

# Lesões viscerais induzidas experimentalmente pela inoculação de uma amostra artrotrópica de reovírus em frangos de corte (*Gallus gallus*)\*

Visceral lesion induced experimentally by an artrotropic strain of reovirus in broiler (*Gallus gallus*)

Simone Bertozi de Souza VASCONCELOS<sup>1</sup>; José Américo BOTTINO<sup>1</sup>;  
José Luiz GUERRA<sup>1</sup>; José Antonio JEREZ<sup>2</sup>

CORRESPONDÊNCIA PARA:  
Simone Bertozi de Souza Vasconcelos  
Departamento de Patologia da  
Faculdade de Medicina Veterinária e  
Zootecnia da USP  
Av. Prof. Dr. Orlando Marques de  
Paiva, 87  
Cidade Universitária Armando de  
Salles Oliveira  
05508-900 - São Paulo - SP  
e-mail: bertozi@bol.com.br

1- Departamento de Patologia da  
Faculdade de Medicina Veterinária e  
Zootecnia da USP - SP  
2- Departamento de Medicina  
Veterinária e Saúde Animal da  
Faculdade de Medicina Veterinária e  
Zootecnia da USP - SP

## RESUMO

Este trabalho descreve as lesões viscerais induzidas pela inoculação oral e podal de uma amostra artrotrópica de reovírus aviário (S-1133) em pintos de corte de um dia de idade. Realizou-se o exame histopatológico de fragmentos da Bursa de Fabricius, intestinos, fígado, baço e miocárdio utilizando-se cinco aves dos grupos inoculados e do grupo controle, nos períodos de 24, 48, 72 horas e semanalmente até a oitava semana após a inoculação. No miocárdio, observou-se miocardite intersticial 48 horas pós-inoculação, miocardite necrótica e pericardite na primeira semana após a inoculação. Houve no pericárdio, na segunda semana após a inoculação, a formação de folículos linfóides e seu espessamento fibroso em períodos subsequentes até a oitava semana. No fígado, foi observado um infiltrado inflamatório misto 72 horas após a inoculação e degeneração vacuolar e necrose dos hepatócitos na primeira semana pós-inoculação. Observou-se, ainda, a presença de tecido linfóide ativo e de infiltrado heterofílico na segunda semana após a inoculação, persistindo até o final do experimento. Verificou-se necrose progressiva do tecido esplênico de 48 horas até a primeira semana após a inoculação e a partir da segunda semana observou-se hiperplasia dos folículos linfóides esplênicos. Os demais órgãos examinados não apresentaram alterações. As lesões viscerais foram similares ocorrendo simultaneamente nos dois grupos inoculados, contudo as alterações foram mais severas no grupo inoculado no coxim plantar.

UNOTERMS: Reoviridae; Aves domésticas.

## INTRODUÇÃO

Embora a tenossinovite seja considerada a manifestação mais importante da infecção reovírica em galinhas, diversos estados mórbidos estão associados ao reovírus aviário<sup>14</sup>, como a ocorrência de distúrbios entéricos e respiratórios, hepatite, hidropericárdio, miocardite, pericardite e pancreatite. Esta é uma indicação de que os reovírus aviários não são limitados em suas lesões, e um reovírus isolado é capaz de induzir severas ou todas as manifestações que são descritas nas infecções reovíricas<sup>3,5,17</sup>. Estudos de patogenicidade realizados com amostras de reovírus demonstraram a ampla distribuição do reovírus artrotrópico em vários tecidos durante os estágios iniciais da infecção<sup>2,9,13</sup>. Pouco se sabe sobre o comprometimento visceral na inoculação de uma amostra artrotrópica de reovírus aviário, bem como o tropismo e a patogênese das lesões viscerais quando se utilizam diferentes vias de inoculação. Desta forma, propusemos o estudo seqüencial das alterações em órgãos, potencialmente alvos, na inoculação oral e podal do reovírus artrotrópico em pintos de corte.

## MATERIAL E MÉTODO

### Reovírus

Para a indução experimental da infecção foi utilizada a amostra artrotrópica de reovírus isolada por Bottino<sup>1</sup> com identidade sorológica com a amostra S-1133<sup>18</sup> mantida em freezer a -20°C.

