

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA

ESTUDO IMUNOBIOQUÍMICO EM
CÉLULAS INFECTADAS PELOS VÍRUS
DA DOENÇA DE MAREK E HERPES DE
PERU

CARLOS EURICO PIRES FERREIRA TRAVASSOS

Itaquai, Rio de Janeiro

1 9 9 3

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA

ESTUDO IMUNOBIOQUÍMICO EM
CELULAS INFECTADAS PELOS VÍRUS
DA DOENÇA DE MAREK E HERPES DE
PERU

CARLOS EURICO PIRES FERREIRA TRAVASSOS

Sob orientação da Professora Ângela Gonçalves da Silva

*Tese submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de
Mestre em Microbiologia Veterinária.*

Itaquai, Rio de Janeiro

1 9 9 3

6-0896079
T 779 e

ESTUDO IMUNOBIOQUÍMICO EM
CELULAS INFECTADAS PELOS VÍRUS
DA DOENÇA DE MAREK E HERPES DE
PERU

CARLOS EURICO PIRES FERREIRA TRAVASSOS

Aprovado em: 29 / 09 / 1993

ANGELA GONÇALVES DA SILVA: Angela Gonçalves da Silva

CLAUDIO DE HORAES ANDRADE: [Assinatura]

RAIMUNDO DIOGO MACHADO: [Assinatura]

ESTUDO IMUNOBIOQUÍMICO EM
CÉLULAS INFECTADAS PELOS VÍRUS
DA DOENÇA DE MAREK E HERPES DE
PERU

CARLOS EURICO PIRES FERREIRA TRAVASSOS

Aprovado em: 29 / 09 / 1993

ANGELA GONÇALVES DA SILVA: Angela Gonçalves da Silva

CLAUDIO DE HORAES ANDRADE: [Assinatura]

RAIMUNDO DIOGO MACHADO: [Assinatura]

TRAVASSOS, Carlos Eurico Pires Ferreira

ESTUDO IMUNOBIOQUÍMICO EM CÉLULAS
INFECTADAS PELOS VÍRUS DA DOENÇA DE MAREK
E HERPES DE PERU.

xvi, 93 f.

Tese: Mestre em Microbiologia Veterinária

1. Vírus da Doença de Marek.

2. Herpesvírus de peru.

3. Imunobioquímica celular.

I - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

II - Título.

A minha esposa e amiga,
pelo estímulo, compreensão
e carinho em todos os
momentos.

*Aos meus pais cujo amor
e exemplo de integridade
foram fundamentais à
minha formação.*

*Aos meus tios Cláudio e
Marieta, pelo apoio e
carinho sempre demonstrados.*

AGRADECIMENTOS

Este é um momento de grande importância quando da conclusão de um trabalho, pois nos é permitido expressar nossa gratidão, a todos que colaboraram conosco. Entretanto, é neste momento que, muitas vezes, incorremos no erro da omissão. Aos que deram um pouco de si, para que hoje este trabalho se faça uma realidade, o nosso muito obrigado.

Em especial, queremos também agradecer:

À Profª Angela Gonçalves da Silva (Departamento de Virologia/UFRJ), orientadora do presente trabalho, pelos incentivos, ensinamentos e amizade sempre demonstrados e pela maneira que me orientou forçando-me a tomar decisões contribuindo muito para o meu amadurecimento profissional.

Ao Prof. Raimundo Diogo Machado, Diretor do Instituto de Microbiologia/UFRJ, pelas sugestões, apoio e orientação prestados.

Ao Prof. Cláudio de Moraes Andrade, que sempre me incentivou e acreditou na minha capacidade de trabalho.

Ao Prof. Ary Moreira de Souza, pelos conhecimentos transmitidos e pelo interesse de pronto atendimento as nossas dificuldades.

Ao Instituto de Microbiologia da UFRJ, pela acolhida e oportunidade oferecida à realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela contribuição à minha formação.

Ao Deptº de Microbiologia e ao Instituto de Veterinária da UFRJ, dirigentes e corpo docente pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Benedito Rangel Filho, pela acolhida e amizade demonstradas.

A amiga Sílvia Regina Ferreira Gonçalves Pereira, pela dedicação e participação ativa durante a realização deste trabalho. Sua determinação na busca de melhores resultados muito contribuiu para a qualidade deste.

A amiga Nilma Porto Gusmão, na qual me espelhei durante a realização dos experimentos pela seriedade e competência por ela demonstrada.

Ao amigo João Baltazar Alves pela amizade, participação e disposição a resolver qualquer dificuldade.

Muito devo ao amigo Agilson dos Santos pela amizade e participação ativa em todas as etapas deste trabalho.

À colega Maria da Graça da Silva Vaz (Deptº de Virologia/UFRJ), pela voluntária ajuda.

Aos amigos do Laboratório de Diagnósticos Especiais do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/UFRJ, Maria Angélica de Moraes Gamelloni, Tereza Cristina Galvão, Marily Curato da Silva, Maria José de Sousa e Salustiano Ferreira Chaves pela amizade e colaboração.

Ao Sr. Mário Otuka pelo apoio à realização deste trabalho através do fornecimento gratuito das aves e da vacina.

Aos Srs Celso Fassine e Paulo Roberto de Andrade Rios pelos serviços fotográficos.

Aos meus sogros, agradeço pelo carinhoso incentivo recebido desde há muito.

BIOGRAFIA

Carlos Eurico Pires Ferreira Travassos, filho de Tarcísio Eurico Travassos e Lúcia Pires Ferreira Travassos, nasceu a 20 de setembro de 1960 em Recife - PE.

Cursou o 1º grau no período de 1968 a 1976 nos colégios Santa Maria, Coração de Maria e Boa Viagem.

Cursou o 2º grau no Colégio Boa Viagem no período de 1977 a 1979.

Prestou vestibular para o curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE em janeiro de 1982, no qual foi aprovado para o 2º semestre do ano corrente.

Colou grau no 2º semestre de 1988.

Estagiou na Companhia de Industrialização do Leite de Pernambuco no setor de Inspeção Industrial e Sanitária de leite e derivados no período de maio a junho de 1989.

Estagiou no Laboratório Regional de Apoio Animal - LARA - PE no período de julho a agosto de 1989.

Trabalhou como Veterinário residente da Coudelaria Souza Leão, Recife - PE, no período de agosto a dezembro de 1989. Solicitou exoneração do cargo para realizar estágio no Centro Panamericano de Febre Aftosa, Duque de Caxias - RJ, no período de janeiro a novembro de 1990.

Foi aprovado para o curso de Mestrado em Microbiologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro no qual ingressou no 1º semestre de 1991.

ÍNDICE

	Página
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 - A Doença de Marek	4
2.2 - Agente Etiológico	4
2.3 - Sintomas Clínicos	6
2.4 - O Vírus da Doença de Marek	7
2.4.1 - Morfologia e Características	
Físico-Químicas	7
2.5 - Cepas Virais	9
2.6 - Isolamento e Cultura	12
2.6.1 - Isolamento	12
2.6.2 - Cultura	13
2.7 - Replicação Viral	14
2.8 - Enzimas Induzidas pelos Vírus	15
2.8.1 - ADN Polimerase	15
2.8.2 - Timidina Cinase	15
2.9 - Proteínas Virais	16
2.10 - Antígenos Virais	17
2.11 - Polipeptídeos Induzidos pelos Vírus	22
2.12 - Antígenos Presentes nas Linhagens	
Celulares	23
2.13 - Vacinação	24
2.13.1 - Resposta Vacinal	26
2.13.2 - Mecanismo da Imunidade Vacinal ...	27

3 - Material e Métodos	30
3.1 - Material	30
3.1.1 - Animais	30
3.1.2 - Vírus	30
3.1.2.1 - Vírus Vacinal	30
3.1.2.2 - Vírus Selvagem	31
3.2 - Método	31
3.2.1 - Animais	31
3.2.2 - Inoculações	31
3.2.3 - Coleta de Material	32
3.2.4 - Preparo das Membranas Celulares ...	33
3.2.5 - Análise de Membranas de Células	
Renais	34
3.2.6 - Coloração do Gel	38
3.2.6.1 - Coloração com Azul de	
Coomassie	38
3.2.6.2 - Coloração com Nitrato de	
Prata	39
3.2.7 - Transferência Eletroforética	41
3.2.8 - Revelação Imunoenzimática	42
4 - Resultados	44
4.1 - Análise Eletroforética das Proteínas de	
Membranas de Células Renais de Galinhas ..	45
4.1.1 - Resultados	45
4.1.2 - Discussão	49
4.1.3 - Conclusão	49

4.2 - Revelação Imunoenzimática	50
4.2.1 - Resultados	50
4.2.2 - Discussão	53
4.2.3 - Conclusão	57
5 - Discussão Geral	58
6 - Conclusão Geral	61
7 - Bibliografia	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1 - Perfil polipeptídico de membranas de células renais obtidas a partir de galinhas - Coloração com Azul de Coomassie	47
Figura 2 - Perfil polipeptídico de membranas de células renais obtidas a partir de galinhas - Coloração com nitrato de prata	48
Figura 3 - Revelação imunoenzimática das proteínas de membranas de células renais de galinhas	52

SUMÁRIO

A Doença de Marek é uma enfermidade neoplásica de galinhas altamente contagiosa e que, desde 1970, é dita controlada por uma vacina a vírus vivo, o herpesvírus de peru (HVT).

Porém, recentemente observou-se o aparecimento de cepas hipervirulentas do vírus da Doença de Marek. Essas cepas, isoladas a partir de plantéis vacinados com HVT, têm provocado quebras nos programas de vacinação. Assim sendo, tornaram-se necessários empreendimentos quanto à pesquisa de moléculas que poderiam ser empregadas em vacinas mais eficazes contra a contaminação pelo vírus selvagem da Doença de Marek.

A identificação de polipeptídeos induzidos pelo vírus selvagem, especialmente aqueles que apresentam reação cruzada com o vírus vacinal, é um pré-requisito para o estudo do mecanismo de proteção.

Todavia, na tentativa de identificar antígenos específicos da infecção viral através de técnicas imunobioquímicas, foram identificados autoanticorpos que reconheciam, praticamente, todas as proteínas presentes no perfil polipeptídico de células renais dos animais controle.

A presença de autoanticorpos impediu a identificação segura de moléculas específicas que pudessem ser empregadas num método de vacinação, mas conduziu a novas perspectivas no estudo da Doença de Marek.

SUMMARY

Marek's Disease is a chickens neoplastic highly contagious character, which is caused by Herpesvirus. Since 1970, this disease had been considered to be under control by a live vaccine, which uses turkey Herpesvirus (HVT) as vaccinal sample.

However, highly virulent wild samples of Marek's Disease have been recently isolated from immunized animals, revealing problems in vaccination programs. Urgent efforts are necessary to identify herpesvirus polypeptides that could be used as more efficient vaccines to control the appearance of new wild samples of Marek's Disease Virus.

The identification of the polypeptides induced by wild virus samples specially those presenting cross reactions with the vaccinal virus sample, was revealed as an important initial step to be developed. This study was designed to investigate the presence of these virus polypeptides, through analysis of kidney cells of vaccinated, infected and control chickens, using immunobiochemical techniques.

The study on those virus-induced polypeptides was able to detect autoantibodies that recognized almost all of these proteins detected in non infected kidney cells. Although the presence of autoantibodies the identification of those specific virus polypeptides, new perspectives were opened for studies on Marek's Disease.

1 - INTRODUÇÃO

A Doença de Marek é uma enfermidade linfoproliferativa das galinhas, altamente contagiosa. Caracteriza-se por uma aplasia dos órgãos linfoides primários (bursa de Fabricius e timo) e por uma queda drástica da competência imunitária, principalmente do tipo celular (Coudert et al, 1988).

Essa doença foi primeiramente descrita em 1907 por Marek e pode ser observada, até os dias de hoje, em todos os países do mundo.

Do ponto de vista econômico, a Doença de Marek é a doença aviária mais grave. Os plantéis afetados apresentam índices de produção menores e a taxa de mortalidade pode atingir até 70%. Nos plantéis de corte, a doença é responsável pela condenação das carcaças na planta de abate em razão dos tumores ou pequenas formações tumorais nas vísceras, músculos e pele.

Desde que foi isolado um herpesvírus a partir de perus (HVT - Herpes Vírus Turkey), ele, até hoje, é utilizado mundialmente na elaboração de uma vacina comercial

contra a Doença de Marek, as perdas econômicas relacionadas a essa doença foram reduzidas. Entretanto, embora essa vacina impeça a formação de tumores, ela não impede uma infecção pelo vírus selvagem da Doença de Marek. Na presença do vírus selvagem, os animais vacinados ou aqueles geneticamente sensíveis à doença, se contaminam, multiplicam o vírus e vão disseminar o vírus contaminante durante toda a sua vida, tornando-se assim, um fator de alto risco para plantéis não vacinados.

Atualmente, em todos os países do mundo onde se pratica uma avicultura em caráter industrial, todos os plantéis são simultaneamente portadores e excretadores do vírus vacinal e do vírus selvagem.

Apesar dessa vacinação, tem-se observado, cada vez com mais frequência, o aparecimento de cepas ditas hipervirulentas que foram isoladas a partir de aves vacinadas com HVT (Eidson et al., 1978, 1981; Witter et al., 1980; Schat et al., 1982a; Powell e Lombardine, 1986; McKimm-Breschkin et al., 1990; Imai et al., 1992). A proteção dos plantéis contra essas cepas hipervirulentas é feita, atualmente, pelo emprego de vacinas bivalentes compostas pelo sorotipo 2 (cepas naturalmente avirulentas) e pelo sorotipo 3 (HVT). Entretanto, na Austrália, recentemente foi isolada uma cepa hipervirulenta (McKimm-Breschkin et al., 1990) a partir de aves vacinadas com vacinas bivalentes.

Devido ao aparecimento dessas cepas, a Doença de Marek será, num futuro próximo, um grave perigo para a

indústria avícola. É extremamente necessária a compreensão do mecanismo de proteção imunitária para ajudar o melhoramento na formulação de novas vacinas.

Este trabalho teve por objetivo verificar como o sistema imune de uma ave de linhagem comercial responde ao estímulo tanto do vírus herpes da Doença de Marek como do vírus herpes de peru, ou seja, o vírus vacinal.

Para tal estudo, nós procuramos:

- primeiramente, verificar as proteínas específicas da infecção induzida pelo vírus selvagem e pelo vírus vacinal comparando os perfis polipeptídicos de membranas de células de animais controles com os de animais infectados pelo vírus vacinal e pelo vírus selvagem, e

- através dos resultados observados, perseguir uma especificidade do sistema imune dos animais quanto ao estímulo induzido seja pelo vírus selvagem da doença de Marek seja pelo vírus herpes de peru.

Pensamos que esse estudo nos ajudaria a compreender o mecanismo da imunidade vacinal induzida pelo vírus herpes de peru e, possivelmente, contribuir para o não aparecimento de novas cepas hipervirulentas.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - A DOENÇA DE MAREK

A Doença de Marek é uma enfermidade linfoproliferativa altamente contagiosa causada por um vírus da família *Herpesviridae*, subfamília *Gamaherpesvirinae*, que se caracteriza pela infiltração nos nervos periféricos por células linfóides e por formação de tumores nos órgãos viscerais, músculos e pele (Calnek, 1980).

A galinha é o hospedeiro natural do vírus da Doença de Marek embora outras aves (peru, codorna, pato, etc.) possam ser infectadas experimentalmente ou terem anticorpos.

2.2 - AGENTE ETIOLÓGICO

Em 1907, Josef Marek descreveu uma doença que paralisava patas e asas de galinhas, caracterizada por um engrossamento dos nervos sacral e espinhal e uma infiltração de células mononucleares nos nervos afetados, sendo

classificada como uma polineurite. A partir daí, numerosos esforços foram realizados pelos pesquisadores na tentativa de identificar o agente etiológico e o modo de transmissão da doença. Em 1924, Van der Walle e Winkle-Junis levantaram a hipótese de que a Doença de Marek poderia ser induzida por um vírus similar ao vírus herpes zoster humano. Devido à sua forte associação à célula, era muito difícil provar que o agente etiológico seria um herpesvírus. Essa propriedade dificultava a compreensão do modo de transmissão da doença e, por isso, era muito confundida com a leucose linfóide, uma outra doença neoplásica das galinhas.

