

PATOGÊNESE DA ENTEROPATIA PROLIFERATIVA SUÍNA – REVISÃO DE LITERATURA

Carlos Eduardo Real Pereira¹
Fabio Augusto Vannucci²
João Carlos Pereira da Silva³
Roberto Maurício Carvalho Guedes^{4*}

RESUMO

A enteropatia proliferativa, causada pela *Lawsonia intracellularis*, é uma doença entérica com distribuição mundial que afeta uma variedade de animais, principalmente os suínos. Apesar das dificuldades de isolamento da *L. intracellularis*, alternativas no cultivo e desenvolvimento de modelos experimentais utilizando culturas puras tornou-se possível uma melhor caracterização da patogênese desta condição mórbida, pelas interações *in vivo* e *in vitro* entre a bactéria e a célula hospedeira. Sabe-se da capacidade da *L. intracellularis* infectar células das criptas intestinais mitoticamente ativas e, em seguida, multiplicar e propagar nas células originadas da divisão. Após o sucesso do crescimento e manutenção *in vitro* da *L. intracellularis*, vários estudos tornaram-se possíveis de serem realizados, entretanto a continuidade de pesquisas nesta área é requerida a fim de melhor compreender detalhes da patogênese desta bactéria.

Palavras-chave: *Lawsonia intracellularis*, patogênese, ileíte, diarreia

PATHOGENESIS OF PORCINE PROLIFERATIVE ENTEROPATHY - REVIEW

ABSTRACT

Proliferative enteropathy is a widespread enteric disease caused by *Lawsonia intracellularis* that infects a variety of animals, most notably pigs. Despite extreme difficulties in isolating *L. intracellularis*, innovations in the cultivation and the development of pure culture challenge models, have opened doors to better characterization of the pathogenesis of proliferative enteropathy *in vivo* and *in vitro*. The ability of *L. intracellularis* to infect dividing enterocytes in the intestinal crypts and then multiply and spread in these cells is well-described. After the successful growth and maintenance of *L. intracellularis in vitro*, several advances became possible but more studies have to be conducted in order to better understand the pathogenesis of *L. intracellularis* infections.

Keywords: *Lawsonia intracellularis*, pathogenesis, ileitis, diarrhea

PATOGÊNESE DE LA ENTEROPATÍA PROLIFERATIVA PORCINA – REVISIÓN DE LA LITERATURA

RESUMÉN

La enteropatía proliferativa, causada por *Lawsonia intracellularis*, es una enfermedad entérica con distribución mundial que afecta una grande variedad de animales, especialmente cerdos.

¹ Mestrando em Patologia Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG – Belo Horizonte – MG - Brasil

² Doutorando em Patobiologia da University of Minnesota – St. Paul – MN – Estados Unidos

³ Professor de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Viçosa – Viçosa – MG - Brasil

⁴ Professor de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais – Belo Horizonte – MG - Brasil

* Autor para correspondência: Roberto M. C. Guedes. Email: guedesufmg@gmail.com Endereço: Depto. de Clínica e Cirurgias Vet. EV-UFMG – Av. Antonio Carlos, 6627 – Belo Horizonte – MG – Brasil. CEP: 30123-970 Tel.: (31) 3409-2258.

A pesar de las dificultades de aislamiento y cultivo de *L. intracellularis*, las alternativas en el cultivo y el desarrollo de modelos experimentales utilizando cultivos puros tornaron posible una mejor caracterización de la patogénesis de esta condición mórbida a través de interacciones in vivo e in vitro entre bacterias y células huéspedes. Es bien conocida la capacidad de *L. intracellularis* para infectar células de las criptas intestinales con actividad mitótica, seguida por su multiplicación y propagación en las células resultantes de esta división. El cultivo y mantenimiento exitosos in vitro de *L. intracellularis* posibilitó la realización de diversos estudios. Sin embargo, para comprender mejor los detalles de la patogénesis de esta bacteria es necesario continuar con la investigación en esta área.

Palabras clave: *Lawsonia intracellularis*, patogénesis, ileitis, diarrea

INTRODUÇÃO

A *Lawsonia intracellularis* é uma bactéria gram negativa, intracelular obrigatória, microaerófila, móvel e causadora da enteropatia proliferativa suína (EPS) (1).