### Aves

Foram utilizados pintos de corte (Linhagem Hubbard) de um dia de idade, divididos aleatoriamente em grupos de 55 aves, sendo cada grupo alojado em gaiolas de arame dentro de salas isoladas do Centro Experimental de Patologia Aviária no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. As aves receberam água e ração comercial Anhangüera (Du frango) *ad libitum*. Um grupo de 55 pintos de um dia de idade foi inoculado no coxim plantar esquerdo com 0,1 ml de uma suspensão de reovírus contendo 10<sup>4,8</sup> DICT 50 (Dose infectante em cultura de tecido 50%) /0,05 ml. Outro grupo de 55 pintos também de um dia de idade foi inocula-

\* O presente trabalho foi desenvolvido com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Laboratório Biovet S.A.

do por via oral com 0,5 ml de uma suspensão de reovírus contendo  $10^{6.5}$  DICT50/0.05 ml. E o grupo controle foi representado por um total de 55 aves não inoculadas.

### Sacrifício e Necropsia

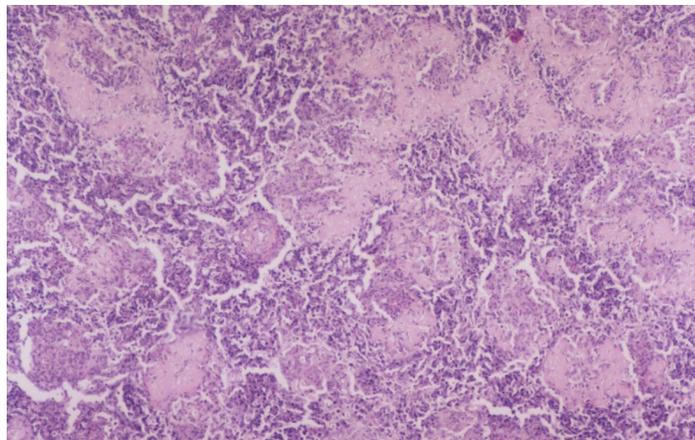
As aves foram sacrificadas por método de deslocamento cervical nos períodos de 24, 48 e 72 horas, e semanalmente desde a primeira até a oitava semana após a inoculação viral, utilizando-se 5 aves de cada grupo para cada período de sacrifício. Após o sacrifício, as aves foram necropsiadas procedendo-se à colheita de fragmentos representativos da Bursa de Fabrício, intestinos, fígado, baço e miocárdio para exame histopatológico.

### Histopatologia

Os fragmentos de Bursa de Fabrício, intestinos, fígado, baço e miocárdio, colhidos durante a necropsia, foram fixados em formol 10%, desidratados em álcool, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Os fragmentos incluídos em parafina foram cortados com a espessura de 5  $\mu$ m com o auxílio de micrótomo e corados pelo método de Hematoxilina e Eosina (HE)<sup>12</sup>. Após a montagem com bálsamo do Canadá, as lâminas foram observadas no microscópio óptico.

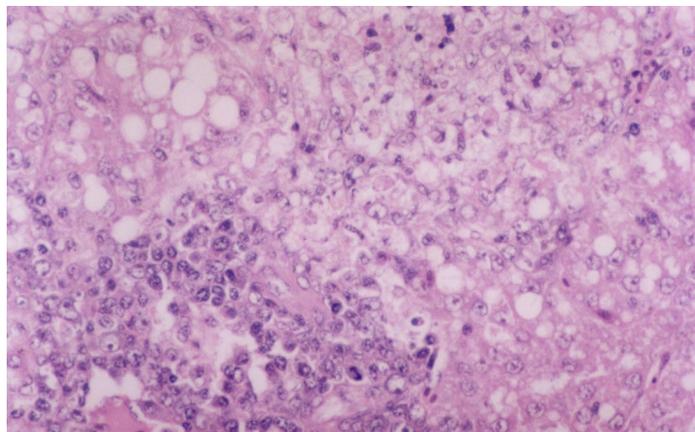
## RESULTADOS

A primeira alteração observada nos órgãos examinados foi a necrose focal da área central de alguns folículos esplênicos 48 horas após a inoculação, não só em aves inoculadas no coxim plantar mas também em aves inoculadas por via oral. Setenta e duas horas após a inoculação, observou-se miocardite intersticial difusa, infiltrado inflamatório heterofílico e mononuclear no fígado, como também que a necrose esplênica tornara-se mais severa durante este período. Uma semana após a inoculação, necrose e hialinização se estabeleceram em quase todo o tecido esplênico (Fig. 1). Aves de ambos os grupos inoculados apresentaram, uma semana após a inoculação, miocardite necrótica e pericardite com infiltrado de células mononucleares. No fígado, observou-se, na primeira semana após inoculação oral e podal, a persistência do infiltrado mononuclear com a ausência de heterófilos, degeneração vacuolar e necrose dos hepatócitos, sendo tais alterações mais severas no grupo inoculado no coxim plantar (Fig. 2). Na segunda semana após a inoculação, foram evidenciadas a hiperplasia reacional dos folículos esplênicos e a formação de folículos linfóides no pericárdio e fígado, com a presença de células blásticas em mitose nos folículos linfóides hepáticos, em ambos os grupos inoculados. A pericardite com espessamento fibroso do pericárdio e presença de folículos linfóides foi observada até a oitava semana pós-inoculação (Fig. 3). A partir da segunda semana após a inoculação foi evidenciado também um infiltrado heterofílico em meio ao tecido linfóide difuso do fígado, localizado predominantemente no espaço porta em ambos os grupos inoculados. Não foram observadas alterações nos demais órgãos examinados durante o transcorrer de todo o período experimental. Os cortes histológicos de órgãos das aves pertencentes ao grupo controle, não inoculado, não apresentaram alterações.