Sevoian et al.(1962) e Biggs e Payne (1963,1967) obtiveram simultaneamente sucesso na transmissão experimental da doença. Biggs e Payne compararam a patologia e o modo de transmissão do agente da Doença de Marek, induzida experimentalmente, com o vírus da Leucose Linfóide Aviária, e observaram fortes evidências quanto à distinção entre as duas doenças. Em 1961, a doença foi classificada e mundialmente aceita como Doença de Marek, até que, finalmente em 1967, Churchill e Biggs identificaram um herpesvírus como o agente etiológico. Entretanto, o conhecimento do modo de transmissão da doença continuava obscuro, até que, em 1969, o vírus da Doença de Marek foi encontrado no epitélio do folículo das penas e o vírus infeccioso pôde ser obtido a partir de extratos de pele das galinhas infectadas (Calnek e Hitchner, 1969; Calnek et al., 1970; Nazerian e Witter, 1970).

Após a descoberta do agente etiológico e também do modo de transmissão da doença, várias cepas do vírus da doença de Marek foram sendo isoladas em diversas partes do mundo.

2.3 - SINTOMAS CLÍNICOS

A sintomatologia da Doença de Marek está diretamente relacionada com a patogenicidade da cepa viral, a constituição genética das aves e a idade das aves quando da exposição ao agente.

A doença pode ocorrer em aves de qualquer idade, mas, geralmente, acomete galinhas de 6 a 20 semanas de idade.

Quatro manifestações clínicas são reconhecidas: a forma clássica (Marek, 1907), a forma aguda (Benton e Cover, 1957; Biggs et al., 1965; Dunlop et al., 1965), a forma ocular (Doyle, 1926; Pappenheimer et al., 1926, 1929 a e b) e uma paralisia transitória (Zander, 1959), que mais tarde foi classificada como uma manifestação encefalítica da infecção pelo vírus da Doença de Marek (Cho et al., 1970; Kenzy et al., 1973).

Na forma clássica, o sinal clínico mais comum é uma incoordenação motora seguida de paralisia parcial ou total das patas e asas. A morbidade e mortalidade gira em torno de 20%.

Na forma aguda, as aves apresentam uma severa depressão e ataxia, algumas delas podendo apresentar

paralisia de patas e asas. Mortalidade sem sintomas é característica dessa forma, sendo que a morbidade e a mortalidade podem ultrapassar 70%.

A forma ocular é mais observada em aves adultas de 6 meses de idade ou mais e se manifesta por uma descoloração progressiva da íris.

O que caracteriza a paralisia transitória é uma repentina paralisia, principalmente das patas e do pescoço, e as aves se recuperam em torno de 1 a 2 dias.

2.4 - O VÍRUS DA DOENÇA DE MAREK

2.4.1 - MORFOLOGIA E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

A estrutura do vírus da Doença de Marek e do herpesvírus de peru (HVT) é típica do grupo herpesvírus. O nucleocapsídeo mede entre 90 e 100 nm de diâmetro e contém 162 capsômeros arranjados em uma simetria icosaédrica (Nazerian e Burmester, 1968).

O capsômero tem um canal central que mede de 9 a 12 nm (Nazerian et al., 1971). O nucleóide mede de 50 a 60 nm e está localizado no centro do nucleocapsídeo (Nazerian, 1974; Nii e Yasuda, 1975). O ADN de filamento duplo tem peso molecular de 120×10^6 (Lee et al., 1971) e a densidade em CsCl (Cloreto de Césio) neutro do vírus da Doença de Marek e do vírus herpes de peru é, respectivamente, de 1,205 e 1,207

g/ml, indicando uma composição básica de 46 - 47% de guanina mais citosina.

Observadas ao microscópio eletrônico, as células em cultura, infectadas pelo vírus da Doença de Marek, demonstraram a presença de 3 tipos de partículas virais: partículas nuas hexagonais localizadas no interior do núcleo e ocasionalmente no citoplasma, pequenas partículas de 35 - 45 nm de diâmetro no núcleo (Nazerian et al., 1971; Okada et al., 1972; Handy et al., 1974) e virions envelopados de 150 - 170 nm de diâmetro nas vesículas nucleares (Witter et al., 1970; Nazerian et al., 1971).

O processo de envelopamento do vírus ocorre através do brotamento a partir da membrana nuclear interna. As partículas envelopadas podem ser encontradas nas vesículas nucleares, no citoplasma, e, raramente, nos espaços extracelulares. Entretanto, um grande número de partículas envelopadas pode ser encontrado no epitélio do folículo das penas, onde o envelope possui uma dupla camada lipídica. Esse vírus envelopado mede entre 200 e 300 nm (Calnek et al., 1970).

Um estudo das características do vírus da Doença de Marek livre das células, obtido de extratos de epitélio do folículo das penas, indicou que o vírus é sensível ao éter. O vírus é estável a -60°C porém não a -20°C. O vírus foi inativado em 2 semanas a 4°C, em 4 dias a 22-25°C, 18 horas a 37°C, 30 minutos a 56°C e 10 minutos a 60°C (Calnek e Adldinger, 1971). O vírus resiste, pelo menos, a quatro

ciclos de congelamento e descongelamento e a 10 minutos de vibração por ultrassom.

A variação de pH de 6,0 a 8,5 não afeta a atividade de infecção, mas o vírus é completamente inativado em um pH inferior a 4,0 e superior a 10,0 (Calnek e Adldinger, 1971). Uma unidade relativa diminui o período de sobrevivência do vírus (Calnek e Hitchner, 1973).

2.5 - CEPAS VIRAIS

De acordo com análises sorológicas efetuadas a partir de testes de imunofluorescência indireta e imunodifusão em gel de Agar, von Bülow e Biggs (1975 a,b) dividiram as cepas do vírus da Doença de Marek em três sorotipos: o sorotipo 1 (MDV₁), que inclui as cepas patogênicas do vírus e cepas atenuadas dessas formas; o sorotipo 2 (MDV₂), que inclui cepas naturalmente apatogênicas e o sorotipo 3 (MDV₃), que inclui o herpesvírus de peru (HVT). Essa classificação foi confirmada por Schat e Calnek, 1978.

Tipo de vírus	Sorotipo	Oncogenicidade	Cepas
MDV	1	+++	Md/5, Ala-8, RB-1B, Md/11
MDV	1	++	MS-1, MS-2 GA, HPRS-16, JM
MDV	1	+	HPRS-17, Conn-A
MDV	1	+/-	Cm-2, CVI-988
MDV	2	-	HPRS-24, SB-1, HN-1
HVT	3	-	FC 126, WTHV-1, HPRS-26

* Graus de oncogenicidade:

+++ - Cepas hipervirulentas, que causam a Doença de Marek em linhagens de galinhas geneticamente sensíveis vacinadas e naquelas geneticamente resistentes não vacinadas.

++ - Cepas virulentas, que causam alta incidência da Doença de Marek em linhagens de aves susceptíveis e nenhuma ou pouca incidência da Doença de Marek em linhagens de galinhas geneticamente resistentes.

+ - Cepas de virulência moderada, que causam moderada ou baixa incidência da Doença de Marek em galinhas geneticamente susceptíveis.

+/- - Cepas de baixa virulência, que causam lesões mínimas em linhagens de galinhas

geneticamente susceptíveis.

- - Cepas não virulentas, que também podem causar lesões mínimas em galinhas geneticamente susceptíveis.

Existe uma grande diversidade quanto ao potencial oncogênico dentro do sorotipo 1. Este inclui:

- as cepas hipervirulentas como: MD-5, Ala-8, RB-1B, MS-1 e MS-2 (Witter e Fadly, 1980; Eidson et al., 1981; Schat et al., 1982 b; Imai et al., 1992), que foram isoladas a partir de plantéis de galinhas vacinadas com HVT;
- as cepas virulentas, como: GA (Eidson e Schmittle, 1968), HPRS-16 (Purchase e Biggs, 1967) e JM (Sevoian et al., 1962);
- as cepas de virulência moderada, como: HPRS-17 (Purchase e Biggs, 1967) e CONN-A (Chomiak et al., 1967);
- as cepas de baixa virulência, como: CV-2 (Smith e Calnek, 1973) e CVI-988 (Rispen et al., 1972 b).

O sorotipo 2 inclui as cepas naturalmente não virulentas como: HPRS-24 (Biggs e Milne, 1972), SB-1 (Schat e Calnek, 1978) e HN-1 (Cho e Kenzy, 1972).

O sorotipo 3 inclui as cepas naturalmente não virulentas de HVT como: FC-126 (Witter et al., 1970), e WTHV-1 (Kawamura et al., 1969).

A existência desses sorotipos foi demonstrada pela neutralização viral (King et al., 1981), pela eletroforese bi-dimensional (van Zaane et al., 1982 b), pela utilização de anticorpos monoclonais (Lee et al., 1983) e, recentemente,

pela comparação da estrutura do genoma viral de cepas dos três sorotipos pela técnica de SDS-PAGE e consequente revelação imunoenzimática com uso de anticorpos monoclonais (Hirai et al., 1986).

2.6 - ISOLAMENTO E CULTURA

2.6.1 - ISOLAMENTO

O vírus da Doença de Marek está amplamente espalhado nos órgãos de galinhas infectadas e, dessa forma, uma grande variedade de tecidos pode ser usada para o isolamento do vírus. O sangue, a suspensão celular de tecido tumoral, o rim e o baço são comumente usados. Geralmente é preferível o isolamento a partir do sangue, pois várias amostras podem ser retiradas de um mesmo doador. No sangue, a infecciosidade está associada à fração de linfócitos.

Todos os sorotipos do vírus da Doença de Marek e do HVT podem ser isolados a partir de linfócitos. Só o sorotipo 1 pode ser isolado a partir de células linfoblastóides (Ross et al., 1977).

Para o isolamento a partir de tecidos, é importante destacar que o vírus da Doença de Marek e o HVT estão fortemente associados às células e, devido a essa característica, é extremamente importante que as amostras para isolamento consistam de células viáveis. Devido a essa característica, muito poucas ou nenhuma partícula viral livre

da célula são liberadas no meio de cultura (Witter et al., 1970; Sharma, 1971; Churchill, 1968; Calnek e Madin, 1969). Calnek et al. (1970) verificaram que partículas virais livres das células podem ser obtidas de cultura de células infectadas por tratamento com ultrassom na presença de um estabilizador. Entretanto, o procedimento de rotina para a obtenção de partículas virais envelopadas livres das células é feito a partir de extratos do epitélio do folículo das penas de galinhas infectadas pelo vírus da Doença de Marek ou de perus infectados com o HVT.

2.6.2 - CULTURA

O vírus da Doença de Marek e o HVT podem ser propagados em uma grande variedade de culturas de células aviárias: cultura em células de baço ou rim de galinhas, células de rim de embrião de galinhas e células de fibroblastos de embrião de galinha, pato ou codorna (Schat, 1985). As células de rim de galinha e fibroblasto de embrião de pato são recomendadas para o isolamento primário do vírus (Churchill, 1968; Purchase et al., 1971; Solomon et al., 1968). Em cultura de monocamadas de fibroblasto de embrião de galinha o vírus se replica e provoca efeito citopático, mas a produção viral é menor do que nas culturas de células de rim ou fibroblasto de embrião de pato (Nazerian, 1970). Em culturas de fibroblasto de embrião de galinha, as propriedades dos vírus se modificam mais rapidamente do que

sobre culturas de células de rim de galinhas ou células de embrião de pato (Ross et al., 1973).

Várias tentativas de replicação do vírus da doença de Marek e do vírus herpes de peru em células de mamíferos foram realizadas, sem jamais poderem provar uma possibilidade de replicação desses vírus nessas células (Hlozanek e Sovoya, 1974).

2.7 - REPLICAÇÃO VIRAL

Diferentes tipos de interação vírus-célula são reconhecidos durante a replicação do vírus da Doença de Marek e do vírus herpes de peru: a infecção produtiva, a infecção produtiva restritiva e a infecção não produtiva. Esses tipos de interação são similares a todos os tipos de interações descritas para outros herpesvírus oncogênicos (Roizman, 1972).

A infecção produtiva resulta na lise celular após a multiplicação e liberação de partículas virais envelopadas livres da célula. Esse tipo de interação só é observada no epitélio do folículo das penas e pode ser realizada pelos três sorotipos do vírus da Doença de Marek (Calnek et al., 1970; Witter et al., 1972; Schat e Calnek, 1978).

A infecção semi-produtiva ou restritiva se caracteriza pela presença de vírus associado à célula, portanto essas partículas virais intracelulares não são envelopadas.

Na infecção não produtiva não há multiplicação viral. Nesse tipo de infecção, a função viral sempre está caracterizada pela transformação maligna da célula hospedeira. Todos os vírus do sorotipo 1 do vírus da doença de Marek são capazes de induzir a transformação neoplásica das células T (Ross et al., 1977).

Uma das características principais do vírus da doença de Marek e do HVT é que eles estão extremamente associados às células, com exceção do epitélio do folículo das penas onde partículas virais envelopadas são liberadas para o meio externo.

2.8 - ENZIMAS INDUZIDAS PELOS VÍRUS

2.8.1 - ADN POLIMERASE

Após a infecção das células, o vírus selvagem da Doença de Marek e o vírus vacinal (HVT) induzem a produção de uma polimerase específica do vírus. Essa enzima pode ser diferenciada da polimerase celular pelo seu peso molecular (100×10^3 Da) e por sua sensibilidade ao sulfato de amônio (Boezi et al., 1974).

Algumas cepas mutantes do vírus da doença de Marek resistentes ao fosfonoacetato (um inibidor da ADN polimerase) induzem uma polimerase com propriedades alteradas que, segundo Lee et al. (1976) e Reno et al. (1978), é provavelmente codificada pelo vírus.

2.8.2 - TIMIDINA CINASE

A timidina cinase induzida pelos herpesvírus são produzidas no início da expressão do genoma viral (Honess e Roizman, 1974; Preston, 1979). Tanto o vírus selvagem da Doença de Marek como o vírus vacinal (HVT) induzem uma atividade timidina cinase em células infectadas (Kit et al., 1973; Schat et al., 1984). Essa enzima pode ser diferenciada da cinase celular por sua localização no citosol, mas não na mitocôndria, devido ao seu alto coeficiente de sedimentação (5,3 S) e por seu ponto isoelétrico (6,1).

2.9 - PROTEÍNAS VIRAIS

Uma característica marcante do vírus da Doença de Marek é a sua forte associação à célula hospedeira. Essa característica tem impedido a obtenção, em quantidades suficientes, de partículas virais envelopadas a partir de células em cultura para análises bioquímicas. Sabe-se que os três sorotipos do vírus da Doença de Marek se espalham horizontalmente através da liberação de partículas infecciosas do vírus da Doença de Marek envelopadas livres das células no epitélio do folículo das penas. Entretanto, a obtenção dessas partículas não tem sido totalmente satisfatória. Devido a essa dificuldade pouco se sabe sobre as proteínas estruturais do vírus da Doença de Marek. Todavia, a caracterização das glicoproteínas do envelope

viral, que interagem com os anticorpos neutralizantes, pode ser realizada pela imunoprecipitação de extratos celulares marcados por elementos radioativos ou pela utilização de anticorpos monoclonais (Ikuta et al., 1984; Silva e Lee, 1984, 1985). Através da utilização dos anticorpos monoclonais foi demonstrada a presença de três glicoproteínas com pesos moleculares de 115/110, 63 e 50×10^3 Da, comuns aos três sorotipos do vírus da Doença de Marek (Silva e Lee, 1984, 1985).

Por outro lado, os nucleocapsídeos podem ser facilmente purificados. Em um experimento preliminar, através da análise por eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida, foi demonstrada a presença de outras glicoproteínas com pesos moleculares de 140, 50, 35 e 32×10^3 Da (Ross, 1985).

2.10 - ANTÍGENOS VIRAIS

O vírus vacinal (HVT) e o vírus da Doença de Marek são imunologicamente relacionados (Okasaki et al., 1970; van Zaane et al., 1982 a e 1982 b). Um grande número de polipeptídeos são aparentemente comuns entre esses vírus (van Zaane et al., 1982 a e b; Ikuta et al., 1984; Silva e Lee, 1985) incluindo entre eles os três maiores antígenos comuns, que são os antígenos A, B e C (Nazerian, 1980; Nonoyama, 1982; Payne, 1982), sendo que os antígenos A e B foram mais estudados.