De acordo com McOrist e Gebhart (2) a EPS tem duas formas mais frequentes de apresentação: a forma crônica conhecida como adenomatose intestinal suína observada mais comumente em animais de crescimento entre 6 e 20 semanas de idade e caracterizada por anorexia, diarréia e redução do ganho de peso. A forma aguda, também conhecida como enteropatia proliferativa hemorrágica, acomete animais mais velhos de 4 a 12 meses e é caracterizada por fezes enegrecidas (melena) e morte súbita. Existe ainda a forma subclínica em que não se observam sinais clínicos, mas tem grande importância epidemiológica pela possibilidade de ocorrer a disseminação silenciosa do agente.

Macroscopicamente, as lesões características da enteropatia proliferativa são usualmente encontradas no íleo embora, com menor frequência, possam ser encontradas no ceco, colón e jejuno. Na forma aguda as lesões são caracterizadas por edema e hiperemia do mesentério e espessamento da parede intestinal. A mucosa se apresenta com pregas evidentes e conteúdo hemorrágico pode ser observado no lúmen intestinal (3). Já a forma crônica, consiste em edema de mesentério, aspecto cerebróide da serosa intestinal, espessamento da mucosa intestinal e presença de membrana necrótica aderida a mucosa.

Em linhas gerais o aspecto histológico de ambas as formas tem as mesmas características. Pode ocorrer proliferação dos enterócitos das criptas no intestino delgado e, às vezes, presença da bactéria no ápice dos enterócitos quando se utiliza técnicas especiais de coloração como a prata. As vilosidades se apresentam atrofiadas com reduzido número de células caliciformes e a presença de células inflamatórias não é observada com frequência. Uma distinção que caracteriza a forma aguda é a observação de acentuada hiperemia da mucosa e acúmulo de sangue no lúmen intestinal (2).

A diarréia observada em animais de recria e terminação pela sua baixa especificidade necessita da coleta de amostras para exames complementares. Fragmentos intestinais fixados em formol para coloração de rotina (H&E), colorações especiais (impregnação pela prata) e imuno-histoquímica (3-5) permitem chegar ao diagnóstico definitivo. Alternativamente, podem ser usadas outras técnicas diagnósticas *ante mortem*, para isso torna-se necessário amostras de fezes ou soro, a serem avaliados pela PCR e IPMA (do inglês, *Immunoperoxidase monolayer assay*), respectivamente (6, 7). Tratam-se de testes altamente específicos para, respectivamente, detecção de regiões específicas presente no genoma da bactéria e de anticorpos IgG contra *L. intracellularis*.

A enteropatia proliferativa é melhor descrita e caracterizada nos suínos embora possa afetar inúmeras espécies tais como camundongos, hamster, coelhos, cães, cavalos, macacos entre outros (8, 9). A infecção ocorre por via fecal-oral com animais acometidos eliminando grandes quantidades de *L. intracellularis* chegando a ordem de 10^8 por grama de fezes e por

longo período (10). Pequena quantidade da bactéria é capaz de induzir a infecção contribuindo assim para alta prevalência da enfermidade em rebanhos suínos em todo o mundo.

Apesar do grande número de pesquisas sobre a patogênese da enteropatia proliferativa, ainda, existem alguns processos pouco conhecidos sobre a capacidade de infecção da *L. intracellularis* e sua interação com as células do hospedeiro.

REVISÃO DE LITERATURA

Após o sucesso no cultivo e propagação da *L. intracellularis in vitro* (11), recentemente foram desenvolvidos métodos alternativos (12), que tornaram possível o estudo dos mecanismos envolvidos na penetração do agente em células eucariotas, bem como, acompanhar a evolução do processo e dimensionar a multiplicação dessas bactérias. Exame de cultura de células infectadas pela *L. intracellularis* tem mostrado a capacidade da bactéria de ser internalizada rapidamente, podendo ser observada, intracelularmente, na primeira hora após a infecção em células susceptíveis. Para isso, a bactéria interage intimamente com a membrana da célula hospedeira e é internalizada no interior de vacúolos citoplasmáticos (13). Três horas após a inoculação podem ser observadas bactérias, ainda no interior de vacúolos, iniciando sua propagação no citoplasma das células. Do segundo ao sexto dia após a incubação é possível observar bactérias livres no citoplasma multiplicando-se por fissão binária. (11, 13).

Apesar de ainda não terem sido identificadas, a penetração da bactéria parece exigir interações específicas com a célula hospedeira (14). Recentemente, Vannucci et al. (15), ao realizar um estudo experimental utilizando cepas de *L. intracellularis* provenientes de porco e suíno observaram a espécie-especificidade desses diferentes isolados.

A sequência do genoma da *L. intracellularis* indica que, esta bactéria, pode possuir um sistema de secreção do tipo III, comumente encontrado em bactérias patogênicas gram-negativas, que poderia auxiliar a bactéria durante a invasão celular e a evasão do sistema imune do hospedeiro, liberando fatores proteicos diretamente no citoplasma das células eucariotas. Este mecanismo pode ser um importante fator de patogenicidade da bactéria (16). Lawson et al. (17), ao estudarem *in vitro* diversas variáveis que poderiam influenciar a internalização e propagação da bactéria, observaram inibição da propagação da *L. intracellularis*, quando utilizaram cicloheximida e colquicina, substâncias que atuam inibindo a divisão celular. Tal fato indica que a proliferação da bactéria depende intimamente do perfil metabólico das células hospedeiras e que as mesmas sejam mitoticamente ativas. As atividades citolítica e hemolítica foram demonstradas em estudos *in vitro* e *in vivo*, as quais, possivelmente, estejam associadas ao processo de penetração da bactéria nas células eucariotas (18, 19).

A reprodução experimental da enteropatia proliferativa utilizando culturas puras de *L. intracellularis* ou por meio de homogeneizado de mucosa de suínos com a enfermidade demonstraram ter eficácia similar no aparecimento e intensidade de sinais clínicos e lesões característicos da doença (20). As lesões macro e microscópicas se iniciam na segunda semana após a infecção, estudos experimentais demonstraram que o pico da doença é entre três e quatro semanas após a inoculação e a excreção das bactérias é detectada por quatro semanas, podendo chegar a até 10 semanas (21, 22). Estudos recentes demonstraram, por meio de avaliação experimental, a interação entre a bactéria e os enterócitos aproximadamente 12 horas após a inoculação por via oral (23). Deve ser registrado, no entanto, que esse período pode ser abreviado utilizando, *in vivo*, modelos experimentais com ligaduras de fragmentos de intestino e fazendo a inoculação direta nos fragmentos, resultando em interação em torno de três horas após a inoculação (24).

De forma semelhante aos eventos *in vitro*, dois a seis dias após a inoculação é possível observar a multiplicação das bactérias no citoplasma que, posteriormente, irão determinar o rompimento da membrana citoplasmática das células e liberação dos micro-organismos para o meio extracelular, ocasião em que estarão aptas a infectar novas células (8). Boutrup et al. (23) usando a técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), observaram a presença da *L. intracellularis* viáveis na lâmina própria e no interior de células mononucleares. Esta técnica consiste na utilização de uma sonda de oligonucleotídeos conjugada a um fluorocromo que tem como alvo o gene 16s do rRNA. A utilização deste alvo justifica-se pelo fato de todas as células necessitarem de ribossomos para a tradução, portanto, podem estar presentes em grandes quantidades em todas as células metabolicamente ativas (25). Por conseguinte, essa pode ser uma via alternativa na disseminação da infecção entre enterócitos.

A enteropatia proliferativa se inicia com a proliferação de enterócitos imaturos do intestino delgado e, por vezes, no intestino grosso quando há a migração aboral da bactéria facilitada pelo fluxo do muco (26). Em muitos casos são observadas reações inflamatórias de baixa intensidade (21). No entanto, a inflamação não é uma característica primária da infecção. Em estudo experimental utilizando hamsters, Johnson e Jacob (27) observaram que enterócitos imaturos do íleo, proliferam e chegam aos topos das vilosidades em até 14 dias após a infecção. A hiperplasia de enterócitos, associados a presença da *L. intracellularis* em hamsters, pôde ser observada por mais de 40 dias após o desafio utilizando homogeneizado de mucosa acometida por enteropatia proliferativa (28, 29). Em raros casos de enteropatia proliferativa, *L. intracellularis* pode ser observada em linfonodos mesentéricos e tonsilas, porém, aparentemente, não há proliferação bacteriana nestes locais, sugerindo que a ocorrência é resultante da inativação e degradação do micro-organismo por macrófagos (30). Ao contrário dos estudos *in vivo*, a proliferação celular não pode ser reproduzida *in vitro*. Alterações no índice de células em apoptose, com resultados contraditórios, já foram sugeridos em estudos anteriores (21, 31, 32), necessitando de futuros estudos para avaliar, de forma mais precisa, a proliferação celular e o papel da apoptose de enterócitos durante a infecção pela *L. intracellularis*.

Vannuci et al. (33) em um estudo *in vivo* utilizando hamsters como hospedeiro e homogeneizado de mucosa de suínos diagnosticados com EPS como inóculo para avaliação da patofisiologia da diarreia por *L. intracellularis* observaram uma redução significativa na absorção de glicose e dos eletrólitos avaliados (K^+ e Cl^-). Fatos que evidenciam ser a diarreia malabsortiva o principal processo envolvido na fisiopatologia da diarreia causada pela EPS, o que explica a perda de desempenho dos suínos acometidos pela *L. intracellularis*.

Para manutenção e propagação da cultura pura de *L. intracellularis in vitro* são necessárias passagens semanais em cultivo de células, que ao atingirem 100% de confluência, torna-se necessário a transferência da cultura da bactéria para novo frasco de cultivo com baixa confluência. Tal procedimento pode ser um fator a diminuir a patogenicidade da bactéria por adaptação as condições *in vitro* causadas principalmente por mutações genéticas ou mudanças na regulação da expressão gênica (34). Estudo *in vivo* demonstrou diferenças significativas entre a quantidade de bactérias eliminadas pelas fezes, intensidade da resposta imune, dos sinais clínicos e de lesões quando comparado a inoculação de cultura pura com 10, 20 e 40 passagens. Cumpre destacar que, com 10 e 20 passagens *in vitro* houve a reprodução da EPS, o que não foi observado nos suínos inoculados com cultura pura de *L. intracellularis* após 40 passagens *in vitro* (35). Complementando, em outro estudo, Vannucci, Foster e Gebhart (36) compararam a capacidade de transcrição de homólogos patogênicos (10 passagens) e não patogênicos (60 passagens). Observaram diferença em categorias funcionais que foram mais pronunciadas na adaptação, resposta ao stress, membrana celular, motilidade, transporte de membrana, biossíntese de micro e macromoléculas e divisão celular. Em todas essas categorias a cepa patogênica apresentou maior número de genes expressados. Esses

resultados indicam que os mecanismos envolvidos na patogenicidade da *L. intracellularis* parecem ser mais complexos do que previamente especulado

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar dos diversos estudos recentes a respeito da patogênese da *L. intracellularis* terem sido realizados, a continuidade das pesquisas nesta área é imprescindível no sentido de desenvolver novos conhecimentos visando subsidiar o melhor entendimento no que se refere a internalização e propagação da bactéria.

REFERÊNCIAS

1. Lawson GHK, McOrist S. The enigma of the proliferative enteropathies: a review. *J Comp Pathol.* 1993;108:41-6.
2. McOrist S, Gebhart CJ. Porcine proliferative enteropathies. In: Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ. *Diseases of swine.* 8ª ed. Ames: Iowa State University Press; 1999. p.521-34.
3. Ward GE, Winkelman NL. Recognizing the three forms of PE in swine. *Vet Med.* 1990;8:197-203.
4. Rowland AC. Necrotic enteritis and regional ileitis in pigs at slaughter. *Vet Rec.* 1978;91:338-9.
5. Guedes RMC, Gebhart CJ. Preparation and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies against *Lawsonia intracellularis*. *J Vet Diagn Invest.* 2003;15:438-46.
6. Gebhart CJ, Lin GF, McOrist S, Lawson GH, Murtaugh MP. Cloned DNA probes specific for the intracellular *Campylobacter* – like organism of porcine proliferative enteritis. *J Clin Microbiol.* 1991;29:1011-5.
7. Guedes RMC, Gebhart CJ, Winkelman NA, Mackie-Nuss RA, Marsteller TA, Deen J. Comparison of different methods for diagnosis of porcine proliferative enteropathy. *Can J Vet Res.* 2002;66:99-107.
8. Lawson GHK, Gebhart CJ. Proliferative enteropathy: review. *J Comp Pathol.* 2000;122:77-100.
9. Dauvillier J, Picandet V, Harel J, Gottschalk M, Desrosiers R, Jean D, et al. Diagnostic and epidemiological features of *Lawsonia intracellularis* enteropathy in 2 foals. *Can Vet J.* 2006;47:689-91.
10. Guedes RMC. Enteropatia proliferativa suína. In: Sobestiansky J, Barcellos D, editors. *Doenças dos suínos.* Goiânia: Cãnone Editorial; 2007. p.109-17.
11. Lawson GHK, McOrist S, Jasni S, Mackie RA. Intracellular bacteria of porcine proliferative enteropathy: cultivation and maintenance in vitro. *J Clin Microbiol.* 1993;31:1136-42.

12. Vannucci FA, Wattanaphansak S, Gebhart CJ. An alternative method for cultivation of *Lawsonia intracellularis*. *J Clin Microbiol*. 2012;50:1070-2.
13. McOrist S, Jasni S, Mackie RAM, Berschneider HM, Rowland AC, Lawson GHK. