do substrato enzimático e de um cromógeno

(University of Georgia, 1998; Ramos-Vara, 2005).

A detecção de um antígeno alvo é importante para o estudo da patogênese de um agente infeccioso. Expressão de proteínas virais (antígenos) ou proteínas transformadas, decorrentes de transformações neoplásicas, podem ser detectadas na superfície celular, citoplasma, organelas e/ou núcleo. No caso das doenças virais, particularmente por retrovírus, a detecção de antígenos indica infecção ativa (Ramos-Vara, 2005).

O VRE tem um genoma de RNA, de senso positivo, linear, simples e não segmentado. O genoma completo tem aproximadamente 8300 nucleotídeos, com pequenas diferenças entre as variantes virais. As seqüências de repetição terminais (LTRs) possuem tamanho aproximado de 600 nucleotídeos. A região terminal 5' do genoma possui um nucleotídeo cap metilado com tipo 1 seqüencial de m7G5ppp5'GmpNp. A região terminal 3' tem em cada monômero uma seqüência poli A e uma estrutura similar a tRNA. Como descrito acima, o genoma codifica proteínas estruturais, de envelope e uma DNA polimerase RNA dependente.

A utilização da técnica de hibridização *in situ* (HIS) permite a localização do genoma viral, através da utilização de sondas de DNA ou RNA. Kits comerciais de substratos e marcadores como a NTB (*nitroblue tetrazolium chloride*) adicionado ao BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato), permitem a visualização do genoma ou seqüências alvo (University of Georgia, 1998). A detecção genômica de um determinado

agente infeccioso permite um diagnóstico definitivo e melhor compreensão do envolvimento do agente na patogenia da doença, principalmente no que se refere ao caráter da infecção ou atividade do agente em determinado momento da doença.

Considerando-se a biologia do VRE, os métodos de imunistoquímica e hibridização *in situ* são extremamente promissores para a detecção de antígenos e do genoma viral em tecidos e células infectados, respectivamente. Portanto, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos para o presente estudo:

Avaliar a eficácia da imunistoquímica (IHQ) para a detecção de antígenos do VRE e da hibridização *in situ* (HIS) para a detecção de ácidos nucleicos do VRE em células ativamente infectadas, proporcionando:

1. Diferenciação entre VRE e componentes do grupo VLSA;
2. Identificação de células infectadas pelo VRE;
3. Confirmação a etiologia de casos de linfomas em perus, galinhas e codornas com diagnóstico presuntivo de infecção por VRE.

CAPÍTULO 1

Detecção do Vírus da Reticuloendoteliose por métodos de imunistoquímica e hibridização *in situ* em fibroblastos de embriões de galinha (*Gallus gallus*) experimentalmente inoculados

1.1. Introdução

Até o presente, não existem métodos laboratoriais para o diagnóstico de infecções ativas pelo VRE. Testes sorológicos, particularmente técnicas de ELISA, permitem a detecção de anticorpos circulantes contra VRE, porém, não são capazes de identificar infecções ativas. A avaliação histopatológica não é suficiente para a identificação do agente com base nas características morfológicas das lesões. A PCR (*polymerase chain reaction*), o isolamento viral e a imunofluorescência indireta são também utilizados, porém sem sucesso para a detecção de infecções ativas (Witter et al., 1982; Witter e Salter, 1989; Hafez, 2001; Crespo et al., 2002; Peterson et al., 2002; Witter e Fadly, 2003; Zavala et al., 2006a).

Visando o desenvolvimento de técnicas de imunistoquímica e hibridização *in situ* para o diagnóstico de reticuloendoteliose aviária, foram utilizadas neste estudo células experimentalmente infectadas *in vitro*. Para tanto, foram utilizadas células UMNSAH/DF-1-CEF, que é uma linhagem celular espontaneamente imortalizada, proveniente de fibroblastos de embriões de galinha *East Lansing Line/chicken line zero* (ELL-0) com 10 dias de idade. As células têm morfologia fibroblástica normal, são livres de

seqüências endógenas relacionadas aos grupos VLSA e REV e não possuem transcriptase reversa, o que previne recombinações em experimentações envolvendo tais vírus. Estas células também apresentam inibição de crescimento por contato e rápido crescimento em cultivo, atingido densidades entre $1,1-1,9 \times 10^5$ células/cm². Tais células suportam a replicação de retrovírus aviários, sendo que a transformação neoplásica de monocamadas em cultivo pode ser induzida por diversos oncogenes como o v-myc (Petropoulos e Hughes, 1991; Himly et al., 1998; Schaefer-Klein et al., 1998). Adicionalmente, esta linhagem celular fibroblastóide, é amplamente utilizada para isolamento e propagação viral, expressão de proteínas recombinantes e produção de vírus recombinantes. Além dos retrovírus, estas células são susceptíveis à infecção e suportam a replicação de grande variedade de vírus, incluindo os vírus do grupo VLSA (Schaefer-Klein et al, 1998).

A hibridização *in situ* (HIS) é uma técnica que permite localização precisa de seqüências específicas de ácidos nucléicos em cortes histológicos. A detecção de ácidos ribonucléicos, quando adequadamente preservados, é mais sensível que a detecção de DNA. Este método se baseia na aplicação de uma sonda constituída de uma fita complementar de RNA ligada a marcadores que permitem sua visualização por microscopia óptica (Brown, 1998). Por outro lado, a imunistoquímica (IHQ) permite a detecção de proteínas específicas em células ou tecidos e consiste na utilização de um anticorpo primário que se liga a um antígeno específico

formando um complexo antígeno-anticorpo. Posteriormente, o complexo é identificado pela aplicação de um anticorpo secundário conjugado a um complexo enzimático, que na presença de substrato, promove a precipitação de um cromógeno no local de marcação (Ramos-Vara, 2005).

O objetivo deste Capítulo foi avaliar as técnicas de imunistoquímica e hibridização *in situ* para a detecção do VRE em células experimentalmente infectadas *in vitro*.

1.2. Material e métodos

Os procedimentos de hibridização *in situ* e de imunistoquímica foram realizados no Departamento de Patologia Veterinária da *University of Georgia* (Athens, Georgia, EUA). Os protocolos utilizados foram modificados a partir de metodologias previamente descritas por Brown (1998) e University of Georgia (1998). Os procedimentos de cultivo celular e inoculação viral foram realizados no *Poultry Diagnostic and Research Center* da *University of Georgia* (Athens, Georgia, EUA).

1.2.1. Linhagem celular, cepas virais e inoculação

As células UMNSAH/DF-1 CEF (ATCC# CRL-12203, MI) foram cultivadas em placas de cultivo (placas de Petri, não tóxicas, biologicamente inertes, opticamente transparentes e tratadas com poliestireno plástico) de 100 mm de diâmetro com meio modificado de Dulbecco Eagle (Dulbecco's modified Eagle's medium – DMEM) com 10% de soro fetal bovino e passagens duas vezes por semana com uma razão de subcultivo de 1:2. Para

tanto, o meio de cultivo era descartado e as células eram lavadas em solução de tripsina a 0,25% e 0,53 mM de EDTA, seguido da adição de 2 a 3 ml da mesma solução de tripsina e EDTA. As células eram então observadas até seu desprendimento e dispersão (5 a 15 minutos). Em seguida foram adicionados 6 a 8 ml de meio de cultivo completo e as células eram aspiradas por pipetagem. As células foram então cultivadas a 37°C por 4 dias em atmosfera de 5-10% CO₂.

As células foram inoculadas com 5 x 10³ TCIU (*tissue culture infective units*), após crescimento em placas de cultivo de 100 mm de diâmetro. Cinco variantes do VRE foram utilizadas, bem como representantes virais do grupo da VLA (Tabela 1). Todas as cepas virais utilizadas foram gentilmente cedidas pelo Dr. Guillermo Zavala (*Poultry Diagnostic and Research Center, Department of Population Health, University of Georgia, Athens, Georgia, EUA*). Para controle negativo, placas de cultivo também foram inoculadas com PBS estéril.

Para a preparação de células infectadas incluídas em parafina em lâminas histológicas de carga positiva, foram preparadas suspensões de células após tratamento com solução de tripsina e EDTA, conforme detalhado acima. As células foram centrifugadas por 5 minutos a 1.000 g e incluídas em gel de agarose a 1% para fixação em formalina a 10% por 24 horas e processamento histotécnico rotineiro para inclusão em parafina. Subsequentemente, secções de 4 µm foram montadas em lâminas histológicas de carga positiva e aquecidas por 15 minutos a 60°C para adesão do corte. Lâminas coradas com

hematoxilina-eosina foram examinadas ao microscópio óptico para avaliação da viabilidade celular.

1.2.2. Hibridização *in situ*

Para a construção da sonda de RNA (*riboprobe*), foi utilizada a variante denominada APC 566 do VRE, que contém duas LTRs idênticas e um genoma completo incluindo as regiões gag, gag-pol e env, com alta similaridade com as seqüências gag e pol de outras variantes do VRE. O cDNA foi sintetizado a partir de 2 µg de RNA com iniciadores oligo-dT(18), 0,25 mM de dNTPs e transcriptase reversa (*Superscript*, Invitrogen, Carlsbad, California, EUA), seguindo as instruções do fabricante. O cDNA foi amplificado por PCR e o produto foi purificado utilizando-se um kit comercial (*PCR purification Kit*, Qiagen, Valencia, California, EUA), ligado em um vetor TA (pGEM-Teasy vector, Promega, Madison, Wisconsin EUA) e introduzido em *Escherichia coli* competente por choque térmico. Colônias positivas foram identificadas por PCR e seqüenciadas em duplo sentido para confirmação do inserto correto. Os plasmídeos foram preparados utilizando-se um Kit comercial (Promega). O produto resultante foi clivado com SacII seguido por transcrição *in vitro* com a RNA polimerase SP6, gerando um RNA anti-senso de aproximadamente 448pb de nucleotídeos, que foi utilizado como sonda de RNA, denominada VRE-gag-500. Adicionalmente, foram construídas mais duas sondas denominadas VER-gag-259 e VRE-gag-151, de acordo com o tamanho das mesmas (Tabela 2). Estas sondas anti-senso foram utilizadas para hibridização *in situ* em células experimentalmente infectadas por VRE e

representantes do grupo do VLA, fixadas em formalina a 70% e incluídos em parafina, conforme descrito acima. Sondas senso também foram geradas

concomitantemente e utilizadas como controle.

Tabela 1. Identificação das variantes do VRE e subgrupos virais representativos do grupo do VLA utilizados neste estudo.

Amostra	Acesso GenBank	Genoma*	Descrição do Vírus
Rev-A	NC_0069348295	8295	Vírus da Reticuloendoteliose
Rev-T	K00555 X02759	1923	Vírus da Reticuloendoteliose, pro-viral, oncogene - v-rel
Rev APC 566	DQ 387450	8286	Vírus da Reticuloendoteliose
Rev RU	ND**	ND**	Vírus da Reticuloendoteliose
Rev 397 A	ND**	ND**	Vírus da Reticuloendoteliose
RCASBPA	BD2615841162	11628	(Sinteticamente construído a partir do Subgrupo A do ALV)
RAV-1			
Subgrupo A	NC_001408	7286	Vírus do sarcoma de Rous
RAV-2			
Subgrupo-B	M14902	1289	Vírus do sarcoma de Rous,
RAV-49			
Subgrupo-C	AF033808	9392	Vírus do sarcoma de Rous
RAV-50			Vírus do sarcoma de Rous
Subgroup D	M22730	1285	(strain Schmidt-Ruppin)
ALV-J PDRC	Z46390	7441	Subgrupo J (HPRS-103 ALV)
ALV – J ADOL	AY 027920	7612	Subgrupo J (ADOL 7501)
RSV – B	ND**	ND**	Vírus do sarcoma de Rous

* Tamanho do genoma em pares de bases (pb).

** ND = não disponível.

Tabela 2. Iniciadores utilizados para amplificação das sondas utilizadas para hibridização *in situ* no presente estudo, com o tamanho dos respectivos produtos.

Iniciador	Seqüência (5'-3')	Tamanho*
VRE-gag Senso 1	TGCGCAAGTTATGTGAGTCGGA	448**
VRE-gag Senso 2	AGGCGGCCCGTGCTCCCCTCAGC	259
VRE-gag Anti-Senso 2	CCCGTTCCCCAGTTTCCCTAAGGGG	
VRE-gag Senso 3	GGAGGGCTCAATTCCTGGATG	151
VRE-gag Anti-Senso 3	CCACTTCGGGTGTGGGGAGGGCTC	

* Tamanho do produto de PCR em pares de bases (pb).

** O produto indicado para o iniciador “VRE-gag Senso 1” (448 pb) foi obtido amplificando-se com o iniciador “VRE-gag Anti-Senso 2”.

Células incluídas em parafina foram cortadas a 4 µm de espessura e montadas em laminas histológicas para hibridização *in situ* como descrito previamente (Brown, 1998). As lâminas foram desparafinizadas a 60°C por 20 minutos e lavadas em Hemo-De (PMP Medical Industries, Irving, Texas, EUA) por 20 minutos. As células foram re-hidratadas em PBS contendo 5 mM de MgCl₂ por 10 minutos em temperatura ambiente, lavadas em Tris 0,2 M pH 7,5 e 0,1 M de glicina (Glycocoll, Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) por 10 minutos em temperatura ambiente e incubadas com proteinase K em tampão Tris 10 mM pH 7,5 com 2 mM CaCl₂ por 15 minutos a 37°C. A atividade enzimática foi bloqueada por lavagem em Tris 0,2 M pH 7,5 e 0,1 M de glicina. As células foram incubadas em solução de pré-hibridização por 1 hora a 42°C seguido de incubação por aproximadamente 18 horas a 4°C em solução de hibridização (2 µl da solução final de transcrição contendo a sonda de RNA anti-senso em 70 µl de solução de pré-hibridização). Posteriormente, foram

feitas lavagens de 30 minutos a 50°C com 2x SCC com 1% SDS e 30 minutos a 50°C com 1x SCC com 0,1% SDS, 30 minutos a temperatura ambiente com 1x SSC, 15 minutos a temperatura ambiente com 0,1x SSC e 5 minutos a temperatura ambiente com tampão 1 (100 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl). As lâminas foram então incubadas por 2 horas a 37°C com 70 µl de anti-digoxigenina-AP (Roche Diagnostics, Indianapolis, Indiana EUA) em diluição de 1:300 em tampão 1 com 2% de soro de ovelha. Em seguida, foram realizadas 3 lavagens com tampão 1 por 15 minutos cada a temperatura ambiente, e tampão 3 (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂) por 5 minutos a temperatura ambiente. Foi adicionado o substrato, 4,5 µl de NBT (*Nitroblue tetrazolium chloride*, Roche Diagnostics) com 3,5 µl BCIP (*5-bromo-4-chloro-3-indolykphosphate*, Roche Diagnostics) por ml de tampão 3, com adição de uma gota de 5 mM de levamisole (Vector Laboratories, Burlingame, California, EUA) para bloqueio da peroxidase

endógena. As células foram então contra-coradas com hematoxilina.

1.2.3. Imunoistoquímica.

Células incluídas em parafina e cortadas a 4µm de espessura, conforme detalhado acima para o procedimento de hibridização *in situ*, foram utilizadas para imunoistoquímica conforme descrito previamente (University of Georgia, 1998). As lâminas foram desparafinizadas a 70°C por 15 minutos e lavadas em citro solvente (Hemo-De) por 20 minutos a 37°C por 20 minutos. Como método de recuperação antigênica foi utilizado o microondas por 10 minutos, com imersão dos tecidos em tampão comercial (*Vector Ag Unmasking Solution* [1:100]; Vector Laboratories). Foi utilizada solução de caseína para bloqueio de reações inespecíficas (*1x Power block/Universal Blocking Reagent*, Biogenex, San Ramon, California, EUA).

Foi utilizado um anticorpo primário policlonal anti-VRE, disponível comercialmente (Charles River Laboratories, Wilmington, Massachusetts, EUA), incubado por 18 horas a 4°C. A incubação dos tecidos com o anticorpo secundário, biotinizado anti-galinha e disponível comercialmente (Vector Laboratories), foi realizada por 1 hora a 37°C. Foi utilizado um kit cromógeno disponível comercialmente (*Vector red*, Vector Laboratories). As células foram contra-coradas com hematoxilina.

1.3. Resultados

O protocolo de inclusão em gel de agarose seguido de processamento para inclusão em parafina não resultou em

nenhuma evidencia histológica de injúria celular, indicando que este protocolo é adequado para o desenvolvimento dos protocolos de hibridização *in situ* e imunoistoquímica para o VRE.

1.3.1. Hibridização *in situ*

A sonda REV gag-500 hibridizou com células provenientes de cultivo, peletizadas e fixadas com formalina 10% tamponada/álcool 70% e embebidas em parafina, experimentalmente infectadas com variantes do VRE e amostras representativas do grupo VLSA (controle de especificidade), bem como células inoculadas com PBS (controle negativo). As células fibroblastóides de embriões de galinha UMNSAH/DF-1-CEF foram susceptíveis à infecção experimental com todas as variantes do VRE (Tabela 1), conforme demonstrado pelo protocolo de HIS utilizado neste estudo.

O protocolo de HIS utilizado revelou ser adequado para detecção do genoma de todas as variantes do VRE utilizadas, além de permitir a diferenciação entre VRE e demais variantes utilizadas como controle de especificidade, não sendo observadas reações cruzadas.

A sonda de RNA anti-senso REVgag-500 resultou em maior intensidade de marcação quando comparada a demais sondas geradas e testadas (Tabela 2). Sondas senso, simultaneamente geradas, não foram capazes de detectar ácidos nucléicos do VRE. Células inoculadas com PBS foram negativas para marcação por HIS. Coloração ou sinal não-específico não foi observado com a utilização deste protocolo. A porcentagem de células positivas variou entre secções, sem padrão determinado, porém, não entre variantes virais. Houve

intensa marcação tanto no núcleo quanto no citoplasma (Fig. 1), somente nas amostras inoculadas com o VRE.

1.3.2. Imunoistoquímica

Neste estudo de imunoperoxidase indireta, a linhagem celular proveniente de fibroblastos de embrião de galinha UMNSAH/DF-1-CEF, demonstrou susceptibilidade à infecção experimental para todas as variantes do VRE testadas (Fig. 1 e Tabela 1).

O protocolo utilizado revelou-se adequado para detecção de antígenos do VRE de todas as variantes testadas. Os resultados permitiram também, diferenciação do VRE dos vírus representantes do grupo do VLA, sem observação de reações cruzadas. As células inoculadas com PBS não apresentaram imunomarcação.

Coloração de fundo não-específica não foi observada com o protocolo descrito e, em concordância com os resultados obtidos com o método de HIS, a porcentagem de células positivas variou entre secções histológicas, mas sem padrão determinado. As células demonstraram intensa marcação tanto no núcleo quanto no citoplasma (Fig. 1) o que não foi observado nos controles negativos.

1.4. Discussão

Este estudo demonstrou que as células fibroblastóides de embriões de galinha UMNSAH/DF-1-CEF são um bom modelo para o estudo de métodos de diagnóstico do VRE, permitindo a detecção de antígenos e do genoma viral.

Os resultados similares entre as variantes do VRE utilizadas neste estudo, em relação aos padrões de marcação, tanto na HIS quanto na IHQ se deve, provavelmente, a alta similaridade das seqüências gag entre as diversas variantes e a variante denominada APC 566, cuja seqüência foi utilizada para a construção da sonda de RNA. Estes resultados indicam que estes métodos de HIS e IHQ têm potencial para serem adicionados ao repertório de técnicas de diagnóstico para o VRE, além de ser os únicos métodos capazes de identificar o vírus em casos de infecções ativas.

Com base nos resultados obtidos com células experimentalmente inoculadas, a mesma metodologia de pesquisa foi aplicada a tecidos fixados em formalina 10% e embebidos em parafina, provenientes de embriões de codorna infectados experimentalmente e casos arquivados de infecções naturais (Capítulo 2).

CAPÍTULO 2

Detecção do Vírus da Reticuloendoteliose por métodos de imunoistoquímica e hibridização *in situ* em embriões de codorna experimentalmente inoculados e tecidos arquivados fixados em parafina 10% e incluídos em parafina

2.1. Introdução

Os resultados apresentados no Capítulo 1 demonstraram que as técnicas de hibridização *in situ* e imunoistoquímica foram eficientes para a identificação de células experimentalmente inoculadas com o REV. Estes resultados motivaram o delineamento dos experimentos