- ANTÍGENO A

O antígeno A foi originalmente encontrado no meio de cultura e em menor quantidade em extratos de células infectadas pelo vírus da Doença de Marek (Churchill et al., 1969a). Este antígeno levantou um interesse especial dos pesquisadores pois foi verificado que, após a atenuação do vírus da doença de Marek por passagens sucessivas em cultura, resultava a perda do antígeno A (Churchill et al., 1969a). Isso levou à especulação de que esse antígeno poderia estar envolvido na natureza oncogênica do vírus. Entretanto, o antígeno A também foi encontrado em culturas de células infectadas com cepas naturalmente não patogênicas (Witter et al., 1970; Purchase et al., 1971; Nazerian, 1980) e também com vírus vacinal HVT (Witter et al., 1970; Nazerian, 1980; Glaubiger et al., 1983).

Vários estudos revelaram que o peso molecular do antígeno A variava entre 45-90 KDa (Ross, 1973; Long et al., 1975; Ikuta et al., 1981, 1983a, b; van Zaane et al., 1982a, b; Glaubiger et al., 1983).

Com relação ao seu ponto isoelétrico, vários experimentos revelaram que ele pode variar de 4,5 a 5,5 (Ross et al., 1973) podendo chegar até 6,8 (Long et al., 1975). Essas diferenças se devem ao fato de que esse antígeno foi estudado em sua forma nativa e que ele está sujeito a uma agregação polipeptídica (Ross, 1985).

Segundo Isfort et al. (1986), a glicoproteína gp

57.000-65.000 Da, (gp 57-65) é, primeiramente, sintetizada como um polipeptídeo precursor, com aparente peso molecular de 44.000 Da.

Embora o antígeno A (gp 57-65) seja uma das primeiras proteínas reconhecidas pelo soro das galinhas infectadas pelo vírus da Doença de Marek ou pelo vírus vacinal HVT, Kato e Hirai (1985) observaram que o antígeno A purificado a partir do vírus vacinal HVT, quando inoculado em galinhas, não provocava uma resposta de anticorpos neutralizantes. Foi postulado que o antígeno A (gp 57-65) tem um papel imunoevasivo na patogênese da Doença de Marek e que ele pode ser responsável pelo início da imunossupressão que ocorre após a infecção pelo vírus da Doença de Marek (Isfort et al., 1986, 1987). Entretanto seu preciso papel, se é que existe algum na imunoprevenção ou patogênese da Doença de Marek, não está claro.

- ANTÍGENO B e C

Ao contrário do antígeno A, que foi encontrado simultaneamente no meio de cultura e em extrato celular, os antígenos B e C foram encontrados unicamente no extrato de células infectadas tanto pelo vírus vacinal (HVT) como pelo vírus selvagem da Doença de Marek.

O antígeno B foi inicialmente purificado e caracterizado como uma glicoproteína que, apesar de apresentar algumas características similares ao antígeno A,

como a sua resistência a um pH 2,0 e a um tratamento com uréia a 1 M e ao detergente Brij 35 a 0,05%, pode ser diferenciado pelo seu ponto isoelétrico 4,54 e pelo seu coeficiente de sedimentação 4,4 S, sendo seu peso molecular aparentemente compreendido entre 58.000 e 69.000 Da (Velicer et al., 1978).

Entretanto, a identificação e caracterização molecular do antígeno B como sendo um complexo de três glicoproteínas imunologicamente relacionadas (gp 100, gp 60, e gp 49), de acordo com o peso molecular e imunoprecipitação com anticorpos policlonais e monoclonais para o antígeno B, só foram realizadas mais tarde (Ikuta et al., 1984; Silva e Lee, 1984, 1985; Isfort et al., 1986).

Vários estudos foram efetuados para identificar os polipeptídeos precursores dessas três glicoproteínas (gp 100, 60 e 49). Empregando células infectadas pelo vírus vacinal (HVT) e pelo vírus da Doença de Marek e utilizando, em vários intervalos de tempo, anticorpos monoclonais para a imunoprecipitação de proteínas induzidas pelo vírus, foi verificado que os anticorpos reagem com as três glicoproteínas. Também foi observado que o desaparecimento da gp 100 coincide com o aparecimento das glicoproteínas gp 60 e 49, sugerindo que a glicoproteína gp 100 pode ser clivada para formar as glicoproteínas gp 60 e 49 (Ikuta et al., 1984; Silva e Lee, 1984, 1985).

Ikuta et al. (1984), utilizando lisados de células infectadas tanto pelo vírus vacinal (HVT) como pelo vírus da

Doença de Marek tratadas com a tunicamicina, detectaram, com anticorpos monoclonais, uma proteína com 88 KDa classificada como um polipeptídeo precursor.

Em um estudo semelhante, Silva e Lee (1985) detectaram uma proteína de 44 KDa, classificada como um polipeptídeo precursor, porém não identificaram o polipeptídeo precursor de 88 KDa identificado anteriormente por Ikuta et al. (1984), sugerindo assim que as células infectadas necessitam de um pequeno espaço de tempo para realizar a glicosilação.

Recentemente um estudo através da imunoprecipitação com anticorpos monoclonais de lisados de células infectadas tanto pelo vírus vacinal (HVT) como pelo vírus da Doença de Marek, marcadas com metionina 35 na presença da tunicamicina, revelou a presença das duas moléculas precursoras de 88 KDa e de 44 KDa (Isfort et al., 1986). Em continuação a esse trabalho, Sithole et al. (1988) revelaram que a glicoproteína gp 100 foi clivada para formar as glicoproteínas gp 60 e 49. Com a utilização das enzimas Endo- β -N-acetilglucosaminase F e H a gp 100 foi reduzida para uma proteína precursora (pr 88), indicando que a mesma é uma proteína intermediária. Essas mesmas enzimas reduziram as gp 49 e 60 para uma proteína precursora (pr 44), sugerindo que a mesma é a proteína principal para a formação do antígeno B. Com esses resultados, Sithole et al. (1988) chegaram a conclusão que a pr 44 é o produto inicial que é dimerizado para a pr 88, um polipeptídeo intermediário para a formação da gp 100, e vai

ser clivada para o processo de formação da gp 60 e da gp 49.

A evidência de que a neutralização viral pode ser alcançada com anticorpos monoclonais que imunoprecipitam as três glicoproteínas (gp 100, gp 60 e gp 49), identificadas como o complexo antígeno B (Isfort et al., 1986) que originalmente foi apresentado por Ikuta et al. (1984) e Silva e Lee (1984), sugerem que algumas dessas glicoproteínas podem ser o antígeno responsável pela geração de anticorpos neutralizantes "in vivo" (Ono et al., 1985).

2.11 - POLIPEPTÍDEOS INDUZIDOS PELOS VÍRUS

Ikuta et al., 1981 e Van Zaane et al., 1982a,b, identificaram mais de 40 polipeptídeos específicos do vírus da Doença de Marek e do vírus vacinal (HVT) em extratos de células infectadas. Seus pesos moleculares variam de 19 KDa a 350 KDa através da imunoprecipitação com soro policlonal. Porém, as proteínas estruturais e não estruturais não foram diferenciadas. Seis tipos de polipeptídeos foram identificados por anticorpos monoclonais. Essas proteínas são: glicoproteína A (Ikuta et al., 1983a,b; Hirai et al., 1986), glicoproteína B (Ikuta et al., 1984; Silva e Lee, 1984; Ono et al., 1985; Hirai et al., 1986), um maior polipeptídeo vírus específico (Ikuta et al., 1984), proteína ligada ao ADN (Nakajima et al., 1986), proteína não ligada ao ADN (Nakajima et al., 1986) e polipeptídeos fosforilados (Ikuta et al., 1985; Naito et al., 1986; Nakajima et al.,

1987).

2.12 - ANTÍGENOS PRESENTES NAS LINHAS CELULARES

Um dos processos mais importantes que ocorre após a infecção de galinhas pelo vírus da Doença de Marek é a transformação das células T levando à formação de linfomas (Murthy e Calnek, 1978).

Células que apresentam o antígeno de superfície associado ao tumor da Doença de Marek - MATSA (Marek associated tumor surface antigen) foram demonstradas em aves infectadas, tanto pelo vírus da Doença de Marek como pelo herpesvírus de peru, em linhagens de células derivadas de linfomas da Doença de Marek (Powell et al., 1974, 1984; Witter et al., 1975; Nazerian et al., 1977; Powell & Rennie, 1978; Schat & Calnek, 1978; Kitamoto et al., 1979; Liu et al., 1983). Essas observações foram confirmadas, recentemente, por Pradhan et al. (1991). Apesar da natureza não oncogênica do herpesvírus de peru, células positivas para MATSA foram detectadas em aves vacinadas. Schat & Calnek (1978) sugeriram que o antígeno MATSA é expresso, não somente sobre linfócitos transformados mas, também, sobre todos os linfócitos infectados pelo vírus da Doença de Marek ou pelo herpesvírus de peru.

Outros antígenos foram detectados nas linhagens de células derivadas de linfomas da Doença de Marek tais como: um antígeno fetal de galinha (Murthy et al., 1979; Neuman,

1980), um antígeno maior de histocompatibilidade de galinha (Witter et al., 1975; Coleman & Schierman, 1980; Mikami et al., 1980; von Bülow & Schmid, 1980; Yamaguchi et al., 1979) e um antígeno similar ao antígeno Ia de camundongo (Schat et al., 1982a).

2.13 - VACINAÇÃO

A vacinação de pintos de um dia é o método preferido para o controle da Doença de Marek, sendo mundialmente usado.

A Doença de Marek é controlada por vacinas a vírus vivo, baseadas sobre os três sorotipos do vírus da Doença de Marek. Existem basicamente quatro tipos de vacinas:

* Vacinas produzidas com cepas do sorotipo 1.

A primeira vacina contra a Doença de Marek foi preparada por Churchill et al (1969 a, b) utilizando a cepa HPRS-16, atenuada por passagens sucessivas em culturas de células. Uma desvantagem dessa vacina é que, após a atenuação, o vírus não mais se dissemina horizontalmente.

Rispens et al (1972 a) prepararam uma vacina com a cepa CVI-988, que também pertence ao sorotipo 1, porém é de baixa virulência. Essa vacina apresenta uma vantagem sobre outras vacinas do sorotipo 1, pois apresenta o antígeno A e se dissemina horizontalmente de um animal para outro,

permitindo assim a vacinação de uma pequena porcentagem de animais que vão excretar o vírus vacinal pelo epitélio do folículo das penas e assim infectar os animais não vacinados que ficarão protegidos (Rispiens et al., 1972 b). Entretanto, na prática, esse procedimento é arriscado, pois os animais não vacinados podem se infectar com o vírus selvagem oncogênico antes que o vírus vacinal possa se disseminar nos plantéis.

* Vacinas produzidas com cepas do sorotipo 2

A eficácia dessas vacinas foi primeiramente observada por Zander et al. (1972), quando vacinavam aves com sangue de galinhas infectadas pela cepa HN-1, e por Biggs et al (1972, 1973) que verificaram lotes previamente expostos às cepas do sorotipo 2, a nível de campo, e que apresentavam baixas perdas ocasionadas pela Doença de Marek quando comparadas a outros lotes.

Schat e Calnek (1978) isolaram a cepa SB-1 que se mostrou eficaz contra cepas virulentas do vírus da doença de Marek. Essa cepa é bem empregada comercialmente como vacina e seu maior uso é em combinação com cepas do sorotipo 3 como vacinas bivalentes (HVT + SB-1).

* Vacinas produzidas com cepas do sorotipo 3.

As vacinas derivadas do vírus herpes de peru são

altamente efetivas e são consideradas como o padrão das vacinas contra a Doença de Marek. Essas vacinas impedem a formação de tumores mas não impedem a infecção pelo vírus selvagem da Doença de Marek e o animal vacinado vai albergar o vírus vacinal e o vírus selvagem durante toda a sua vida. Essas vacinas geralmente são produzidas com a cepa FC-126 que foi isolada por Witter et al. (1970).

* Vacinas bivalentes.

Com o surgimento de cepas ditas hipervirulentas que foram isoladas de plantéis vacinados com HVT, fez-se necessário o emprego de vacinas bivalentes que geralmente são compostas de cepas do sorotipo 2 e 3 (FC-126 + SB-1). A proteção dos plantéis contra as cepas hipervirulentas é feita atualmente pelo emprego dessas vacinas.

2.13.1 - RESPOSTA VACINAL

A resposta vacinal está diretamente relacionada à idade, ao estado imunológico e à constituição genética das aves.

Para a obtenção de uma boa proteção pela vacinação é necessário um período de mais ou menos uma semana sem contato com o vírus selvagem (Okazaki et al., 1971).

A maioria das aves vacinadas, na idade de um dia, com o vírus herpes de peru, desenvolve uma viremia entre 6 e

7 dias pós vacinação (Phillips e Biggs, 1972; Zygraich e Huygelen, 1972; Witter et al., 1976). O nível da viremia é máximo entre 8 e 15 dias pós vacinação, seguido de uma queda do título observada entre 22 e 29 dias pós vacinação (Witter et al., 1976). Os anticorpos neutralizantes aparecem na primeira semana, chegando a um pico entre a quarta e a quinta semana.

Nas aves vacinadas com cepas do sorotipo 1 atenuadas (cepa HPRS-16), a viremia e a produção de anticorpos aparecem mais tarde e os níveis são maiores que os produzidos pelo vírus herpes de peru (Phillips e Biggs, 1972; Jackson et al., 1974).

Qualquer que seja a vacina empregada, a vacinação confere uma proteção significativa, mas não absoluta, e a incidência da doença entre as aves vacinadas é colocada em relação à sua sensibilidade à doença (Spencer et al., 1972; Zanella et al., 1975; Gavora et al., 1977).

2.13.2 - MECANISMO DA IMUNIDADE VACINAL

De acordo com Kato e Hirai (1985) existem três alvos da imunidade vacinal: o virion do vírus selvagem, as células infectadas por este vírus e as células tumorais.

O primeiro alvo, os virions do vírus selvagem, são implicados principalmente nas respostas de anticorpos neutralizantes. Após a infecção com vírus selvagem através do sistema respiratório das aves vacinadas, os anticorpos

neutralizantes diminuem a extensão da viremia. Entretanto, a reação de neutralização não é suficiente para suprimir a replicação precoce do vírus selvagem entre as aves vacinadas, pois as aves multiplicam simultaneamente o vírus selvagem e o vírus vacinal.

O segundo alvo é representado pelas células B infectadas pelo vírus selvagem (Calnek, 1986). Estas células têm alguns antígenos de superfície celular que apresentam uma reação cruzada com todos os antígenos presentes nas células infectadas pelo vírus vacinal. Neste caso a resposta imune não pode ser diferenciada. O soro das aves infectadas com o sorotipo 1 da Doença de Marek apresenta uma resposta de citotoxicidade, tanto por intermédio de células citotóxicas ativas em presença de anticorpos (ADCC), como por anticorpos e o sistema complemento contra as células infectadas pelo vírus selvagem. O soro das aves infectadas pelo vírus vacinal mostra uma atividade ADCC contra as células infectadas pelo vírus selvagem (Sugimoto et al., 1978; Kitamoto et al., 1979; Kodama et al., 1979b; Adldinger, 1980; Ross, 1980). Entre as aves infectadas com vírus vacinal ou com sorotipo 1 oncogênico, foi demonstrada uma atividade de citotoxicidade das células T (killer cells) e de macrófagos contra as células infectadas pelo vírus selvagem (Ross, 1977; Kodama et al., 1979b; Lee, 1979). Recentemente Schat e Heller (1985) detectaram uma atividade de células *natural killer* entre as aves infectadas pelo vírus vacinal. Essas respostas imunes contra as células infectadas pelo vírus

selvagem podem ser importantes para reduzir a viremia, mas essa redução parece ser insuficiente para determinar uma ausência de células infectadas entre os animais vacinados.

As células neoplásicas são o terceiro alvo da imunidade vacinal. Como essas células expressam vários antígenos *non self* sobre sua superfície celular que não são expressos sobre a superfície das células infectadas, esses antígenos podem ser também os antígenos alvo da resposta vacinal. Assim, as células T assassinas (killer cells) e os macrófagos das aves infectadas com o vírus selvagem ou com o vírus vacinal podem mostrar uma capacidade de citotoxicidade contra as linhagens celulares da Doença de Marek mantidas "in vitro" (Fowell, 1976; Sharma e Coulson, 1977; Lee et al., 1978; Scharma et al., 1978; Kitamoto et al., 1979; Lee, 1979; Dambrini et al., 1980).

Entretanto, até o momento, todos esses pontos são hipóteses e têm gerado controvérsias entre os diferentes grupos que trabalham sobre esse problema.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - MATERIAL

3.1.1 - ANIMAIS

Foram utilizadas 75 galinhas de uma linhagem comercial de corte, com um dia de vida. É importante salientar que os animais foram de uma mesma eclosão.

3.1.2 - VÍRUS

3.1.2.1 - Virus Vacinal:

- HVT FC-126 (Herpes Virus Turkey)

Foi utilizada uma vacina comercial liofilizada contra a Doença de Marek, produzida em ovo SPF Cotai negativo.

3.1.2.2 - Vírus Selvagem:

- HPRS-16 (Houghton Poultry Research Station)

Essa cepa foi isolada por Purchase e Biggs, em 1967. O inóculo empregado no experimento era constituído de sangue de um doador infectado, no qual o vírus está fortemente associado às células sanguíneas.

3.2 - MÉTODOS

3.2.1 - ANIMAIS

Os 75 animais foram divididos aleatoriamente em três grupos de 25 animais cada, sendo que o grupo 1 correspondia aos animais controle, o grupo 2 aos animais infectados pelo vírus vacinal HVT (Herpes Vírus Turkey) e o grupo 3 aos animais infectados com a cepa selvagem, HPRS-16 do vírus herpes da Doença de Marek. Os três grupos foram colocados em isoladores distintos e em idênticas condições.

3.2.2 - INOCULAÇÕES

Os animais foram inoculados 28 (vinte e oito) dias após o nascimento, prazo suficiente para a eliminação dos anticorpos maternos.

Os animais do grupo 2 foram inoculados cada um com

0,2 ml da vacina comercial contra a Doença de Marek pela via subcutânea. Os animais do grupo 3 foram inoculados cada um com 0,2 ml de sangue de um doador infectado pela cepa HPRS-16 na coxa, pela via intramuscular.

3.2.3 - COLETA DE MATERIAL

Os animais foram sacrificados com intervalos de 7, 14, 17, 20, 23, 27, 30, 34, 37 e 41 dpi (dias pós-inoculação), retirando-se a cada intervalo eram retirados dois animais de cada grupo.

Foram coletados, em média, 30 ml de sangue por punção cardíaca com agulha e seringa estéreis para a obtenção do soro. O soro foi diluído a 1:2 em glicerina pura estéril, para melhor conservação do título de anticorpos, e estocado a -20°C para posterior revelação imunoenzimática.

Após o sacrifício dos animais por embolia gasosa, foi feita a extirpação do órgão alvo (rim) que foi, imediatamente, colocado em uma placa de Petri com PBS, pH 7,2 para, em seguida, serem preparadas as membranas celulares.

3.2.4 - PREPARO DAS MEMBRANAS CELULARES

3.2.4.1 - REAGENTES

* FBS

- Solução A

- KH_2PO_4 a 0,1 M

- Solução B

- Na_2HPO_4 a 0,1 M

- Solução de trabalho (pH 7,2)

- Solução A 28,5 ml

- Solução B 71,5 ml

* Tampão detergente

- Tris HCl , pH 7,0 10,0 ml

- Sacarose 500,0 ml

- MgCl_2 5,0 ml

- EDTA 0,2 ml

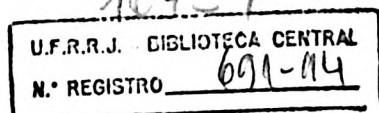
- Triton 1%

- PMSF 2,0 ml

PMSF (Fenilmetilsulfonilfluoride)

3.2.4.2 - TÉCNICA

Em uma placa de Petri com FBS, pH 7,2, cortar o rim em pequenos pedaços e colocá-los em um Ten Broeck para dissociar as células.



Em seguida, centrifugar a suspensão celular a 1600 x g durante 10 minutos a 4 °C.

Desprezar o sobrenadante e ressuspender o sedimento para uma concentração de 10^7 células/ml em tampão detergente e deixar em uma cuba com gelo para que ocorra a lise das células.

Centrifugar a suspensão de membranas a 5000 x g durante 20 minutos a 4 °C, recuperar o sobrenadante e colocar, para cada 2 ml da suspensão de membranas, 8 ml de etanol durante uma noite a -20 °C.

No dia seguinte centrifugar a suspensão de membranas a 5000 x g durante 20 minutos a 4 °C, podendo ressuspender o sedimento em FBS, pH 7,2 para estocar a -20 °C ou em tampão de solubilização para posterior corrida eletroforética.

3.2.5 - ANÁLISE DE MEMBRANAS DE CÉLULAS RENAIIS

Feita em sistema para eletroforese Protean II Bio Rad com placa 16x16 cm e espaçadores de 0,75 mm de espessura.

3.2.5.1 - REAGENTES

* Tampão de solubilização

- Tris HCl 0,5 M, pH 6,8 1,0 ml
- Glicerol 0,8 ml
- SDS 10% 1,6 ml

- Beta mercaptoetanol 0,4 ml

- Azul de bromofenol 0,2 ml

Obs.: 25 mg de Azul de bromofenol diluido em 10 ml de Tris HCl 0,0625 M, pH 6,8.

* Solução A

- Acrilamida (p/v) 44,0%

- Bis acrilamida (p/v) 0,8%

* Solução B

- Tris HCl 0,75 M, pH 8,8

* Solução C

- Persulfato de amônio a 1%

* Solução D

- Duodecil sulfato de sódio (SDS) a 10%

* Solução E

- Tris HCl a 6%, pH 6,8

- SDS a 0,4%

* Solução F

- Acrilamida (p/v) 29,2%

- Bis acrilamida (p/v) 0,8%

* Solução G

- Persulfato de amônio (p/v) 10,0%

* TEMED (N,N,N,N Tetrametiletilene diamine)

* H₂O destilada pH 7,0

* Tampão de eletroforese

- Tris HCl, pH 8,3 3,02 g

- Glicina 14,40 g

- SDS 1,00 g

- H₂O destilada q.s.p. 1000,00 ml

Volumes necessários para o preparo do:

Gel de separação a 10%

Solução	Gel de 16x16 cm (ml)	Gel de 9x9 cm (ml)
A	25,00	5,50
B	50,00	10,96
C	2,52	0,56
H ₂ O dest.	20,48	4,50
DEGASAGEM		
D	2,00	0,44
TEMED	0,20	44 µl
Vol. final	100,20	22,00

Gel de concentração a 4%

Solução	Gel de 16x16 cm (ml)	Gel de 9x9 cm (ml)
E	5,00	2,50
F	3,00	1,50
G	60 µl	30 µl
H ₂ O dest.	12,00	6,00
DEGASAGEM		
TEMED	40 µl	20 µl
Vol. final	20,10	10,05

3.2.5.2 -- TÉCNICA

Após a montagem das placas no suporte, colocar o gel de separação pelo canto da placa, para evitar a formação de bolhas, até a altura desejada de, mais ou menos, 4 cm abaixo da placa de 16x16 cm.

Colocar um pouco de álcool isopropílico para nivelar o gel e eliminar bolhas.

Após a polimerização do gel de separação lavar a superfície do gel com água destilada para retirar todo o álcool isopropílico.

Em seguida colocar os pentes e introduzir o gel de concentração, levantando e abaixando os pentes para eliminar as bolhas.

Após a polimerização do gel de concentração retirar os pentes e colocar as placas na cuba com tampão de eletroforese.

Aplicar de 10 a 60 μ l da amostra.

A corrida eletroforética é realizada com uma corrente elétrica de intensidade constante de 40 mA para o gel de concentração e 60 mA para o gel de separação.

Após o término da corrida, retirar os géis que podem ser corados ou levados para se fazer a transferência das proteínas para a folha de nitrocelulose.

3.2.6 - COLORAÇÃO DO GEL

3.2.6.1 - COLORAÇÃO COM AZUL DE COOMASSIE

3.2.6.1.1 - REAGENTES

* Solução de fixação

- Ácido acético	400,0 ml
- Metanol	100,0 ml
- H ₂ O destilada q.s.p.	1000,0 ml

* Solução de coloração

- Azul de Coomassie	0,5 g
- Metanol	250,0 ml
- Ácido acético	50,0 ml
- H ₂ O destilada q.s.p.	500,0 ml

* Solução de descoloração

- Metanol	350,0 ml
- Ácido acético	100,0 ml
- H ₂ O destilada q.s.p.	1000,0 ml

3.2.6.1.2 - TÉCNICA (GORG et al, 1985)

Após a eletroforese, o gel é colocado em uma cuba com a solução de fixação por 20 minutos.

Em seguida banhar o gel na solução de coloração por 30 minutos.

A descoloração é realizada através de vários banhos

com a solução de descoloração, até que as bandas fiquem bem evidenciadas no gel.

Todas as etapas são feitas sob agitação constante.

3.2.6.2 - COLORAÇÃO COM NITRATO DE PRATA

3.2.6.2.1 - REAGENTES

* Solução de lavagem

- Etanol a 10%

* Solução de nitrato de prata

- Nitrato de prata (p/v) 0,1%

* Solução de revelação

- Carbonato de sódio 3,00%

- Formaldeído 0,02%

Obs.: preparar na hora de usar

* Solução de parada

- Ácido acético a 1%

* Redutor de Farmer

- Ferricianeto de potássio ... 1,0%

- Tiosulfato de sódio 1,6%

* Solução de preservação

- Metanol 200,0 ml

- Ácido acético 50,0 ml

- Glicerol 50,0 ml

- H₂O destilada q.s.p. 1000,0 ml

3.2.6.2.2 - TÉCNICA (GORG et al, 1985)

Após a coloração e descoloração com o Azul de Coomassie, o gel é banhado duas vezes por 5 minutos na solução de lavagem e logo após lavado 3 vezes por 3 minutos em água destilada.

Banhar o gel na solução de nitrato de prata por 30 minutos, e depois lavar com água destilada por 1 hora trocando a água 4 a 5 vezes.

Colocar o gel na solução de revelação por 10 minutos.

Parar a reação colocando o gel por 10 minutos na solução de parada.

Lavar 3 vezes com água destilada por 3 minutos.

Banhar o gel na solução de Farmer por 5 minutos.

Parar a reação banhando o gel na solução de parada por 1 minuto.

Lavar o gel várias vezes com água destilada até que a coloração amarelada do redutor de Farmer desapareça.

Repetir todo o processo a partir da imersão do gel na solução de nitrato de prata por 30 minutos e, em seguida, lavar 5 vezes, rapidamente, com água destilada.

Colocar o gel na solução de revelação até a virada da coloração.

Parar a reação banhando o gel na solução de parada por 10 minutos.

Lavar 3 vezes em água destilada por 3 minutos.

Colocar o gel na solução de preservação, e interpretar o perfil polipeptídico na caixa de luz.

3.2.7 - TRANSFERÊNCIA ELETROFORÉTICA

3.2.7.1 - REAGENTES

* Tampão de transferência

- Tris	3,0 g
- Glicina	15,5 g
- Metanol	100,0 ml
- H ₂ O destilada q.s.p.	1000,0 ml

* Papel de filtro

* Nitrocelulose 0,45 μ de porosidade

3.2.7.2 - TÉCNICA (TOWBIN et al, 1979)

A transferência é efetuada em um aparelho Transblot Bio Rad.

Após a eletroforese, o gel é colocado em contato com a nitrocelulose e o conjunto é protegido por duas folhas de papel de filtro Whatman e acrílico.

Levar o conjunto para a cuba com tampão de transferência para a realização da mesma. Para a transferência é utilizada uma corrente constante de 500 mA por 60 minutos.

3.2.8 - REVELAÇÃO IMUNOENZIMÁTICA

3.2.8.1 - REAGENTES

* Solução de Ponceau S

- Ponceau S	2,00 g
- Ácido tricloroacético a 3%.	50 ml

* Tampão TBS

- Tris HCl pH 7,5	20,0 ml
- NaCl	500,0 ml

* Tampão de regeneração

- Tampão TBS + 1% de Triton x 100 (v/v)

* Tampão TBS*

- Tampão TBS + 1% de gelatina sódica(p/v)

* Tampão TBS*/3

- 1 volume de tampão TBS* + 2 volumes de tampão TBS
--

* TBS Tween

- Tampão TBS + 0,05% de Tween ₂₀ (v/v)

* H₂O₂ 30 vol

* Conjugado - Ig de coelho anti IgG de

galinha marcada com peroxidase (SIGMA)

* HRP (Bio Rad)

3.2.8.2 - TÉCNICA

Após a transferência, banhar a nitrocelulose na

solução de Ponceau S por 10 minutos.

Depois lavar com água destilada para retirar o excesso do corante (Ponceau S) até que apareçam as proteínas transferidas.

Em seguida cortar a nitrocelulose de acordo com cada amostra e colocá-las, identificando-as, em tubos de ensaio de 13 x 80 mm com tampão de regeneração por 30 minutos.

Desprezar o tampão de regeneração e colocar tampão TBS* durante uma noite (mais ou menos 18 h).

Desprezar o tampão TBS* e incubar na presença do soro da ave, diluído a 1/4 em PBS*/3, por 120 minutos.

Desprezar o soro e fazer 3 lavagens, de 10 minutos cada, com tampão TBS com 0,05% de Tween₂₀.

Incubar na presença do conjugado, Ig de coelho anti IgG de galinha marcada com peroxidase, diluído a 1/1000 em tampão TBS*/3, por 90 minutos.

Desprezar o conjugado e fazer 3 lavagens, de 10 minutos cada, com tampão TBS.

Colocar a solução de revelação por mais ou menos 10 minutos e esperar que apareçam algumas bandas.

Em seguida desprezar a solução de revelação e parar a reação com TBS.

Todas as etapas são feitas sob agitação constante.

4 - RESULTADOS

Estudo do perfil polipeptídico de membranas de células renais de galinhas infectadas pelo vírus da Doença de Marek e pelo HVT (Herpes Virus Turkey).

A partir de análises das células que exprimem qualquer função produtiva viral é possível, em geral, estudar as mudanças da composição das membranas celulares. As proteínas localizadas sobre o envelope viral e sobre a superfície de células infectadas estão envolvidas numa maior interação com o sistema imune do hospedeiro (Carter et al., 1981; Eberle et Courtney, 1980), sendo importantes na determinação de uma proteção imunitária, e a identificação e caracterização dessas glicoproteínas são essenciais para a construção e aperfeiçoamento de novas vacinas.

Para estudar a possibilidade de uma especificidade imunológica induzida pelo vírus da Doença de Marek e ou pelo vírus herpes de peru, que poderia ser aplicada a um método de profilaxia da doença, nós fizemos um estudo comparativo do

perfil de polipeptídeos de membranas de células renais de galinhas controles (não infectadas), de galinhas infectadas pelo vírus vacinal HVT e de galinhas infectadas pela cepa selvagem HPRS-16 do vírus da doença de Marek.

4.1 - ANÁLISE ELETROFORÉTICA DAS PROTEÍNAS DE MEMBRANAS DE CÉLULAS RENAIIS DE GALINHAS

4.1.1 - RESULTADOS

O perfil polipeptídico de membranas de células renais obtidas a partir de galinhas dos três grupos, ou seja: grupo 1 dos animais controle negativo, grupo 2 dos animais infectados pela cepa vacinal FC-126 do HVT e o grupo 3 dos animais infectados pela cepa selvagem HPRS-16 do vírus da Doença de Marek, foram analisados pela técnica de eletroforese monodimensional em gel de poliacrilamida.

Após a coloração do gel com Azul de Coomassie (fig. 1), não nos foi possível evidenciar qualquer diferença entre os perfis polipeptídicos das membranas de células renais dos animais controle negativo com as membranas de células renais dos animais infectados tanto pela cepa vacinal FC-126 do HVT como pela cepa selvagem HPRS-16 do vírus da Doença de Marek.

Com a utilização da coloração pelo nitrato de prata (fig. 2), onde o limite inferior de detecção é de 10 a 100 vezes mais baixo que o Azul de Coomassie, também não foi possível evidenciar qualquer diferença entre os perfis de

cada grupo, onde as massas moleculares dos polipeptídios variaram de 14 a 220 KDa.

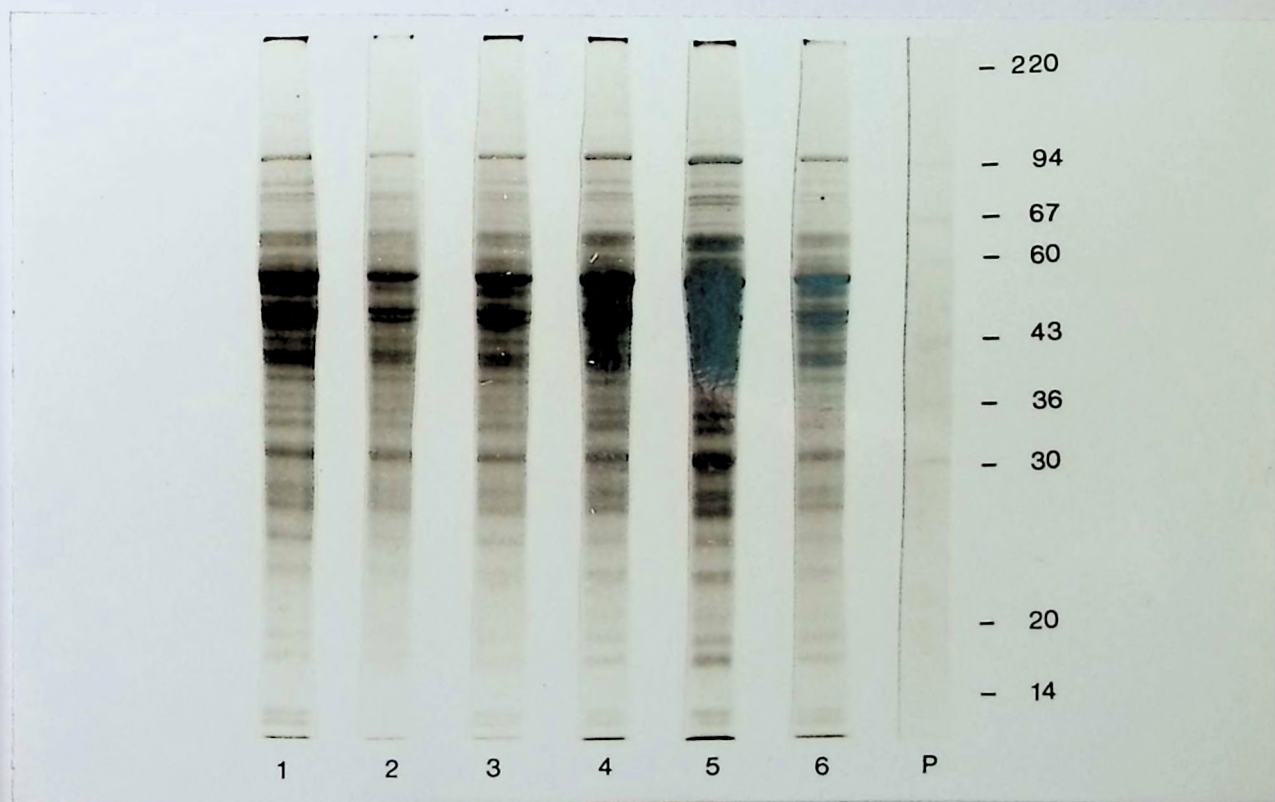


Fig. 1 - Perfil polipeptídico de membranas de células renais obtidas a partir de galinhas: controle negativo (1 e 4), infectadas com o vírus herpes de peru (2 e 5) e com o vírus da Doença de Marek, cepa HPRS-16 (3 e 6). Padrão (P). As amostras foram coletadas com 7 dpi (1 a 3) e 41 dpi (4 a 6). O gel foi corado pelo Azul de Coomassie.

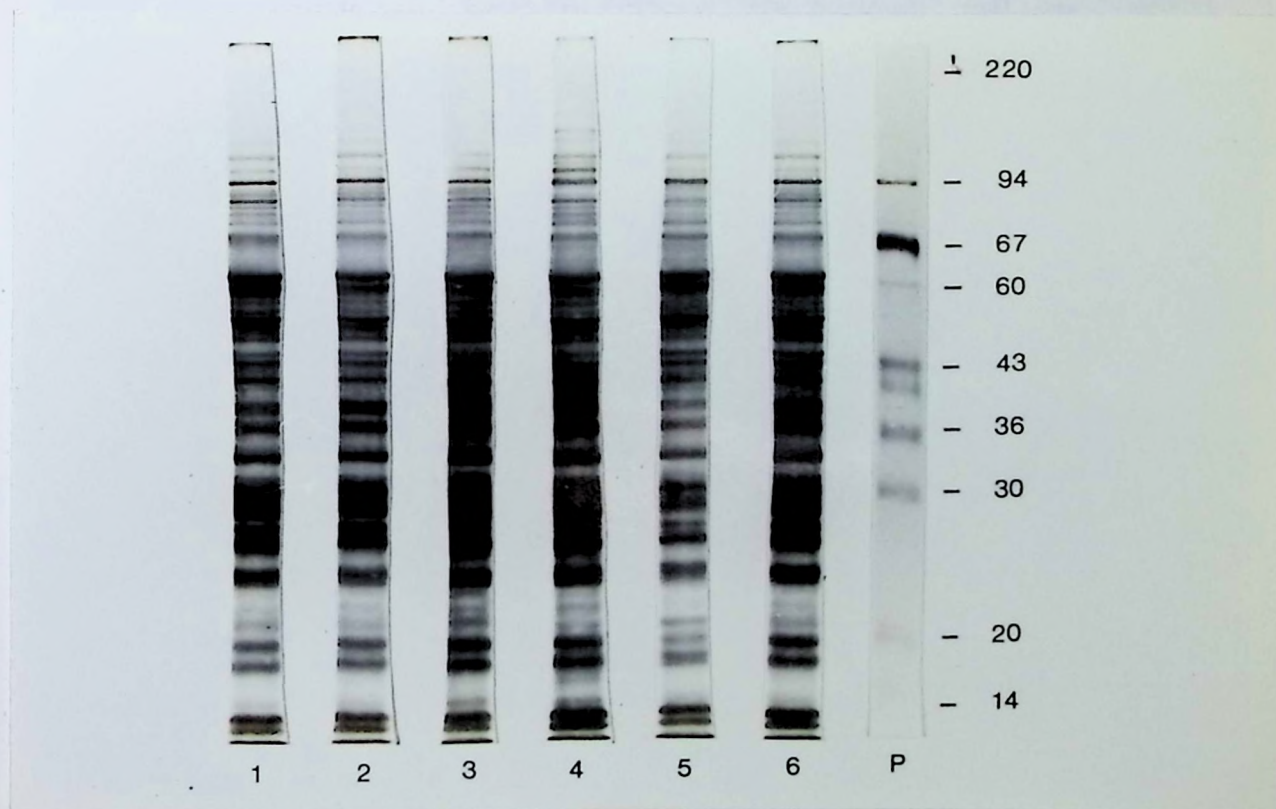


Fig. 2 - Perfil polipeptídico de membranas de células renais obtidas a partir de galinhas: controle negativo (1 e 4), infectadas com o vírus herpes de peru, cepa FC-126 (2 e 5) e infectadas com o vírus da Doença de Marek, cepa HPRS-16 (3 e 6). Padrão (P). As amostras foram coletadas com 7 dpi (1 a 3) e 41 dpi (4 a 6). O gel foi corado pelo nitrato de prata.

4.1.2 - DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que as membranas de células renais obtidas de galinhas controle negativo e de galinhas infectadas, tanto pela cepa vacinal FC-126 do HVT como pela cepa selvagem HFRS-16 do vírus da Doença de Marek, apresentaram os mesmos perfis polipeptídicos. Esse resultado pode ser devido ao grande número de bandas polipeptídicas presentes, onde as proteínas próprias da célula e as proteínas induzidas pelos vírus teriam mobilidades similares, dificultando assim sua localização precisa.

4.1.3 - CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos chegamos à conclusão que, devido ao grande número de polipeptídeos existente na superfície de membranas de células renais como também à natureza fortemente associada à célula desses herpesvírus vacinal e selvagem, essa técnica não é apropriada para evidenciar qualquer polipeptídeo específico induzido por esses vírus.

Devido a essas dificuldades, concluímos que o emprego de técnicas imunológicas seria mais adequado para nos fornecer resultados mais significativos quanto à identificação de polipeptídeos específicos induzidos pela infecção viral.

4.2 - REVELAÇÃO IMUNOENZIMÁTICA

A grande especificidade dos anticorpos para um antígeno homólogo é uma ótima ferramenta de trabalho para identificar e caracterizar proteínas vírus específicas que seriam alvos da resposta imunológica durante uma infecção viral.

Para colocar em evidência os polipeptídeos resultantes das alterações celulares induzidas pelo vírus vacinal HVT e pelo vírus selvagem da Doença de Marek, foi feita uma transferência dos polipeptídeos para uma folha de nitrocelulose a partir de um gel monodimensional contendo as proteínas de membranas de células renais de galinhas infectadas pelo vírus vacinal (cepa FC-126) e pelo vírus selvagem (cepa HPRS-16), como também as membranas de células renais de galinhas controle negativo.

A revelação imunoenzimática foi efetuada com o soro dos respectivos animais doadores das membranas de células renais.

4.2.1 - RESULTADOS

Após a revelação imunoenzimática, pudemos observar que o soro dos animais não infectados reconhecia praticamente todas as proteínas presentes no perfil de polipeptídeos de membranas de células renais de animais não infectados. O reconhecimento de seus próprios constituintes

antigênicos impediu uma exploração conveniente dos resultados obtidos pela revelação imunoenzimática dos antígenos de células renais dos animais infectados tanto pelo vírus vacinal(HVT) como pelo vírus selvagem da Doença de Marek (fig. 3)

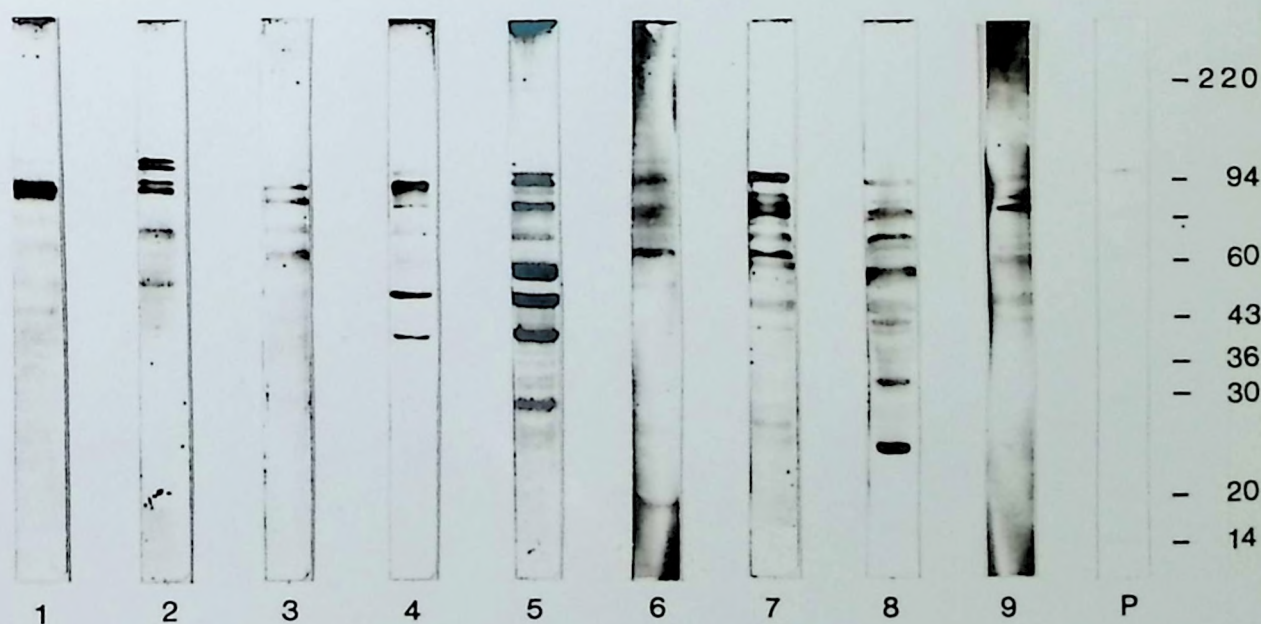


Fig. 3 - Revelação imunoenzimática das proteínas de membranas de células renais obtidas a partir de galinhas (infectadas e controles), com 7, 27 e 41 dpi após a transferência eletroforética sobre nitrocelulose. A revelação imunoenzimática foi feita com soro policlonal de galinhas controles negativos (1, 4 e 7), de galinhas infectadas pelo vírus da Doença de Marek, cepa HPRS-16 (3, 6 e 9), e de galinhas infectadas pelo herpesvírus de peru, cepa FC-126 (2, 5 e 8). Padrão (P).

4.2.2 - DISCUSSÃO

Devido aos resultados obtidos, questionamos se existiria uma interferência dos reagentes tais como os detergentes Triton X-100 e SDS. Todos aqueles reativos capazes de interferir a nível da desnaturação protéica e sobre o poder antigênico das proteínas foram utilizados nas concentrações recomendadas para não impedir as reações antigênicas das moléculas protéicas. Outra possibilidade seria aquela de reações cruzadas entre as imunoglobulinas de espécies diferentes e a existência de anticorpos espécie específica e tecido específico, e, para tal, a escolha do conjugado é extremamente importante. Essa possibilidade também foi descartada já que o conjugado era Ig de coelho anti IgG de galinha marcada com peroxidase. Então, não restaram dúvidas quanto à presença de autoanticorpos no soro dos animais não infectados.

Atualmente, sabe-se que o aparecimento de autoanticorpos não está limitado a pacientes com doenças autoimunes, pois, também são encontrados em indivíduos normais. De acordo com Schattner (1986/1987) a frequência de autoanticorpos aumenta com a idade, podendo ser encontrados em certas infecções, particularmente nas de etiologia viral ou de curso crônico, em alguns pacientes com câncer ou gamopatia monoclonal, como também em indivíduos com injúria de tecidos causada por irradiação ou queimaduras severas.

Naparstek et al., in Schattner (1986/1987),

admitiram que linfócitos B produtores de autoanticorpos são comuns e fazem parte do repertório pré-imune normal de células B do hospedeiro. Há mais de trinta anos, Grabar propôs que os autoanticorpos são produzidos como resposta à incompletas degradações dos antígenos "self". Ele acredita que os antígenos "self" que sofreram degradações incompletas podem permanecer imunogênicos e que o aparecimento de autoanticorpos é uma resposta do sistema imune a esses antígenos (Grabar, 1975 e 1983).

Segundo Avrameas et al. (1983), em todos os indivíduos, as células e tecidos estão em destruição e regeneração permanente e, devido a isso, os antígenos da superfície celular podem apresentar-se de uma maneira diferente e serem reconhecidos como não "self" no processo de depuração celular.

Vários pesquisadores têm registrado a presença de autoanticorpos por várias técnicas, principalmente pela revelação imunoenzimática e pela imunofluorescência. Essa detecção depende de vários fatores, tais como o limite inferior de detecção, a diluição do soro e do conjugado e das condições precisas de utilização.

De acordo com Avrameas et al. (1983), Landsteiner em 1900 demonstrou pela primeira vez a existência de anticorpos naturais no soro de humanos normais quando foram colocadas em evidência hemaglutininas naturais dirigidas contra os determinantes do grupo sanguíneo ABO.

Em 1964, Boyden definiu os anticorpos naturais como

um conjunto de moléculas presentes no soro de animais normais capazes de se combinar especificamente com os antígenos.

Adair e Calvert (1980), demonstraram pela imunofluorescência a presença de autoanticorpos no soro de galinhas que reagiam com núcleo de células de galinhas normais em cultura.

Através de técnicas como imunoprecipitação radioativa e da revelação imunoenzimática, evidenciou-se a presença, no soro de galinhas SPF, de autoanticorpos que reconheciam os antígenos de membranas de células normais de galinhas (Silva, 1987).