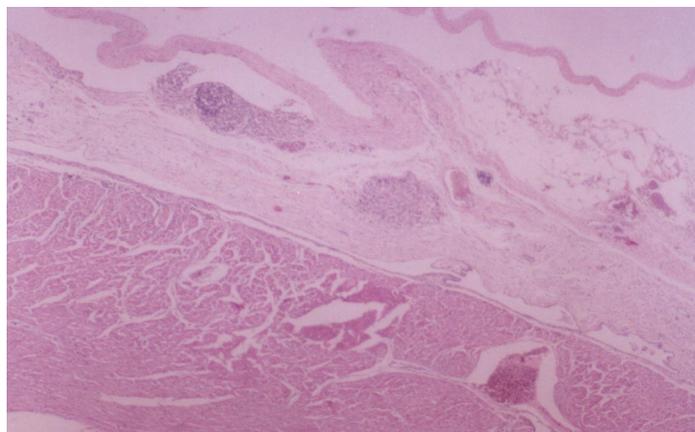
**Figura 1**

Fotomicrografia de corte histológico de baço de ave inoculada com reovírus com uma semana de evolução, mostrando os folículos linfóides quase completamente substituídos por necrose e hialinização. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento: 138X.



**Figura 2**

Fotomicrografia de corte histológico de fígado de ave inoculada com reovírus com uma semana de evolução, mostrando infiltrado composto por células mononucleares, degeneração vacuolar e necrose de hepatócitos. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento: 360X.



**Figura 3**

Fotomicrografia de miocárdio de ave inoculada com reovírus com 8 semanas de evolução, mostrando espessamento fibroso do pericárdio e presença de folículos linfóides. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento: 34X.

## DISCUSSÃO

De acordo com Kai e Fletcher<sup>8</sup> e Jones et al.<sup>7</sup>, a entrada e replicação primária do reovírus, na infecção natural ou experimental por via oral, ocorre no epitélio intestinal e Bursa de Fabrícus dentro de doze horas, entretanto, não foram observadas alterações nos cortes histológicos de intestino e Bursa de Fabrícus examinados durante todo o período experimental. É possível que a progênie do reovírus seja liberada através da ruptura das células epiteliais havendo um rápido restabelecimento do epitélio, impossibilitando a observação das lesões intestinais<sup>9</sup>. Jones et al.<sup>7</sup> detectaram a presença de partículas virais no fígado e rins seis horas após a inoculação, demonstrando a ocorrência de viremia nas primeiras horas após a infecção. A presença de necrose dos folículos esplênicos 48 horas após a inoculação e a de infiltrado inflamatório no miocárdio e fígado 72 horas após a inoculação reforçam a ocorrência de viremia e, ainda, a ampla distribuição do reovírus artrótrópico nos tecidos da ave durante a infecção. As lesões hepáticas foram mais pronunciadas no fígado de aves inoculadas no coxim plantar, se comparadas ao grupo inoculado por via oral. Possivelmente, o reovírus atinge mais prontamente o fígado quando inoculado no coxim plantar<sup>11</sup>, via hematogênica, enquanto na inoculação oral o reovírus tem que invadir o trato entérico havendo grande perda de título viral, mesmo após a sua inoculação em altas doses. De acordo com Kai e Fletcher<sup>8</sup>, uma vez que os reovírus tenham atingido o fígado, replicar-se-ão nos hepatócitos, ocasionando a degeneração vacuolar e necrose que foram observadas uma semana após a inoculação. Lesões necróticas do fígado foram citadas por diversos autores<sup>4,10,19</sup>, sendo considerado órgão-alvo para os reovírus<sup>6</sup>. Na primeira semana após a inoculação, ficou evidente que as alterações cardíacas e esplênicas intensificaram-se tanto no grupo inoculado no coxim plantar como por via oral, entretanto, da mesma forma que foi verificado no fígado, as aves inoculadas no coxim plantar apresentaram lesões hepáticas mais severas. A necrose e a hialinização dos folículos esplênicos que comprometeram quase completamente o tecido esplênico, uma semana após a inoculação, foi também observada por Yawei e Kemp<sup>19</sup>, entre o quarto e o sexto dia após a inoculação do reovírus. Estas lesões necróticas não foram mais evidenciadas no baço a partir da segunda semana após a inoculação, parecendo ter havido um restabelecimento do tecido linfóide esplênico. A re-