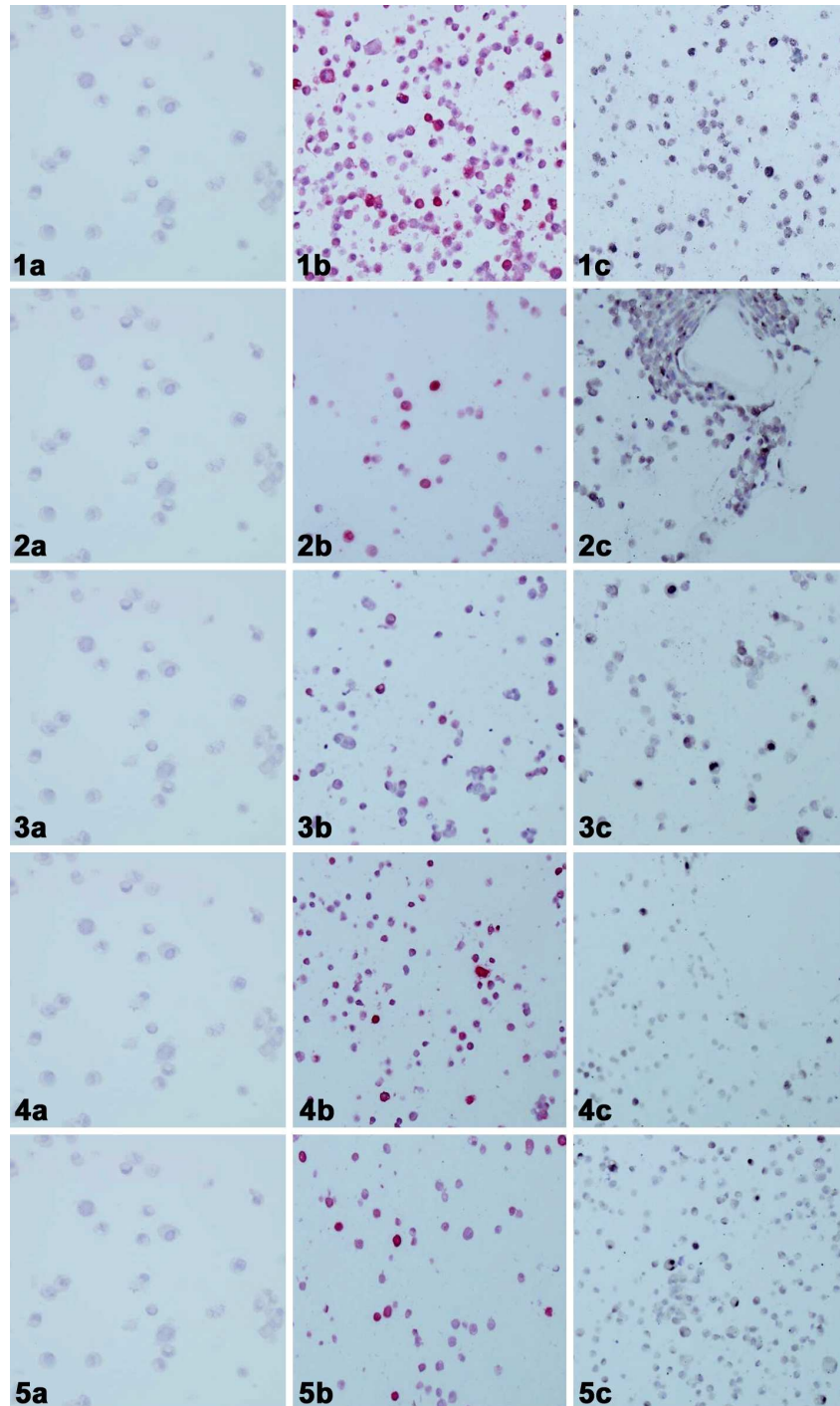


Figura 1. Fibroblastos de embriões de galinha DF-1 experimentalmente infectados com variantes do VRE. 1a, 2a, 3a, 4a e 5a: Controles negativos inoculados com PBS estéril; 1b, 2b, 3b, 4b e 5b: imunohistoquímica de células inoculadas com as variantes VRE-T, VRE-RU, VRE-APC 566 e VRE-397 A, respectivamente; 1c, 2c, 3c, 4c e 5c: hibridização *in situ* de células inoculadas com as variantes VRE-T, VRE-RU, VRE-APC 566 e VRE-397 A, respectivamente.

descritos neste Capítulo, visando a aferição destes métodos de diagnóstico para a identificação de antígenos e ácidos nucléicos do REV em tecidos de embriões experimentalmente infectados e em casos de arquivo com diagnóstico presuntivo ou definitivo de reticuloendoteliose. Cabe ressaltar que as doenças linfoproliferativas em aves são consideradas de difícil diferenciação clínica e histopatológica (Crespo et al., 2002). Pronta diferenciação entre os agentes facilitaria métodos de controle e erradicação das doenças, reduzindo a morbidade e mortalidade.

Considerando-se que à maioria do material enviado para realização de diagnóstico histopatológico corresponde a tecidos fixados em formalina a 10% e incluídos em parafina, métodos de diagnóstico que permitam a utilização de amostras nestas condições de preservação seriam de grande utilidade e importância diagnóstica. Além disso, a grande quantidade de material arquivado em laboratórios de diagnóstico é um importante recurso para estudos retrospectivos de doenças infecciosas. Portanto, métodos que permitam a identificação de antígenos e ácidos nucléicos neste tipo de material permitem melhor utilização deste importante recurso.

Neste estudo, os métodos de hibridização *in situ* e de imunistoquímica descritos no Capítulo 1 foram adaptados para detecção do genoma e de antígenos do VRE em embriões de codorna experimentalmente inoculados e em tecidos arquivados fixados em formalina 10% e incluídos em parafina.

2.2. Material e métodos

Os Procedimentos de inoculação viral de embriões de codorna e obtenção das amostras foram realizados no *Poultry Diagnostic and Research Center* da *University of Georgia* (Athens, Georgia, EUA). Foram também utilizados tecidos fixados em formalina, provenientes de casos arquivados de infecções naturais e experimentais pelo VRE, em galinhas e perus (amostras positivas), bem como tecidos de aves infectadas com o VDM e o VLSA, utilizados como controle de especificidade. As amostras de tecido utilizadas neste estudo estão descritas em detalhe no Anexo 1.

Foram inoculados 100 embriões de codorna de 5 dias de idade, sendo 20 ovos com cada uma das 5 variantes do VRE utilizadas para inoculação de células no Capítulo 1 (Tabela 1). O inóculo foi constituído de 10^4 TCIU em 50 μ l de PBS. Foram selecionados 25 embriões, sendo 5 inoculados com cada uma das variantes do VRE. Embriões não infectados (n=5), inoculados com o mesmo volume de PBS estéril e foram utilizados como controle negativo. No dia da eclosão, os embriões foram colocados a temperatura de -20°C por 2 horas e, em seguida, foi aberta a cavidade celomática e os embriões foram fixados por imersão em formalina a 10% por 24 horas. Foram feitas secções transversais dos embriões para processamento histológico e inclusão em parafina.

2.2.1. Hibridização *in situ* e imunistoquímica

Cortes histológicos de 4 μ m de espessura, das amostras de tecidos de embriões de codornas infectados

experimentalmente e de tecidos de arquivo, foram processados para hibridização *in situ* e imunistoquímica utilizando-se o protocolo descrito no Capítulo 1.

2.3. Resultados

2.3.1. Hibridização *in situ*

A sonda utilizada demonstrou especificidade elevada, não sendo evidenciadas reações cruzadas ou marcações não-específicas. Os embriões de codorna foram susceptíveis a todas as variantes do VRE utilizadas neste estudo, conforme demonstrado pela HIS, susceptibilidade a infecção experimental utilizadas. O genoma viral de todas as variantes utilizadas neste estudo foi detectado por HIS principalmente no proventrículo, que se apresentava sem transformação neoplásica. Houve marcação tanto do epitélio quanto da musculatura do proventrículo na maioria dos embriões infectados (19 em 25; 76%), independentemente da variante do VRE, sugerindo possível tropismo viral para este órgão (Fig 2; Tabela 3). Além do proventrículo, foi observada marcação positiva em células endoteliais de dois embriões infectados com a variante VRE-T (Tabela 3). As células positivas apresentaram intensa marcação tanto no núcleo quanto no citoplasma (Fig. 2). Não foram observadas alterações histológicas em nenhum órgão dos embriões infectados, nem mesmo no proventrículo.

A partir dos resultados positivos obtidos com a infecção experimental, a mesma metodologia foi aplicada a tecidos fixados em formalina a 10% e embebidos em parafina, provenientes de casos arquivados de infecções naturais e experimentais, totalizando 10 casos (Anexo 1). Apenas uma amostra de bolsa de Fabricius de galinha experimentalmente inoculada com a variante SNV do VRE no dia da inclusão e com amostras colhidas aos 140 dias de idade, com infiltração neoplásica de células linfóides na bolsa, foi positiva por HIS para o VRE. Todas as demais amostras com infecção natural ou experimental foram negativas.

2.3.2. Imunistoquímica

A imunistoquímica foi capaz de detectar a presença de antígenos quando aplicada em tecidos de embriões de codorna experimentalmente inoculados com todas as variantes do VRE utilizadas neste estudo (Tabela 1). Os embriões de codorna foram susceptíveis a infecção experimental para todas as variantes do VRE utilizadas, conforme evidenciado pela IHQ. À semelhança dos resultados obtidos com HIS, antígenos do VRE, de todas as variantes estudadas, foram detectados no proventrículo na maioria dos embriões infectados (19 em 25; 76%), independentemente da variante do VRE (Tabela 4). A localização de antígenos

Tabela 3. Órgãos positivos para VRE pela hibridização *in situ* de acordo com as diversas variantes do VRE utilizadas*.

Órgãos	Variantes (n = 5)**				
	VRE-A	VRE-T	VRE-APC 566	VRE-RU	VRE-397 A
Proventrículo (epitélio)	4	4	5	3	3
Proventrículo (musculatura)	4	3	4	3	2
Vaso sanguíneo (endotélio)	0	2	0	0	0

* Foram incluídos na tabela apenas órgãos que apresentaram marcação positiva, embora tenham sido examinados todos os órgãos, uma vez que os embriões foram submetidos a cortes seriados.

** Foram estudados 5 embriões inoculados (n = 5) com cada uma das variantes do VRE.

do VRE no proventrículo, tanto do epitélio quanto na musculatura, ocorreu na ausência de transformação neoplásica ou de qualquer outra alteração histológica do órgão sugerindo possível tropismo viral para este órgão (Fig 2; Tabela 4). Houve marcação esporádica em alguns outros órgãos do sistema cardiovascular e músculo-esquelético (Tabela 4). As células positivas apresentaram intensa marcação tanto no núcleo quanto no citoplasma (Fig. 2).

A partir dos resultados positivos obtidos com a infecção experimental, a mesma metodologia foi aplicada a tecidos fixados em formalina a 10% e embebidos em parafina, provenientes de 10 casos arquivados de infecções naturais e experimentais pelo VRE (Anexo 1). Apenas a amostra de bolsa de Fabricius de galinha que foi positiva pela HIS, apresentou imunomarcação de antígenos do VRE (Fig. 3). Semelhante ao que foi observado com a técnica de HIS, todas as demais amostras foram negativas.

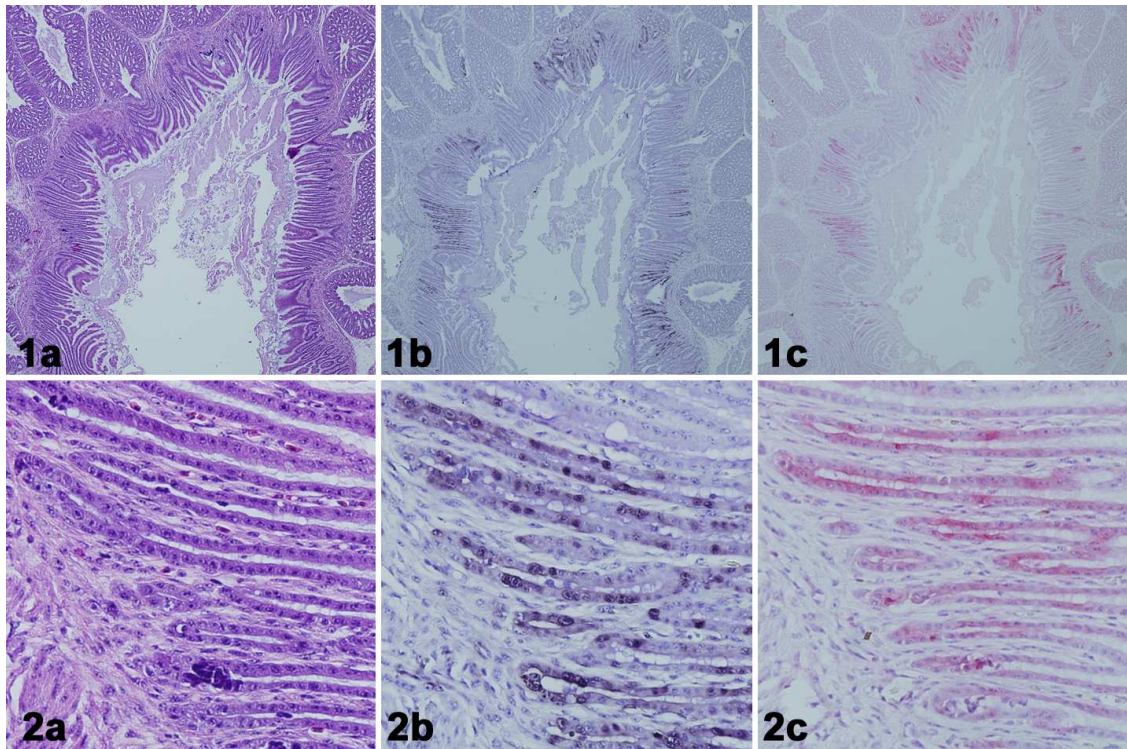


Figura 2. Embrião de codorna experimentalmente infectados com a variante VRE-RU. Proventrículo de embrião infectado corado pela hematoxilina e eosina (1a e 2a), com células epiteliais positivas pela hibridização *in situ* (1b e 2b) e pela imunohistoquímica (1c e 2c).

Tabela 4. Órgãos positivos para VRE pela imunistoquímica de acordo com as diversas variantes do VRE utilizadas*.

Órgãos	Variantes (n=5)**				
	VRE-A	VRE-T	VRE-APC 566	VRE-RU	VRE-397 A
Proventrículo (epitélio)	4	4	5	3	3
Proventrículo (musculatura)	4	3	4	3	2
Coração	0	1 (endocárdio)	0	1 (endo e miocárdio)	0
Vaso sanguíneo (endotélio)	0	2	0	0	0
Musculatura esquelética	0	2	0	0	0
Cartilagem (condrócito)	0	0	1	0	0

*Foram incluídos apenas órgãos que apresentaram marcação positiva em quaisquer variantes, porém, todos os órgãos foram avaliados, de acordo com a exposição em secções transversais.

** Foram estudados 5 embriões inoculados (n = 5) com cada uma das variantes do VRE.

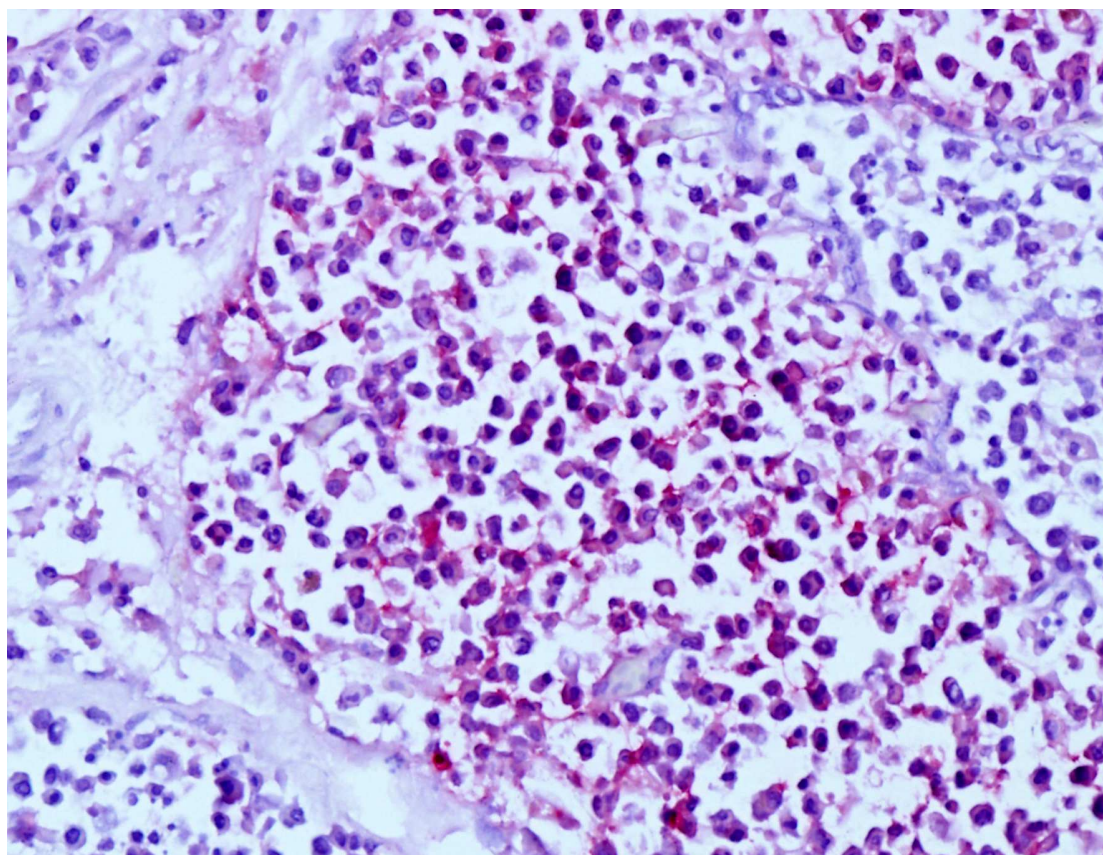


Figura 3. Bolsa de Fabricius de galinha experimentalmente inoculada com a variante SNV do VRE no dia da inclusão e com amostras colhidas aos 140 dias de idade, com infiltração neoplásica de células linfóides com imunomarcação de antígenos do VRE.

2.4. Discussão

Os resultados deste estudo demonstraram que a utilização dos métodos de IHQ, para detecção de antígenos, e de HIS, para detecção do genoma viral, são eficientes para a identificação da infecção ativa pelo VRE. Estes métodos oferecem velocidade e praticidade, além de eficiência e sensibilidade no diagnóstico do VRE. Contudo, tanto a HIS quanto a IHQ tem baixa sensibilidade para a identificação de casos em que o animal já tenha desenvolvido neoplasias, ou seja, quando geralmente já não há infecção ativa, conforme evidenciado

pela baixa frequência de positividade em amostras de casos previamente diagnosticados como reticuloendoteliose aviária. Como mencionado anteriormente, os parâmetros clínicos e histopatológicos são insuficientes para o diagnóstico do VRE, o que tem sido tradicionalmente baseado no isolamento viral em cultivos celulares, PCR (*polymerase chain reaction*), imunofluorescência indireta e sorologia. Contudo, tais metodologias são demoradas e requerem considerável capacidade técnica, gerando a necessidade de métodos alternativos de diagnóstico como a HIS e a IHQ.

Os resultados obtidos no presente estudo, com a aplicação da HIS e da IHQ, suportam a hipótese de que o VRE tem forte tropismo para o proventrículo, tanto para o epitélio quanto para a musculatura deste órgão, ainda que sem lesões ou infiltração de células linfóides. Estes resultados estão em concordância com o achado de proventriculite em aves com infecção pelo VRE (Jackson et al., 1977; Bagust et al., 1979), embora estes estudos prévios não tenham tido condição de estabelecimento de causa e efeito. Cabe ressaltar que no presente estudo não foram observadas lesões no proventrículo, o que pode ser devido ao tempo após inoculação, à espécie e idade das aves utilizadas neste estudo.

Em comparação com estudos de hibridização *in situ* realizados previamente em embriões de galinha experimentalmente inoculados com ALV subgrupo J, o VRE se demonstra mais seletivo em embriões de codorna, com forte tropismo para o proventrículo, contrastando com a ampla distribuição do ALV, evidenciada pela marcação de cardiomiócitos, células de Purkinje, vasos sanguíneos e musculatura lisa pulmonar, glomérulos renais, musculatura lisa gastrintestinal, tireóide, adrenais, bolsa de Fabricius e hipófise (Stedman et al., 2001; Williams et al., 2004).

Tecidos de embrião de codorna experimentalmente infectados demonstraram ser um modelo útil para o estudo de métodos diagnósticos para o VRE, sendo, os métodos de HIS e IHQ utilizados neste estudo eficazes para a detecção de todas as variantes do VRE estudadas. Contudo, ao contrário dos resultados obtidos com cultivo celular (Capítulo 1) e com embriões de codorna

experimentalmente infectados, a utilização de IHQ e HIS resultou em positividade em uma pequena fração das amostras de tecidos arquivados, fixados em formalina e incluídos em parafina, de aves com neoplasia e diagnóstico prévio de RE, indicando sensibilidade extremamente baixa destes métodos em casos em que já houve desenvolvimento de neoplasias, sugerindo ausência de infecção ativa nestes casos, o que pode comprometer a sensibilidade da IHQ e HIS. Portanto, a ausência de marcação pela HIS e IHQ nos casos de neoplasia pelo VRE, pode ser devida a integração proviral, que ocorre em infecções por retrovírus, resultando na ausência de transcrição do RNA viral e de expressão de proteínas virais, que são abundantes durante a infecção ativa (Nuovo, 2007).

Células linfóides transformadas *in vitro* pelo VRE não produzem partículas virais, embora sejam infectantes e induzam reticuloendoteliose letal em aves histocompatíveis (Lewis et al., 1981). Tem sido demonstrado em neoplasias linfóides causadas por retrovírus em mamíferos, por exemplo no caso do Vírus da Leucose Bovina, que não há transcrição do DNA proviral e, conseqüentemente, não há replicação do genoma viral nem expressão de proteínas do vírus em células neoplásicas (Kashmiri et al., 1985). Esta baixa sensibilidade pode, ainda, ser atribuída a degradações de RNA em amostras de arquivo (Brown, 1998, Ramos-Vara, 2005). Cabe ressaltar que métodos moleculares de diagnóstico *in situ* são de grande utilidade na detecção de infecções causadas por vírus. Dentre as vantagens se incluem a velocidade na obtenção dos resultados, praticidade e flexibilidade de adaptação dos protocolos. Contudo, há desvantagens

como resultados equivocados devido a alterações autolíticas das células ou tecidos e marcações não específicas (Haines e Chelack, 1991; Brown, 1998). Portanto, uma limitação da HIS neste caso se deve ao fato de que RNA isolado de tecidos embebidos em parafina apresenta menor qualidade em comparação a amostras de RNA obtidas de tecido fresco. Além disso, a fixação com formalina pode levar a reações bioquímicas com ligação entre ácidos nucleicos e proteínas, além de modificações covalentes do RNA pela adição de grupos não metil às bases púricas e pirimidínicas, em tecidos expostos à sua ação por tempo prolongado (Brown, 1998, Ramos-Vara, 2005).

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a HIS e IHQ são métodos eficientes para a detecção do VRE em casos de infecção ativa.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALY, M.M., SMITH, E.J., FADLY, A.M. Detection of reticuloendotheliosis virus infection using the polymerase chain reaction. *Avian Pathol.* v.22, p. 543-554, 1993.

BAGUST, T.J., GRIMEST, T.M., DENNETT, D.P. Infection studies on a reticuloendotheliosis virus contaminant of a commercial Marek's disease vaccine. *Aust. Vet. J.*, v. 55, n.4, p153-157, 1979.

BARBOSA, T., ZAVALA, G., CHENG, S., VILLEGAS, P. Full genome sequence and some biological properties of reticuloendotheliosis virus strain APC-566 isolated from endangered Attwater's prairie chickens. *Virus Res.* v.124, n.1-2, p.68-77, 2007a.

BARBOSA, T., ZAVALA, G., CHENG, S., VILLEGAS, P. Pathogenicity and transmission of reticuloendotheliosis virus isolated from endangered prairie chickens. *Avian Dis.* v.51, n.1, p.33-39, 2007b.

BROWN, C.C. In situ hybridization with riboprobes: an overview for veterinary pathologists. *Vet. Pathol.*, v.35, p.159-167, 1998.

CHEN, P.-Y., CUI, Z., LEE, L.F., WITTER, R.L. Serologic differences among nondefective reticuloendotheliosis viruses. *Arch. Virol.*, v.93, p.233-245, 1987.

CRESPO, R., WOOLCOCK, P.R., FADLY, A.M., HALL, C., SHIVAPRASAD, H.L. Characterization of T-cell lymphomas associated with an outbreak of reticuloendotheliosis in turkeys. *Avian Pathol.*, v.31, n.4, p.355-361, 2002.

CUI, Z., LEE, L.F., SILVA, R.F., WITTER, R.L. Monoclonal antibodies against avian reticuloendotheliosis virus: identification of strain-specific and strain-common epitopes. *J. Immunol.*, v.136, p.4237-4242, 1986.

CUI, Z., LEE, L.F., SMITH, E.J., WITTER, R.L., CHANG, T.S. Monoclonal-antibody-mediated enzyme-linked immunosorbent assay for detection of reticuloendotheliosis viruses. *Avian Dis.*, v.32, p.32-40, 1988.

DAVIDSON, I., BORENSTEIN, R. Multiple infection of chickens and turkeys with viral oncogenic viruses: prevalence and molecular analysis. *Acta Virol.*, v.43, n.2-3, p.136-142, 1999.

- DAVIDSON, I., BOROVSKAYA, A., PERL, S., MALKINSON, M. Use of the polymerase chain reaction for the diagnosis of natural infection of chickens and turkeys with Marek's disease virus and reticuloendotheliosis virus. *Avian Pathol.*, v.24, p.69-94, 1995.
- DAVIDSON, I., BRAVERMAN, Y. Insect contribution to horizontal transmission of Reticuloendotheliosis virus. *J. Med. Entomol.*, v.42, n.2, p.128-133, 2005.
- DAVIDSON, I., YANG, H., WITTER, R.L., MALKINSON, M. The immunodominant proteins of reticuloendotheliosis virus. *Vet. Microbiol.*, v.49, n.3-4, p.273-284, 1996.
- FADLY, A.M. Avian retroviruses: a review. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, v.13, n.1, p.71-85, 1997.
- FADLY, A.M., WITTER, R.L., SMITH, E.J., SILVA, R.F., REED, W.M., HOERR, F.J., PUTMAN, M.R. An outbreak of lymphomas in commercial broiler chickens vaccinated with fowl pox vaccine contaminated with reticuloendotheliosis virus. *Avian Pathol.*, v.25, p.35-47, 1996.
- GARCIA, M., NARANG, N., REED, W.M., FADLY, A.M. Molecular characterization of reticuloendotheliosis virus insertions in the genome of field and vaccine strains of fowl poxvirus. *Avian Dis.*, v.47, p.343-354, 2003.
- HAFEZ, H.M. Serological investigations on reticuloendotheliosis in turkey flocks. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, v.48, n.7, p.547-550, 2001.
- HAYES, L.E., LANGHEINRICH, K.A., WITTER, R.L. Reticuloendotheliosis in a wild turkey (*Meleagris gallopavo*) from coastal Georgia. *J. Wildl. Dis.*, v.28, n.1, p.154-158, 1992.
- HAINES, D.M., CHELACK, B.J. Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology: review article. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.3, p.101-112, 1991.
- HERTIG, C., COUPAR, B.E., GOULD, A.R., BOYLE, D.B. Field and vaccine strains of fowlpox virus carry integrated sequences from the avian retrovirus, reticuloendotheliosis virus. *Virology*, v.235, n.2, p.367-376, 1997.
- HIMLY, M., FOSTER, D.N., BOTTOLI, I., IACOVONI, J.S., VOGT, P.K. The DF-1 chicken fibroblast cell line: transformation induced by diverse oncogenes and cell death resulting from infection by avian leukosis viruses. *Virology*. v.248, n.2, p.295-304, 1998.
- ISFORT, R., JONES, D., KOST, R., WITTER, R., KUNG, H.J. Retrovirus insertion into herpesvirus in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v.89, n.3, p.991-995, 1992.
- JACKSON, C.A., DUNN, S.E., SMITH, D.I., GILCHRIST, P.T., MACQUEEN, P.A. Proventriculitis, "nakanuke" and reticuloendotheliosis in chickens following vaccination with herpesvirus of turkeys (hvt). *Aust. Vet. J.*, v.53, n.9, p.457-459, 1977.
- KASHMIRI, S.V., MEHDI, R., GUPTA, P., FERRER, J.F. Methylation and expression of bovine leukemia

proviral DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.129, n.1, p.126-133, 1985.

KIM, T.J., TRIPATHY, D.N. Reticuloendotheliosis virus integration in the fowl poxvirus genome: not a recent event. *Avian Dis.*, v.45, n.3, p.663-669, 2001.

LEWIS, R.B., MCCLURE, J., RUP, B., NIESEL, D.W., GARRY, R.F., HOELZER, J.D., NAZERIAN, K., BOSE JR., H.R. Avian reticuloendotheliosis virus: identification of the hematopoietic target cell for transformation. *Cell*, v.25, n.2, p.421-431, 1981.

LEY, D.H., FICKEN, M.D., COBB, D.T., WITTER, R.T. Histomoniasis and reticuloendotheliosis in a wild turkey (*Meleagris gallopavo*) in North Carolina. *J. Wildl. Dis.*, v.25, n.2, p.262-265, 1989.

MCDOUGALL, J.S., SHILLETTO, R.W., BIGGS, P.M. Further studies on vertical transmission of reticuloendotheliosis virus in turkeys. *Avian Pathol.*, v.10, p.163-169, 1981.

NUOVO, G.J. The utility of in situ--based methodologies including in situ polymerase chain reaction for the diagnosis and study of viral infections. Review. *Hum Pathol.* v.38, n.8, p.1123-1136, 2007.

PAUL, P.S., POMEROY, K.A., SARMA, P.S., JOHNSON, K.H., BARNES, D.M., KUMAR M.C., POMEROY, B.S. Naturally occurring reticuloendotheliosis in turkeys: transmission. *J. Natl. Cancer Inst.*, v.56, n.2, p.419-422, 1976.

PAYNE, L.N. Retrovirus-induced disease in poultry. *Poultry Sci.*, v.77, n.8, p.1204-1212, 1998.

PAYNE, L.N., VENUGOPAL, K. Neoplastic diseases: Marek's disease, avian leukosis and reticuloendotheliosis. *Rev. Sci. Tech.*, v.19, n.2, p.544-564, 2000.

PETERSON, M.J., AGUIRRE, R., FERRO, P.J., JONES, D.A., LAWYER, T.A., PETERSON, M.N., SILVY, N.J.. Infectious disease survey of Rio Grande wild turkeys in the Edwards Plateau of Texas. *J. Wildl. Dis.*, v.38, n.4, p.826-833, 2002.

PETROPOULOS, C.J., HUGHES, S.H. Replication-competent retrovirus vectors for the transfer and expression of gene cassettes in avian cells. *J. Virol.*, v.65, n.7, p.3728-3737, 1991.

PURCHASE, H.G., WITTER, R.L. The reticuloendotheliosis viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, v.71, p.103-124, 1975.

RAMOS-VARA, J.A. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet. Pathol.*, v.42, n.4, p.405-426, 2005.

ROBINSON, F.R., TWIEHAUS, M.J. Isolation of the avian reticuloendothelial virus (strain t). *Avian Dis.*, v.18, n.2, p.278-288, 1974.

SARMA, P.S., JAIN, D.K., MISHRA, N.K., VERNON, M.L., PAUL, P.S., POMEROY, B.S. Isolation and characterization of viruses from natural outbreaks of reticuloendotheliosis in turkeys. *J. Natl. Cancer Inst.*, v.54, n.6, p.1355-1359, 1975.

- SCHAEFER-KLEIN, J., GIVOL, I., BARSOV, E.V., WHITCOMB, J.M., VANBROCKLIN, M., FOSTER, D.N., FEDERSPIEL, M.J., HUGHES, S.H. The EV-O-derived cell line DF-1 supports the efficient replication of avian leukosis-sarcoma viruses and vectors. *Virology*, v.248, n.2, p.305-311, 1998.
- SINGH, P., SCHNITZLEIN, W.M., TRIPATHY, D.N. Reticuloendotheliosis virus sequences within the genomes of field strains of fowlpox virus display variability. *J. Virol.*, v.77, n.10, p.5855-5862, 2003.
- SINGH, P., SCHNITZLEIN, W.M., TRIPATHY, D.N. Construction and characterization of a fowlpox virus field isolate whose genome lacks reticuloendotheliosis provirus nucleotide sequences. *J. Virol.*, v.49, n.3, p.401-408, 2005.
- SOLOMON, J.J., WITTER, R.L., NAZERIAN, K. Studies on the etiology of lymphomas in turkeys: isolation of reticuloendotheliosis in virus. *Avian Dis.*, v.20, n.4, p.735-747, 1976.
- STEDMAN, N.L., BROWN, T.P., BROWN, C.C. Localization of avian leukosis virus subgroup J in naturally infected chickens by RNA *in situ* hybridization. *Vet. Pathol.*, v.38, p.649-656, 2001.
- TANIGUCHI, T., YUASA, N., SATO, S., HORIUCHI, T. Pathological changes in chickens inoculated with reticuloendotheliosis-virus-contaminated Marek's disease vaccine. *Natl. Inst. Anim. Health Q.* (Tokyo), v.17, n.4, p.141-150, 1977.
- UNIVERSITY OF GEORGIA – College of Veterinary Medicine and Georgia Center for Continuing Education. Immunohistochemistry and *in situ* hybridization: a short course. July 18-19, Athens, Georgia: University of Georgia, 1998.
- WANG, J., MEERS, J., SPRADBROW, P.B., ROBINSON, W.F. Evaluation of immune effects of fowlpox vaccine strains and field isolates. *Vet. Microbiol.*, v.116, n.1-3, p.106-119, 2006.
- WILLIAMS, S.M., FITZGERALD, S.D., REED, W.M., LEE, L.F., FADLY, A.M. Tissue tropism and bursal transformation ability of subgroup J leukosis virus in white leghorn chickens. *Avian Dis.*, v.48, n. 4, p.921-927, 2004.
- WITTER, R.L., CRITTENDEN, L.B. Lymphomas resembling lymphoid leukosis in chickens inoculated with reticuloendotheliosis virus. *Int J. Cancer.* v.23, p.673-678, 1979.
- WITTER, R.L., FADLY, A.M. Reticuloendotheliosis, In: *Diseases of poultry*, 11ed. SAIF, Y.M., BARNES, H.J., GLISSON, J.R., FADLY, A.M., MCDUGALD, L.R., SWAYNE, D.E. (eds). Ames, Iowa: Blackwell Publishing Company. pp. 517-536, 2003.
- WITTER, R.L., GLASS, S.E. Reticuloendotheliosis in breeder turkeys. *Avian Dis.*, v.28, n.3, p.742-750, 1984.
- WITTER, R.L., PETERSON, I.L., SMITH, E.J., JOHNSON, D.C. Serologic evidence in commercial chicken and turkey flocks of infection with reticuloendotheliosis virus. *Avian Dis.*, v.26, n.4, p.753-762, 1982.

WITTER, R.L., SALTER, D.W. Vertical transmission of reticuloendotheliosis virus in breeder turkeys. *Avian Dis.*, v.33, n.2, p.226-235, 1989.

WITTER, R.L.; SHARMA, J.M.; FADLY, A.M. Nonbursal lymphomas by nondefective reticuloendotheliosis virus. *Avian Pathol.*, v.15, p.467-486, 1986.

YUASA, N., YOSHIDA, I., TANIGUCHI, T. Isolation of a reticuloendotheliosis virus from chickens inoculated with Marek's disease vaccine. *Natl. Inst. Anim. Health Q.* (Tokyo), v.16, n.4, p.141-151, 1976.

ZAVALA G, CHENG S, BARBOSA T, HAEFELE H. Enzootic reticuloendotheliosis in the endangered Attwater's and greater prairie chickens. *Avian Dis.* v.50, n.4, p.520-525, 2006a.

ZAVALA, G., LUCIO-MARTINEZ, B., CHENG, S., BARBOSA, T. Sarcomas and myelocytomas induced by a retrovirus related to myeloblastosis-associated virus type 1 in White Leghorn egg layer chickens. *Avian Dis.*, v.50, n.2, p.201-208, 2006b.

4. Anexo - Amostras de tecidos fixados em formalina a 10% e incluídos em parafina utilizadas neste estudo, com diagnóstico prévio de infecção pelo VRE.

Caso (blocos)	Origem	Espécie	Casos	Histórico do animal	Fixação*
7052 (1)	Dr. Fadly, United States Department of Agriculture	Galinha	Experimental - inoc. variante SNV do VRE no dia da eclosão	Material colhido aos 140 dias de idade	2 dias
7079 (2)	Dr. Fadly	Galinha	Experimental - inoc. variante SNV do VRE no dia da eclosão	Material colhido aos 179 dias de idade	2 dias
7100 (2)	Dr. Fadly	Galinha	Experimental - inoc. variante SNV do VRE no dia da eclosão	Material colhido aos 126 dias de idade	2 dias
7116 (1)	Dr. Fadly	Galinha	Experimental - inoc. variante SNV do VRE no dia da eclosão	Material colhido aos 57 dias de idade	2 dias
R06-491 (1)	Dr. Zavala, University of Georgia	Codorna	Experimental - inoc. com VRE-APC-566	Não disponível	1 ano
R06-492 (3)	Dr. Zavala	Galinha (Attwater's praire)	Natural - VRE detectado por PCR	Não disponível	1 ano
R06-493 (6)	Dr. Zavala	Perú SPF	Experimental - inoc. com VRE-APC-566	Não disponível	1 ano
A-85746(2)	Dr. Hafner, United States Department of Agriculture	Perú	Não disponível	Não disponível	3 dias
F00-283 (8)	Dr. Prasad, University of California - Davis	Perú	Natural - isolamento e VRE detectado por PCR	Material colhido a 16ª semana de idade	2 dias
F00-699 (17)	Dr. Prasad	Perú	Natural - isolamento e VRE detectado por PCR	Material colhido a 35ª semana de idade	2 dias

* Tempo de fixação em formalina a 10%