Daar e Fabre, in Schattner (1986/1987) demonstraram uma quase universal presença de múltiplos autoanticorpos em indivíduos normais, comprovando a presença de IgM órgão específica para cérebro, fígado e coração em todos os soros de humanos normais examinados.

Citamos anteriormente que um aumento da frequência de autoanticorpos poderiam ser detectados em indivíduos que apresentam infecções, particularmente aquelas de etiologia viral. Há hipóteses de que essas infecções poderiam gerar autoanticorpos: pela indução de anticorpos com reação cruzada, gerando antígenos *self* alterados ou por uma estimulação policlonal. Como exemplo temos as reações cruzadas entre as proteínas M dos *Streptococcus* com o tecido cardíaco causando a febre reumática (Kaplan et al., 1962) e entre os determinantes antigênicos de tecido do cérebro e coração e o T. cruzi na doença de Chagas (Linna e Rowe,

1982). Um estimulador policlonal estimula um grande número de linfócitos T ou B independente da especificidade antigênica. Um exemplo é o lipopolissacarídeo que funciona como estimulador policlonal de células B quando injetado em camundongos. Esses camundongos vão produzir anticorpos com várias especificidades, inclusive anticorpos autoreativos. *In vivo* a estimulação policlonal pode ser induzida por um agente infeccioso.

O vírus Epstein-Barr é o agente etiológico da mononucleose infecciosa, sendo associado ao linfoma de Burkitt e ao Carcinoma de nasofaringe. Esse vírus é reconhecido como um estimulador policlonal de células B (Bird e Britton, 1979a, b; Bird et al., 1981; Rosen et al., 1977). Vários pesquisadores detectaram autoanticorpos no soro de indivíduos em uma grande variedade de infecções virais. Sutton et al. (1974) detectaram no soro de pacientes com mononucleose infecciosa a presença de autoanticorpos que reagem para músculo liso. Garzelli et al. (1984), mostraram que o vírus Epstein-Barr transforma linfócitos B humanos em células linfoblastóides imortalizadas que produzem anticorpos monoclonais que reagem para vários órgãos, entre eles tireóide, pâncreas, estômago, músculo liso e nervos.

Existem vários trabalhos sobre doenças autoimunes em aves. Estas incluem: tireodite autoimune (Witebsky et al., 1969; Sankar et al., 1983; Hainess et al., 1984) e escleroderma (Albini e Wick, 1971 e 1973).

Em galinhas, a deposição de complexo imune

ocasionando glomerulonefrite foi bem reportado na doença infecciosa bursal (Ley e Yamamoto, 1979), na bronquite infecciosa (Chong e Apostolov, 1982), na artrite reoviral (Pradhan et al., 1987) e na Doença de Marek (Pradhan et al., 1988). Em codornas infectadas experimentalmente com vírus da doença de Marek, foi detectada a presença de anticorpos antinúcleo e deposição de complexo imune no glomérulo renal (Kaul e Pradhan, 1991).

Todas essas observações sugerem que a capacidade de induzir a produção de autoanticorpos está amplamente distribuída.

4.2.3 - CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos, concluímos que a presença de autoanticorpos no soro das galinhas nos impediu a identificação de antígenos específicos da infecção viral em membranas de células renais obtidas a partir de galinhas infectadas tanto pelo vírus selvagem da Doença de Marek como pelo vírus herpes de peru.

5 - DISCUSSÃO GERAL

Observamos que as técnicas utilizadas por nós não nos permitiram obter uma sensibilidade suficiente para evidenciar qualquer diferença entre os perfis polipeptídicos de membranas das células utilizadas. Acreditamos que esses resultados podem ser devidos ao grande número de polipeptídeos presentes, onde as proteínas próprias das células e as proteínas induzidas pelo vírus teriam mobilidades similares.

Colocamos em evidência a existência de autoanticorpos no soro das galinhas utilizadas por nós. A presença desses autoanticorpos, tanto nos animais controle como nos animais infectados, impediram a detecção dos antígenos induzidos por esses vírus (HVT cepa FC-126 e vírus da Doença de Marek - HPRS-16).

Certamente, foi levantada a questão se a presença de autoanticorpos seria um problema específico das aves por nós utilizadas já que elas foram provenientes de uma granja comercial e que poderiam estar com alguma infecção. Entretanto, essas aves foram colocadas em isoladores

distintos e durante todo o experimento (+/- 3 meses) as aves utilizadas como controle negativo (25 aves) não apresentaram qualquer sinal aparente de infecção. Por outro lado citamos anteriormente que a presença de autoanticorpos foi relatada por vários pesquisadores tanto em humanos (Sutton et al., 1974; Garzelli et al., 1984; Schattner, 1986, 1987) como também em animais (Albini e Wick, 1971, 1973; Adair e Calvert, 1980; Ley e Yamamoto, 1979; Pradhan et al., 1987; Scott e Shuman, 1991; Mouritsen et al., 1989). A presença de autoanticorpos também foi detectada em animais SPF e ficaria a dúvida de que os animais "germ-free" não os apresentariam.

Discutimos anteriormente que vários pesquisadores têm observado um aumento na frequência de autoanticorpos em indivíduos que apresentam infecções, particularmente aquelas de etiologia viral. Há especulações de que essas infecções poderiam gerar autoanticorpos: pela indução de anticorpos com reação cruzada (Febre reumática), gerando antígenos *self* alterados e por uma estimulação policlonal. O vírus Epstein-Barr é o agente etiológico da mononucleose infecciosa e tem sido associado ao linfoma de Burkitt e ao carcinoma de nasofaringe. Esse vírus é reconhecido como um estimulador policlonal de células B (Bird e Britton, 1979a, b; Bird et al., 1981; Rosen et al., 1977). Sutton et al. (1974) demonstraram no soro de pacientes com mononucleose infecciosa a presença de autoanticorpos que reagiam para músculo liso. Garzelli et al. (1984) mostraram que o vírus Epstein-Barr transforma linfócitos B humanos em células linfoblastóides

imortalizadas que produzem anticorpos monoclonais que reagem para vários órgãos, entre eles, tireóide, pâncreas, estômago, músculo liso e nervos. Glomerulonefrite causada pela deposição de complexo-imune associada ao linfoma de Burkitt, leucemia mielocítica aguda e leucemia felina foi bem reportada Sutherland e Mardiney, 1973; Sutherland et al., 1974). Da mesma forma foi detectada uma deposição de complexo imune acarretando glomerulonefrite em galinhas infectadas pelo vírus da Doença de Marek (Pradhan et al., 1988). Um fator importante é que tanto a mononucleose infecciosa como a Doença de Marek são causadas por herpesvírus e, em ambos os casos, células T transformadas são produzidas. As alterações glomerulares induzidas pela deposição de complexo imune afetam a filtração e a permeabilidade renal. A insuficiência renal pode ser a maior causa de morte na Doença de Marek aliada às anormalidades funcionais dos órgãos linfóides.

Em nosso experimento, ao depararmos com a presença de autoanticorpos tanto nos animais controles como também nos animais infectados pelo vírus selvagem da Doença de Marek e pelo vírus herpes de peru, verificamos que a presença dos autoanticorpos nos impediram a detecção dos antígenos induzidos por esses vírus.

6 - CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos pela eletroforese em gel de poliacrilamida nos mostraram que as membranas de células controles e infectadas, tanto pelo vírus selvagem da Doença de Marek como pelo vírus herpes de peru, apresentaram o mesmo perfil polipeptídico.

Através da revelação imunoenzimática constatamos a presença de autoanticorpos no soro dos animais controles. A presença desses autoanticorpos impediu a identificação dos antígenos específicos nas células infectadas tanto pelo vírus selvagem como pelo vírus vacinal.

Devido a esses resultados, concluímos que, para pôr em evidência os antígenos específicos da infecção viral, tanto pelo vírus selvagem como pelo vírus vacinal, seria necessário o emprego de um método que eliminasse a resposta dos autoanticorpos. Esperamos, num próximo experimento, que essas respostas possam ser bloqueadas e assim identificar os antígenos específicos da infecção viral.

Consequentemente seria importante o emprego de anticorpos monoclonais para a identificação e caracterização desses

antígenos que poderiam ser mais tarde aplicados a um novo método de profilaxia da doença de Marek.

7 - BIBLIOGRAFIA

ADAIR, B. M. & CALVERT, V. M.. Demonstration of anti-nuclear antibodies in fowl sera by immunofluorescence. Avian Pathol., 9: 377 - 383, 1980.

ADLDINGER, H. K.. Cell-mediated cytotoxicity of blood leukocytes from Marek's disease virus infected chickens directed against viral and tumor-associated antigens. In "Advances in Comparative Leukemia Research" (D. S. Yohn ed.), 407 - 408. North Holland Biomed. Press., Amsterdam, 1980.

ALBINI, B. & WICK, G.. Erythrocyte-specific anti-nuclear factors in chickens of the obese strain. Immunology, 21: 957 - 966, 1971.

ALBINI, B. & WICK, G.. The influence of thymectomy on the development of erythrocyte-specific anti-nuclear factors in obese strain and normal White Leghorn chickens. Immunology, 24: 545 - 549, 1973.

- AVRAMEAS, S.; DIGHERO, G.; LYMBERI, P. & GUILBER, B..
Studies on natural antibodies and autoantibodies. Ann.
Immunol. (Inst. Pasteur), 134 D: 103 - 113, 1983.
- BENTON, W. J. & COVER, M. S.. The increased incidence of
visceral lymphomatosis in broilers and replacement birds.
Avian Dis., 1: 320 - 327, 1957.
- BIGGS, P. M.; JACKSON, C. A. W.; POWELL, D. G.. The
epizootiology of Marek's disease. 2. The effect of supply
flock, rearing house, and production house on the
incidence of Marek's disease. Avian Pathol., 2 : 127 -
134, 1973.
- BIGGS, P. M. & MILNE, E. S.. Biological properties of a
number of Marek's Disease virus isolates. In "Oncogenesis
and Herpesviruses I" (P. M. Biggs, G. de Thé and L. N.
Payne, eds.), I.A.R.C., Lyon, 88 - 94, 1972.
- BIGGS, P. M. & PAYNE, L. N.. Transmission experiments with
Marek's disease (Fowl paralysis). Vet. Rec., 75: 177-179,
1963.
- BIGGS, P. M. & PAYNE, L. N.. Studies on Marek's disease. I.
Experimental transmission. J. Natl. Cancer Inst., 39: 237-
280, 1967.

BIGGS, P. M.; POWELL, D. G.; CHURCHILL, A. E.; CHUBB, R. C..

The epizootiology of Marek's disease. 1. Incidence of antibody, viraemia and Marek's disease in six flocks. Avian Pathol., 1: 5 - 26, 1972.

BIGGS, P.M. ; PURCHASE, H.G. ; BEE, B.R. & DALTON, P.J..

Preliminary report on acute Marek's Disease (fowl paralysis) in Great Britain. Vet. Rec., 77: 1339 - 1340, 1965.

BIRD, G. & BRITTON, S.. A live B cell activator operating in isolation of other cellular influences. Scand. J. Immunol., 9: 507 - 510, 1979a.

BIRD, G. & BRITTON, S.. A new approach to the study of human B lymphocyte function using an indirect plaque assay and a direct B cell activator. Immunol. Rev., 45: 41 - 67, 1979b.

BIRD, G., BRITTON, S., ERNBERG, I. & NILSSON, K..

Characteristics of Epstein-Barr virus activation of human B lymphocytes. J. Exp. Med., 154: 832 - 839, 1981.

BOEZI, J. A., LEE, L. F., BLAKESLY, R. W., KOENIG, M. &

TOWLE, H. C.. Marek's disease herpesvirus-induced DNA polymerase. J. Virol., 14: 1209 - 1219, 1974.

BOYDEN, S. V.. Autoimmunity and inflammation. Nature (London),
201: 200, 1964.

CALNEK, B. W.. Marek's disease virus and lymphoma. In
"Oncogenic herpesviruses" (F. Rapp. editor), vol. 1, CRC
Press Inc., Boca Raton, 104 - 143, 1980.

CALNEK, B. W.. Marek's disease - A model for herpesvirus
oncology. C. R. C. Critical Reviews in Microbiology, 12:
293 - 320, 1986.

CALNEK, B. W. & ADLDINGER, H. K.. Some characteristics of
cell-free preparations of Marek's disease virus and
turkey herpesvirus. Avian Dis., 15: 508 - 517, 1971.

CALNEK, B. W., ADLDINGER, H. K. & KANH, D. E.. Feather
follicle epithelium: a source of enveloped and infectious
cell-free herpesvirus from Marek's Disease. Avian Dis.,
14: 219 - 233, 1970.

CALNEK, B. W. & HITCHNER, S. B.. Localization of viral
antigen in chickens infected with Marek's Disease
herpesvirus. J. Natl. Cancer Inst., 43: 935 - 949, 1969.

CALNEK, B. W. & HITCHNER, S. B.. Survival and disinfection
of Marek's disease and effectiveness of filters in
preventing airborne dissemination. Poultry Sci., 52: 35 -

43, 1973.

CALNEK, B. W. & MADIN, S. H.. Characteristics of "in vitro" infection of chicken kidney cell cultures with herpesvirus from Marek's disease. *Am. J. Vet. Res.*, 30: 1389 - 1402, 1969.

CARTER, V. C., SCHAFFER, P. A. & TEVETHIA, S. S.. The involvement of herpes simplex type 1 glycoprotein in cell-mediated immunity. *J. Immunol.*, 126: 1655 - 1660, 1981.

CHO, B. R. & KENZY, S. G.. Isolation and characterization of an isolate of Marek's disease virus with low pathogenicity. *Appl. Microbiol.*, 24: 299 - 306, 1972.

CHO, B. R., KENZY, S. G. & MATHEY, W. J.. Histologic and microbiologic studies of chickens with transient paralysis. *Avian Dis.*, 587 - 598, 1970.

CHOMIAK, T. N., LUGINBUHL, R. E., HELMBOLDT, C. F. & KOTTARIDIS, S. D.. Marek's disease. I. Propagation of the Connecticut - A (Conn-A) isolate in chicks. *Avian Dis.*, 11: 646 - 653, 1967.

CHONG, K. T. & APOSTOLOV, K.. The pathogenesis of nephritis in chickens induced by infectious bronchitis virus. *J. Comp. Pathol.*, 92: 199 - 221, 1982.

- CHURCHILL, A. E., Herpes-type virue isolated in cell culture from tumors of chickens with Marek's disease. I. Studies in cell culture. J. Natl. Cancer Inst., 41: 939 - 950, 1968.
- CHURCHILL, A. E. & BIGGS, P. M., Agent of Marek's disease in tissue culture. Nature., 215: 528 - 530, 1967.
- CHURCHILL, A. E., CHUBB, R. C. & BAXENDALE, W., The attenuation with loss of antigenicity of the herpes-type virus of Marek's disease (strain HPRS-16) on passage in cell culture. J. Gen. Virol., 4: 557 - 564, 1969a.
- CHURCHILL, A. E., PAYNE, L. N. & CHUBB, R. C., Immunization against Marek's disease using a live attenuated virus. Nature, 221: 744 - 747, 1969b.
- COLEMAN, R. M. & SCHIERMAN, L. W., Independent capping of chickens MHC antigens and tumor associated antigens on Marek's disease virus-induced lymphoma cells. Infect. Immun., 29: 1067 - 1072, 1980.
- COUDERT, F., DAMBRINI, G. & CAUCHY, L., Tumeurs d'origine virale: la résistance des poules. Biofutur, 69: 48 - 51, 1988.
- DAMBRINI, G., COUDERT, F. & CAUCHY, L., Cell-mediated

cytotoxicity in chickens infected with Marek's disease virus and the herpesvirus of turkeys. In "Resistance and Immunity to Marek's disease" (P.M. Biggs, ed.). CEC Publ. EUR 6470 EN, EEC Brussels, Luxembourg, (Berlin, 31 october - 2 november 1978), 320 - 337, 1980.

DOYLE, P.. Neuritis in chickens. J. Amer. Vet. Med. Assoc., 622 - 630, 1926.

DUNLOP, W. R., KOTTARIDIS, S. D., GALLAGHER, J. R., SMITH, S. C. & STROFUT, R. G.. The detection of acute avian leukosis as a contagious disease. Poultry Sci., 44: 1537 - 1540, 1965.

EBERLE, R. & COURTNEY, R. J.. Preparation and characterization of specific antisera to individual glycoprotein antigens comprising the major glycoprotein region of herpes simplex virus type 1. Journal of Virology, 35: 902 - 917, 1980.