geração do tecido linfóide do baço foi observada em camundongos que apresentaram fibrose esplênica após dieta hipoprotéica<sup>20</sup>, no entanto, mais estudos são necessários para demonstrar se o tecido linfóide esplênico das aves, de maneira similar ao do camundongo, também apresenta esta capacidade regenerativa. Na segunda semana após a inoculação, houve uma resposta concomitante do tecido linfóide no pericárdio, fígado e baço, com a formação de folículos linfóides e hiperplasia reacional dos folículos esplênicos em ambos os grupos inoculados, sendo esta resposta relacionada à fase de cronificação da doença<sup>16,19</sup>. É interessante salientar que a partir da segunda semana pós-inoculação verificou-se no fígado, além do tecido linfóide organizado, um infiltrado heterofílico em meio ao tecido linfóide difuso hepático, já descrito anteriormente, por Islam et al.<sup>4</sup> na terceira semana após a inoculação. A presença dos heterófilos é considerada uma lesão hepática inespecífica, freqüentemente observada na existência de inflamação crônica extra-hepática<sup>15</sup>.

## CONCLUSÕES

Os dados apresentados no presente trabalho permitiram emitir as seguintes conclusões:

- 1) Em estágios iniciais da infecção o reovírus artrótrópico encontra-se amplamente distribuído nos tecidos da ave.
- 2) As lesões viscerais induzidas pelo reovírus são similares, ocorrendo simultaneamente tanto em aves inoculadas no coxim plantar como nas inoculadas pela via oral.
- 3) Em ambas as vias de inoculação utilizadas, a organização do tecido linfóide nos órgãos estudados ocorre simultaneamente na segunda semana após a inoculação.
- 4) As lesões induzidas pelo reovírus são mais severas em aves inoculadas no coxim plantar.

## AGRADECIMENTOS

Nossos agradecimentos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro no desenvolvimento da pesquisa. Agradecemos, também, ao Laboratório Biovet S.A. e a Marinalva Paula de Oliveira pelo auxílio na realização dos trabalhos de laboratório.

## SUMMARY

This paper describes visceral lesions induced by inoculation of one-day-old broiler chicks with an avian reovirus strain (S-1133) by oral and foodpad routes. The bursa of Fabrícus, intestine, liver, spleen and heart of five birds from inoculated and control groups were collected in the periods of 24, 48, 72 hours and at weekly intervals from 1 to 8 weeks post inoculation for histopathological examination. Interstitial myocarditis was observed 48 hours post inoculation, pericarditis and necrotic myocarditis were seen in the first week post inoculation. The pericardium presented lymphoid follicles at 2 weeks post inoculation and in the subsequent periods there was progressive fibrosis seen until 8 weeks post inoculation. In the liver, infiltration of heterophils and mononuclear cells was observed 72 hours post inoculation, followed by degeneration and necrosis of hepatocytes at one week post inoculation. Lymphoid follicles and heterophilic infiltration were seen from 2 to 8 weeks post inoculation. The spleen presented a progressive necrosis from 48 hours to one week post inoculation and at 2 weeks post inoculation hyperplasia lymphoid was observed in the splenic tissue. No lesions were seen in the other examined organs. Visceral lesions were similar occurring simultaneously in both inoculated groups, nevertheless the lesions were more severe in the group inoculated via foodpad.

UNITERMOS: Reoviridae; Domestic Avian.