EIDSON, C. S., ELLIS, M. N. & KLEVEN, S. H.. Reduced vaccinal protection of turkey herpesvirus against field strains of Marek's disease herpesvirus. Poult. Sci., 60: 317 - 322, 1981.

EIDSON, C. S., PAGE, R. K. & KLEVEN, S. H.. Effectiveness of cell-free or cell-associated turkey herpesvirus vaccine

against Marek's disease in chickens as influenced by maternal antibody, vaccine dose, and time of exposure to Marek's disease virus. Avian Dis., 22: 583 - 597, 1978.

EIDSON, C. S. & SCHMITTLE, S. C.. Studies on acute Marek's disease. I. Characteristics of isolate GA in chickens. Avian Dis., 12: 467 - 475, 1968.

GARZELLI, C., TAUB, F. E., SCHARFF, J. E., PRABHAKAR, B. S., GINSBERG-FELLNER, F. & NOTKINS, A. L.. Epstein-Barr virus-transformed lymphocytes produce monoclonal autoantibodies that react with antigens in multiple organs. Journal of Virol., 52: 722 - 725, 1984.

GAVORA, J. S., GOWE, R. S. & McALLISTER, A. J.. Vaccination against Marek's disease: efficacy of cell-associated and lyophilized herpesvirus of turkey in nine strains of leghorns. Poult. Sci., 56: 846 - 853, 1977.

GLAUBIGER, C., NAZERIAN, K. & VELICER, L. F.. Marek's disease herpesvirus. IV. Molecular characterization of Marek's disease herpesvirus A antigen. J. Virol., 45: 1228 - 1234, 1983.

GORG, A., POSTEL, W., WESER, J., SCHIWAKA, H. W. & BOESKEN, W. H.. Horizontal SDS electrophoresis in ultrathin-pore-gradient gels for the analyses of urinary proteins. Sci.

Tools, 32: 5 - 8, 1985.

GRABAR, P.. Autoantibodies and immunological theories: an analytical review. Clin. Immunol. Immunopathol., 4: 453 - 466, 1975.

GRABAR, P.. Autoantibodies and the physiological role of immunoglobulins. Immunol. Today, 4: 337 -340, 1983.

HAINESS, D. M., LORDING, P. M. & PENHALE, W.. The detection of canine auto-antibodies to thyroid antigens by enzyme-linked immunosorbent assay, hemagglutination and indirect immunofluorescence. Can. J. Comp. Med., 48: 262 - 267, 1984.

HANDY, F., SEVOIAN, M. & HOLT, S. C.. Biogenesis of Marek's Disease (Type-II leukosis) virus "in vitro"- electron microscopy and immunological study. Infect. Immun., 9: 740 - 749, 1974.

HIRAI, K., NAKAJIMA, K., IKUTA, K., KIRISAWA, R., MIKAMI, T. & KATO, S.. Similarities and dissimilarities in the structure and expression of viral genomes of various virus strains immunologically related to Marek's disease virus. Archives of Virology, 89: 113 - 130, 1986.

HLOZANEK, I. & SOVOYA, V.. Lack of pathogenicity of Marek's

disease herpesvirus and herpesvirus of turkeys for mammalian hosts and mammalian cell cultures. Flia Biol. (Praha), 20: 51 - 58, 1974.

HONESS, R. W. & ROIZMAN, B.. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. Journal of Virology, 14: 8 - 19, 1974.

IKUTA, K., NAKAJIMA, K., NAITO, M., AN, S. H., UEDA, S., KATO, S. & HIRAI, K.. Identification of Marek's disease virus-specific antigens in Marek's disease lymphoblastoid cell lines using monoclonal antibody against virus specific phosphorylated polypeptides. International Journal of Cancer, 35: 257 - 264, 1985.

IKUTA, K., NISHI, Y., KATO, S. & HIRAI, K.. Immunoprecipitation of Marek's disease virus specific polypeptides with chicken antibodies purified by affinity chromatography. Virology, 114: 277 - 281, 1981.

IKUTA, K., UEDA, S., KATO, S. & HIRAI, K.. Most virus-specific polypeptides in cells productively infected with Marek's disease virus or herpesvirus of turkeys possess cross-reactive determinants. J. Gen. Virol., 64: 961 - 965, 1983a.

- IKUTA, K., UEDA, S., KATO, S. & HIRAI, K.. Monoclonal antibodies reactive with the surface and secreted glycoproteins of Marek's disease virus and herpesvirus of turkey. *J. Gen. Virol.*, **64**: 2597 - 2610, 1983b.
- IKUTA, K., UEDA, S., KATO, S. & HIRAI, K.. Identification with monoclonal antibodies of glycoproteins of Marek's disease virus and herpesvirus of turkeys related to virus neutralization. *J. Virol.*, **49**: 1014 - 1017, 1984.
- IMAI, K., YUASA, N., IWAKIRI, H., NAKAMURA, K., HIHARA, H., ISHITA, T., INAMOTO, A., OKAMOTO, I., OHTA, K. & MAEDA, M.. Characterization of very virulent Marek's disease viruses isolated in Japan. *Avian Pathol.*, **21**: 119 - 126, 1992.
- ISFORT, R. J., KUNG, H. J. & VELICER, L.F.. Identification of the Gene Encoding Marek's disease herpesvirus A antigen. *J. Virol.*, **61**: 2614 - 2620, 1987.
- ISFORT, R. J., STRINGER, R. A., KUNG, H. J. & VELICER, L. F.. Synthesis, processing and secretion of the Marek's disease herpesvirus A antigen glycoprotein. *J. Virol.*, **57**: 464 - 474, 1986.
- JACKSON, C. A. W., BIGGS, P. M., BELL, R. A., LANCASTER, F. M. & MILNE, B. S.. A study of vaccination against Marek's

disease with an attenuated Marek's disease virus. Avian Pathol., 3: 123 - 144, 1974.

KAPLAN, M. H., MEYERESIAN, M.. An immunological cross-reaction between group A streptococcal cells and human heart tissue. Lancet., 1: 706, 1962.

KATO, S. & HIRAI, K.. Marek's disease virus. Advances in Virus Research, 30: 225 - 277, 1985.

KAUL, L. & PRADHAN, H. K.. Immunopathology of Marek's disease in quails: presence of antinuclear antibody and immune complex. Vet. Immunol. Immunopathol., 28: 89 - 96, 1991.

KAWAMURA, H., KING, D. J. & ANDERSON, D. P.. A herpesvirus isolated from kidney cell culture of normal turkeys. Avian Dis., 13: 853 - 863, 1969.

KENZY, S. G., CHO, B. R. & KIM, Y.. Oncogenic Marek's disease herpes virus in avian encephalitis (temporary paralysis). J. Natl. Cancer Inst., 51: 977 - 982, 1973.

KING, D., PAGE, D., SCHAT, K. A. & CALNEK, B. W.. Difference between influences of homologous and heterologous maternal antibodies on response to serotype-2 and serotype-3 Marek's disease vaccines. Avian Dis., 25: 74 - 81, 1981.

- KIT, S., JORGENSEN, G. N., LEUNG, W. C., IRKULÄ, D. & DUBBS, D. R.. Thymidine kinase induced by avian and human herpes viruses. Intervirology, 2: 299 - 311, 1973.
- KITAMOTO, N., IKUTA, K., KATO, S. & YAMAGUCHI, S.. Cell-mediated cytotoxicity of lymphocytes from chickens inoculated with herpesvirus of turkey against a Marek's disease lymphoma cell line (MSB-1). Biken J., 22: 11 - 20, 1979.
- KODAMA, H., MIKAMI, T., INOUE, M. & IZAWA, H.. Inhibitory effects of macrophages against Marek's disease virus plaque formation in chicken kidney cell cultures. J. Natl. Cancer Inst., 63: 1267 - 1271, 1979a.
- KODAMA, H., SUGIMOTO, C., INAGE, F. & MIKAMI, T.. Anti-viral immunity against Marek's disease virus infected chicken kidney cells. Avian Pathol., 8: 33 - 44, 1979b.
- LEE, L. F.. Macrophage restriction of Marek's disease virus replication and lymphoma cell proliferation. J. Immunol., 123: 1088 - 1091, 1979.
- LEE, L. F., KIEFF, E. D., BACHENHEIMER, S., ROIZMAN, B., SPEAR, P. G., BURMESTER, B. R. & NAZERIAN, K.. Size and composition Marek's disease virus deoxyribonucleic acid. J. Virol., 7: 289 - 294, 1971.

- LEE, L. F., LIU, X. & WITTER, R. L.. Monoclonal antibodies with specificity for three different serotypes of Marek's disease viruses in chickens. *J. Immunol.*, **130**: 1003 - 1006, 1983.
- LEE, L. F., NAZERIAN, K., LEINBACH, S. S., REND, J. M. & BOEZI, J. A.. Effect of phosphonoacetate on Marek's disease virus replication. *J. Natl. Cancer Inst.*, **56**: 823 - 827, 1976.
- LEE, L. F., SHARMA, J. M., NAZERIAN, K. & WITER, R. L.. Suppression of mitogen-induced proliferation of normal spleen cells by macrophages from chickens inoculated with Marek's disease virus. *J. Immunol.*, **120**: 1554 - 1559, 1978.
- LEY, D. H. & YAMAMOTO, R.. Immune complex involvement in the pathogenesis of infectious bursal disease virus in chicks. *Avian Dis.*, **23**: 219 - 224, 1979.
- LINNA, T. J. & ROWE, D. S.. Immunology of protozoal infection (excluding malaria) In: Lachmann, P. J., Peters, D. K.. Clinical aspects of immunology 4th ed Oxford: Blackwell Scientific Publications, **2**: 1557 - 1581, 1982.
- LIU, X. F., LEE, L. F., SHARMA, J. M. & NAZERIAN, K.. Establishment of lymphoblastoid cell lines from Marek's

disease primary tumors. Poult. Sci., 62: 1902 - 1905, 1983.

LONG, P. A., CLARK, J. L. & VELICER, L. F.. Marek's disease herpesvirus. II. Purification and further characterization on of Marek's disease herpesvirus A antigen. J. Virol., 15: 1192 - 1201, 1975.

MAREK, J.. Multiple Nervenenzündung (polyneuritis) bei Hühnern. Dtsch. Tierärztl Wochenschr, 15: 417 - 421, 1907.

McKIMM-BRESCHKIN, J. L., FARAGHER, J. T., WITHELL, J. & FORSYTH, W.H.. Isolation of very virulent Marek's disease viruses from vaccinated chickens in australia. Australian Veterinary Journal, 67: 205 - 209, 1990.

MIKAMI, T., SUZUKI, K., KODAMA, H., ONUMA, M., IZAWA, H. & OKADA, I.. Antigenic differences of Marek's disease tumor-associated surface antigens of MCB-1 and RPL-1 line cells derived from Marek's disease lymphoma. In "Cold Spring Harbor Conference on Cell Proliferation-Viruses in Naturally Occurring Cancer" (M. Essex, G. Todaro & Hauzur Haussen, eds.), Cold Spring Harbor, 7: 199 - 212, 1980.

MOURITSEN, S., AASTED, B. & HØIER-MADSEN, M.. Mink with Aleutian disease have autoantibodies to some autoantigens.

Vet. Immunol. immunopathol., 23: 179 - 186, 1989.

MURTHY, K. K. & CALNEK, B. W.. Pathogenesis of Marek's disease: early appearance of Marek's disease tumor-associated surface antigen in infected chickens. J. Natl. Cancer Inst., 61: 849 - 854, 1978.

MURTHY, K. K., DIETERT, R. R. & CALNEK, B. W.. Demonstration of chickens fetal antigen (CFA) on normal splenic lymphocytes, Marek's disease lymphoblastoid cell lines and other neoplasms. Int. J. Cancer, 24: 349 - 354, 1979.

NAITO, M., NAKAJIMA, K., IWA, N., ONO, K., YOSHIDA, I., KONDOE, T., IKUTA, K., UEDA, S., KATO, S. & HIRAI, K.. Demonstration of a Marek's disease virus-specific antigen in tumour lesions of chickens with Marek's disease using monoclonal antibody against a virus phosphorylated protein. Avian Pathol., 15: 503 - 510, 1986.

NAKAJIMA, K., IKUTA, K., NAITO, M., UEDA, S., KATO, S. & HIRAI, K.. Identification with monoclonal antibodies of virus-specific DNA-binding proteins in the nuclei of cells infected with three serotypes of Marek's disease virus related viruses. J. Virol., 59: 154 - 158, 1986.

NAKAJIMA, K., IKUTA, K., NAITO, M., UEDA, S., KATO, S. & HIRAI, K.. Analysis of Marek's disease virus serotype I-

specific phosphorylated polypeptides in virus-infected cells Marek's disease lymphoblastoid cells. J. of General Virol., 68: 1379 - 1389, 1987.

NAZERIAN, K.. Attenuation of Marek's disease virus and study of its properties in two different cell cultures. J. Natl. Cancer Inst., 44: 1259 - 1267, 1970.

NAZERIAN, K.. DNA configuration in the core of Marek's disease virus. J. Virol., 13: 1148 - 1150, 1974.

NAZERIAN, K.. Marek's disease a herpesvirus-induced malignant lymphoma of the chicken. Virol. oncology, 665 - 682, 1980.

NAZERIAN, K. & BURMESTER, B. R.. Electron microscopy of a herpesvirus associated with the agent of Marek's disease in cell culture. Cancer Res., 28: 2454 - 2462, 1968.

NAZERIAN, K., LEE, L. F., WITTER, R. L. & BURMESTER, B. R.. Ultrastructural studies of a herpesvirus of turkeys antigenically related to Marek's disease virus. Virology, 43: 442 - 452, 1971.

NAZERIAN, K., STEPHENS, E. A., SHARMA, J. M., LEE, L. F., GAILITIS, M. & WITTER, R. L.. A nonproducer T lymphoblastoid cell line from Marek's disease

transplantable Tumor (JMIV). Avian Dis., 21: 69 - 76,
1977.

NAZERIAN, K. & WITTER, R. L.. Cell-free transmission and "in
vitro" replication of Marek's disease virus. J. Virol.,
5: 388 - 390, 1970.

NEUMAN, U.. Lack of serological homology between chicken
alpha-foetoprotein, chicken foetal red blood cell antigen
and Marek's disease tumor-associated surface antigen.
Avian Pathol., 9: 597 - 601, 1980.

NII, S. & YASUDA, I.. Detection of viral cores having toroid
structures in eight herpesvirus. Biken J., 18: 41 - 46,
1975.

NONOYAMA, M.. The molecular biology of Marek's disease
herpesvirus. In: B. Hoizman (ed.), The herpesviruses.
Plenum Publishing Corp., New York, 1: 333 - 346, 1982.

OKADA, K., FUJIMOTO, Y., MIKAMI, T. & YONEHARA, K.. The fine
structure of Marek's disease virus and herpesvirus of
turkey in cell culture. Jpn. J. Vet. Res., 20: 57 - 68,
1972.

OKASAKI, W., PURCHASE, H. G. & BURMEISTER, B. R.. Protection
against Marek's disease by vaccination with a herpesvirus

of turkeys. Avian Dis., 14: 413 - 429, 1970.

OKASAKI, W., PURCHASE, H. G. & BURMESTER, B. R.. The temporal relationship between vaccination with the herpesvirus or turkeys and challenge with virulent Marek's disease virus. Avian Dis., 15: 753 - 761, 1971.

ONO, K., TAKASHIMA, M., ISHIKAWA, T., HAYASHI, M., YOSHIDA, I., KONOBE, T., IKUTA, K., NAKAJIMA, K., UEDA, S., KATO, S. & HIRAI, K.. Partial protection against Marek's disease in chickens immunized with glycoproteins gB purified from turkey-herpesvirus-infected cells by affinity chromatography coupled with monoclonal antibodies. Avian Dis., 29: 533 - 539, 1985.

PAPPENHEIMER, A. M., DUNN, L. C. & CONE, V. A.. A study of fowl paralysis (Neurolymphomatosis gallinarum). Bull. Storrs Agric. Sta., 143: 187 - 290, 1926.

PAPPENHEIMER, A. M., DUNN, L. C. & CONE, V. A.. Studies on fowl paralysis (Neurolymphomatosis gallinarum). I. Clinical features and pathology. J. Exp. Med., 49: 63 - 89, 1929a.

PAPPENHEIMER, A. M., DUNN, L. C. & SCIDLIN, S. H.. Studies on fowl paralysis (Neurolymphomatosis gallinarum). II. Transmission experiments. J. Exp. Med., 49: 87 - 102,

1929b.

PAYNE, N.. Biology of Marek's disease virus and the herpesvirus of turkeys. In: B. Hoizman (ed.), The herpesviruses. Plenum Publishing Corp., New York, 1: 347 - 431, 1982.

PHILLIPS, P. A. & BIGGS, P. M.. Course of infection in tissues of susceptible chickens after exposure to strains of Marek's disease virus and turkey herpesvirus. J. Natl. Cancer Inst., 49: 1367 - 1373, 1972.

POWELL, P. C.. Studies on Marek's disease lymphoma-derived cell lines. Bibliogr. Haematol., 43: 348 - 350, 1976.

POWELL, P. C., HOWES, K., LAWN, A. M., MUSTILL, B. M., PAYNE, L. N., RENNIE, M. & THOMPSON, M. A.. Marek's disease in turkey: the induction of lesions and the establishment of lymphoid cell lines. Avian Pathol., 13: 201 - 214, 1984.

POWELL, P. C. & LOMBARDINI, F.. Isolation of very virulent pathotypes of Marek's disease virus from vaccinated chickens in Europe. Vet. Record, 118: 688 - 691, 1986.

POWELL, P. C., PAYNE, L. N., FRAZIER, J. A. & RENNIE, M.. T lymphoblastoid cell lines from Marek's disease lymphomas. Nature, 252: 79 - 80, 1974.

- POWELL, P. C., RENNIE, M.. Marek's disease tumour specific antigen induced by the herpesvirus of turkeys in vaccinated chickens. *Vet. Rec.*, 103: 232 - 233, 1978.
- PRADHAN, H. K., MOHANTY, G. C., KATARIA, J. M., PATTHAIK, B. & VERMA, K. C.. Antinuclear antibody in chicken with reoviral arthritis. *Avian Dis.*, 31: 249 - 253, 1987.
- PRADHAN, H. K., MOHANTY, G. C., LEE, W. Y., KAUL, L. & KATARIA, J. M.. Immune Complex-Mediated Glomerulopathy in Marek's disease. *Vet. Immunol. Immunophatol.*, 19: 165 - 171, 1988.
- PRADHAN, H. K., MOHANTY, G. C., LEE, W. Y. & PATTHAIK, B.. Antibody directed against Marek's disease-associated tumor surface antigen can be eluted from Marek's disease tumor cells. *Vet. Immunol. Immunophatol.*, 29: 229 - 238, 1991.
- PRESTON, C. M.. Control of herpes simplex virus type 1m RNA synthesis in cells injected with wild type virus of the temperature-sensitive mutant ts₁. *J. Virol.*, 29: 275 - 284, 1979.
- PURCHASE, H. G. & BIGGS, P. M.. Characterization of fife isolates of Marek's disease. *Res. Vet. Sci.*, 8: 440 - 449, 1967.

PURCHASE, H. G., BURMESTER, B. R. & CUNNINGHAM, C. H..

Responses of cell cultures from various avian species to Marek's disease virus and herpesvirus of turkeys. Am. J. Vet. Res., 32: 1811 - 1823, 1971.

RENO, J. M., LEE, L. F. & BOEZI, J. A.. Inhibition of herpesvirus replication and herpesvirus-induced polymerase by phosphonoformate. Antimicrob. Agents Chemot., 13: 188 - 192, 1978.

RISPENS, B. W., van VLOTEN, H., MASTENBROEK, N., MAAS, H. J. L. & SCHAT, K. A.. Control of Marek's disease in the Netherlands. I. Isolation of an avirulent Marek's disease virus (Strain CVI 988) and its use in laboratory vaccination trials. Avian Dis., 16: 108 - 125, 1972a.

RISPENS, B. H., van VLOTEN, H., MASTENBROEK, N., MAAS, H. J. L. & SCHAT, K. A.. Control of Marek's disease in the Netherlands. II. Field trials on vaccination with avirulent strain (CVI 988) of Marek's disease virus. Avian Dis., 16: 126 - 138, 1972b.

ROIZMAN, B.. The biochemical features of herpesvirus-infected cells, particularly as they relate to their potential oncogenicity. A review. In: "Oncogenesis and Herpesvirus", Riggs, p. m.; de Thé, G.; Payne, L. n. (eds.), IARC Scientific Publication No 2, International

Agency for Research on Cancer, Lyon, 1922, 1: 20, 1972.

ROSEN, A., GERGELY, P., JONDAL, M., KLEIN, G. & BRITTON, S..
Polyclonal Ig production after Epstein-Barr virus
infection of human lymphocytes in vitro. Nature (London),
267: 52 - 54, 1977.

ROSS, L.J.N.. Antiviral T cell-mediated immunity in Marek's
disease. Nature (London), 268: 644 - 646, 1977.

ROSS, L. J. N.. Mechanism of protection conferred by HVT. In
"Resistance Publ. Eur 6470 EN, EEC Brussels, Luxembourg,
289 - 297, 1980. and Immunity to Marek's disease" (P. M.
Biggs, ed.), CEC Publ. EUR 6470 EN, EEC Brussels,
Luxembourg, 289 - 297, 1980.

ROSS, L. J. N.. Molecular biology of the virus. In: "Marek's
disease. Scientific basis and methods of control". (L. N.
Payne, ed.), 114 - 150, 1985.

ROSS, L. J. N., BIGGS, P. M. & NEWTON, A. A.. Purification
and properties of the "A" antigen associated with Marek's
disease virus infection. J. Gen. Virol., 18: 291 - 304,
1973.

ROSS, L. J. N., POWELL, P. C., WALKER, D. J., RENNIE, M. &
PAYNE, L. N.. Expression of virus-specific, thymus-

specific and tumor-specific antigens in lymphoblastoid cell lines derived from Marek's disease lymphomas. J. Gen. Virol., 35: 219 - 235, 1977.

SANKAR, A. J., SUNDICK, R. S. & BROWN, T. R.. Analysis of the serum concentrations and antigenic determinants of thyroglobulin in chickens susceptible to autoimmune thyroiditis. J. Immunol., 131: 1252 - 1256, 1983.

SCHAT, K. A.. Characteristics of the virus. In: "Marek's disease. Scientific basis and methods of control". L. N. Payne, ed., Houghton Poultry Research Station, England. Martinus Nijhoff Publishing, ed. comm. Developments in Vet. Virol., 1: 77 - 112, 1985.

SCHAT, K. A. & CALNEK, B. W.. Characterization of an apparently non-oncogenic Marek's disease virus. J. Natl. Cancer Inst., 60: 1075 - 1082, 1978.

SCHAT, K. A., CALNEK, B. W. & FABRICANT, J.. Characterization of two highly oncogenic strains of Marek's disease virus. Avian Pathol., 11: 593 - 605, 1982a.

SCHAT, K. A., CHEN, C. L., SHEK, W. R. & CALNEK, B. W.. Surface antigens on Marek's disease lymphoblastoid tumor cell lines. J. Natl. Cancer Inst., 69: 715 - 720, 1982b.

SCHAT, K. A. & HELLER, D. H.. A chromium-release assay for the study of cell-mediated immune response to Marek's disease antigens. In "Proceedings on the International Symposium on Marek's disease" (B. W. Calnek and J. L. Spencer, eds.), 306 - 316. American Association of Avian Pathologists, Inc., Kennett Square, Pennsylvania. 1985.

SCHAT, K. A., SCHINAZI, R. F. & CALNEK, B. W.. Cell-specific antiviral activity of 1-(2-fluoro-2-deoxy-beta-D-arabinofuranosyl)-5-iodocytosine (FIAC) against Marek's disease herpesvirus and turkey herpesvirus. Antiviral Res., 4: 259 - 270, 1984.

SCHATTNER, A.. The origin of autoantibodies. Immunol. Letters, 14: 143 - 153, 1986/1987.

SCOTT, MC. V. & SHUMAN, W.. Use of multiple antigen substrates to detect antinuclear antibody in canine sera. Vet. Immunol. Immunopathol., 28: 37 - 43, 1991.

SEVOIAN, M., CHAMBERLAIN, D. M. & COUNTER, F. T.. Avian lymphomatosis. I. Experimental reproduction of the neural and visceral forms. Vet. Med., 57: 500 - 501, 1962.

SHARMA, J. M.. "In vitro" cell association of Marek's disease herpesvirus. Am. J. Vet. Res., 32: 291 - 301, 1971.

SHARMA, J. M. & COULSON, B. D.. Cell-mediated cytotoxic response to cells bearing Marek's disease tumor-associated surface antigen in chickens infected with Marek's disease. *J. Natl. Cancer Inst.*, **58**: 1647 - 1652, 1977.

SHARMA, J. M., WITTER, R. L. & COULSON, B. D.. Development of cell-mediated immunity to Marek's disease tumor cells in chickens inoculated with Marek's disease vaccines. *J. Natl. Cancer Inst.*, **61**: 1273 - 1280, 1978.

SILVA, A. G.. La Maladie de Marek: recherche d'une nouvelle possibilité de protection utilisant une protéine purifiée. These Docteur es Sciences. Université François Rabelais, Tours, France. 1987.

SILVA, R. F. & LEE, L. F.. Monoclonal antibody-mediated immunoprecipitation of proteins from cells infected with Marek's disease virus or turkey herpesvirus. *Virology*, **136**: 307 - 320, 1984.

SILVA, R. F. & LEE, L. F.. Isolation and partial characterization of viral polypeptides common to Marek's disease virus and herpesvirus of turkeys. In: "Proceedings of the International Symposium on Marek's disease (B. W. Calnek and J. L. Spencer, eds.), 101 - 110. American Association of Avian Pathologists, Inc., Kennett Square, Pennsylvania, 1985.

- SITHOLE, I., COUSSENS, P. M., LEE, L. F. & VELICER, L. F.,
Synthesis and processing of the Marek's disease
herpesvirus B antigen glycoprotein complex. J. Virol.,
62: 4270 - 4279, 1988.
- SMITH, M. W. & CALNEK, B. W., Effect of virus pathogenicity
on antibody production in Marek's disease. Avian Dis.,
17: 727 - 736, 1973.
- SOLOMON, J. J., WITTER, R. L., NAZERIAN, K. & BURNESTER, B.
R., Studies on the etiology of Marek's disease. I.
Propagation of the agent in cell culture. Proc. Soc.
Exptl. Biol. Med., 127: 173 - 177, 1968.
- SPENCER, J. L., GRUNDER, A. A., ROBERTSON, A. & SPECKMANN, G.
W., Attenuated Marek's disease herpesvirus: protection
conferred on strains of chickens varying in genetic
resistance. Avian Dis., 16: 94 - 107, 1972.
- SUGIMOTO, C., KODAMA, H. & MIKAMI, T., Antitumor immunity
against Marek's disease-derived lymphoblastoid cell line
(MSB - 1). Jpn. J. Vet. Res., 26: 57 - 67, 1978.
- SUTHERLAND, J. C. & MARDINEY, M. R., Immune complex disease
in kidneys of lymphoma-leukemia patients: the presence of
an oncornavirus related antigen. J. Natl. Cancer Inst.,
50: 633 - 639, 1973.

SUTHERLAND, J. C., MARKHAM, R. V., RAMSEY, H. E. & MARDINEY, M. R.. Sub-clinical immune complex nephritis in patients with Hodgkin's disease. *Cancer Res.* 34: 1179 - 1181, 1974.

SUTTON, R. N. F., EMOND, R. T. D., THOMAS, D. B. & DONIACH, D.. The occurrence of autoantibodies in infectious mononucleosis. *Clin. Exp. Immunol.* 17: 427 - 436, 1974.

TOWBIN, H., STAHEFLIN, T. & GORDON, J.. Electroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76: 4350 - 4354, 1979.

VAN der WALLE & WINKLE-JUNIS. De Neuritis-epizootie bij kippen te Barneveld in 1921. *T. Vergelijk. Geneesk. Gezondh. leer*, 10: 34 - 50, 1924.

VAN ZAANE, D., BRINKHOF, J. M. A., WESTENBRINK, F. & GIELKENS, A. L. J.. Molecular-biological characterization of Marek's disease virus. I. Identification of virus-specific polypeptides in infected cells. *Virology*, 121: 116 - 132, 1982a.

VAN ZAANE, D., BRINKHOF, J. M. A., WESTENBRINK, F. & GIELKENS, A. L. J.. Molecular-biological characterization of Marek's disease virus. II. Differentiation of various

MDV and HVT strains. Virology, 121: 133 - 146, 1982b.

VELICER, L. F., YAGER, D. R. & CLARK, J. L.. Marek's disease herpesvirus. III. Purification and characterization of Marek's disease herpesvirus B antigen. J. Virol., 27: 205 - 217, 1978.

VON BULOW, V. & BIGGS, P. M.. Differentiation between strains of Marek's disease virus and turkey herpesvirus by immunofluorescence assays. Avian Pathol., 4: 133 - 146, 1975a.

VON BULOW, V. & BIGGS, P. M.. Precipitating antigens associated with Marek's disease virus and a herpesvirus of turkeys. Avian Pathol., 4: 147 - 162, 1975b.

VON BULOW, V. & SCHMID, D. O.. Antigenic characteristics of Marek's disease tumor cells. In "Resistance and Immunity in Marek's disease" (P. M. Biggs, ed.), CEC Publ. EUR 6470 EN, EEC Brussels, Luxembourg., 364 - 376, 1980.

WITEBSKY, E., KITE, J.H., WICK, G. & COLE, R. K.. Spontaneous thyroiditis in the obese strains of chickens. 1. Demonstration of circulating autoantibodies. J. Immunol., 103: 708 - 715, 1969.

WITTER, R. L. & FADLY, A. M.. Characteristics of some

selected Marek's disease virus field isolates. In: Biggs P. M. (ed.) Resistance and Immunity to Marek's disease. CEC Publication EUR 6470, Luxembourg, 181 - 191, 1980.

WITTER, R. L., NAZERIAN, K., PURCHASE, H. G. & BURGOYNE, G.

H.. Isolation from turkeys of a cell associated herpesvirus antigenically related to Marek's disease virus. Am. J. Vet. Res., 31: 525 - 538, 1970.

WITTER, R. L., NAZERIAN, K. & SOLOMON, J.J.. Studies on the in vivo replication of turkey herpesvirus. J. Natl. Cancer Inst., 49: 1121 - 1130, 1972.

WITTER, R. L., SHARMA, J. M. & FADLY, A. M.. Pathogenicity of variant Marek's disease virus isolants in vaccinated and unvaccinated chickens. Avian Dis., 24: 210 - 232, 1980.

WITTER, R. L., SHARMA, J. M. & OFFENBECKER, L.. Turkey herpesvirus infection in chickens: induction of lymphoproliferative lesions and characterization of vaccinal immunity against Marek's disease. Avian Dis., 20: 676 - 692, 1976.

WITTER, R. L., STEPHENS, E. A., SHARMA, J. M. & NAZERIAN, K.. Demonstration of a tumor associated surface antigen in Marek's disease. J. Immunol., 115: 177 - 183, 1975.

YAMAGUCHI, S., KAWAMURA, H., MATSUDA, H. & KATO, S..

Establishment of Marek's disease lymphoblastoid cell lines from chickens BABK of blood groups. Biken J., 22: 35 - 40, 1979.

ZANDER, D. V.. Experiences with epidemic tumour control.

Proc. 8th Annual West Poultry Disease Conf. Davis, Californy, 18 - 24, 1959.

ZANDER, D. V., HILL, R. W., RAYMOND, R. G. & BALCH, R. K..

The use of blood from selected chickens as an immunizing agent for Marek's disease. Avian Dis., 16: 163 - 178, 1972.

ZANELLA, A., VALANTINES, G., GRANELLI, G. & CASTELLI, G..

Influence of strain of chickens the immune response to vaccination against Marek's disease. Avian Pathol., 4: 247 - 253, 1975.

ZYGRAICH, N. & HUYGELEN, C.. Inoculation of one-day-old

chicks with different strains of turkey herpesvirus. II. Virus replication in tissues of inoculated animals. Avian Dis., 16: 793 - 798, 1972.