## REFERÊNCIAS

- 1- BOTTINO, J. A. **Caracterização do agente da artrite viral de *Gallus gallus* (Linnaeus, 1758)**. Aspectos clínicos, radiográficos e anátomo-patológicos da infecção experimental. 1978. 63 f. Dissertação (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 2- ELLIS, M. N.; EIDSON, C. S.; FLETCHER, O. J.; KLEVEN, S. H. Viral tissue tropisms and interferon production in White Leghorn chickens infected with two avian reovirus strains. **Avian Diseases**, v. 27, n. 3, p. 644-651, 1983.
- 3- GOUVEA, V.; SCHNITZER, T. J. Pathogenicity of avian reoviruses: examination of six isolates and a vaccine strain. **Infective Immunology**, v. 38, n. 2, p. 731-738, 1982.
- 4- ISLAM, M. R.; JONES, R. C.; KELLY, D. F. Pathogenesis of experimental reovirus tenosynovitis in chickens: influence of the route of infection. **Journal of Comparative Pathology**, v. 98, n. 3, p. 325-336, 1988.
- 5- ITO, N. M. K.; PRESTES, A. A.; NICIPORCIUKAS, M. C. Implicações do reovírus na síndrome de má absorção. In: SEMINÁRIO DOS PRODUTORES DE PINTOS DE CORTE, 3., 1986, Campinas. **Anais**. Campinas: Associação dos Produtores de Frangos de Corte, 1986. p. 73-80.
- 6- JONES, R. C.; AL-AFALEQ, A.; SAVAGE, C. E.; ISLAM, M. R. Early pathogenesis in chicks of infection with a trypsin-sensitive avian reovirus. **Avian Pathology**, v. 23, n. 1, p. 683-692, 1994.
- 7- JONES, R. C.; ISLAM, M. R.; KELLY, D. F. Early pathogenesis of experimental reovirus infection in chickens. **Avian Pathology**, v. 18, n. 1, p. 239-253, 1989.
- 8- KAI, N. T.; FLETCHER, O. J. Application of the avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) technique for detecting avian reovirus in chickens. **Avian Diseases**, v. 33, n. 31, p. 591-596, 1987.
- 9- KIBENGE, F. S. B.; GWAZE, G. E.; JONES, R. C.; CHAPMAN, A. F.; SAVAGE, C. E. Experimental reovirus infection in chickens: observations on early viraemia and virus distribution in bone marrow, liver and enteric tissues. **Avian Pathology**, v. 14, n. 1, p. 87-98, 1985.
- 10- LANQUING, L.; GIAMBRONE, J. J.; PANANGALA, V. S.; HOERR, F. J. Production and characterization of monoclonal antibodies against avian reovirus strain S1133. **Avian Disease**, v. 40, n. 2, p. 349-357, 1996.
- 11- MANDELLI, G.; RAMPIN, T.; FINAZZI, M. Experimental reovirus hepatitis in newborn chicks. **Veterinary Pathology**, v. 15, n. 5, p. 531-543, 1978.
- 12- McMANUS, J. F. A.; MOWRY, R. W. **Staining methods: histologic and histochemical**. 3.ed. London: Hoeber Medical Division Harper & Row Publishers, 1965. 423 p.
- 13- MENENDEZ, N. A.; CALNEK, B. W.; COEWN, B. S. Experimental egg transmission of avian reovirus. **Avian Diseases**, v. 19, n. 6, p. 104-111, 1975.
- 14- OLSON, N. O. Reovirus infections. In: HOFSTADT, M. S. **Diseases of poultry**. 7.ed. Ames: Iowa State University Press, 1978. p. 641-647.
- 15- RANDALL, C. J.; REECE, R. L. **Color atlas of avian histopathology**. Turin: Mosby-Wolfe. Times Mirror International, 1996. 232 p.
- 16- ROSENBERGER, J. K.; OLSON, N. O. Reovirus infections. In: CALNEK, B. W. **Diseases of poultry**. 9.ed. Iowa: Iowa State University Press, 1991. p. 639-646.
- 17- TAKASE, K.; NISHIKAWA, H.; KATSUKI, N.; YAMADA, S. Pathogenicity of avian reoviruses isolated from tendons and tendon sheaths of chickens with leg weakness. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 46, n. 3, p. 467-473, 1984.
- 18- VAN DER HEIDE, L.; KALBAC, M. Infectious tenosynovitis (viral arthritis): characterization of a Connecticut viral isolat as a reovirus and evidence of viral egg transmission by reovirus infected broiler breeders. **Avian Diseases**, v. 19, n. 4, p. 683-688, 1976.
- 19- YAWEI, N.; KEMP, M. C. A comparative study of avian reovirus pathogenicity: virus spread and replication and induction of lesions. **Avian Diseases**, v. 39, n. 5, p. 554-566, 1995.
- 20- XAVIER, J. G. **Repercussões estruturais da desnutrição protéica e renutrição em tecidos linfematopoiéticos de camundongos**. 1999. 254 f. Dissertação (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Recebido para publicação: 29/11/1999

Aprovado para publicação: 02/07/2001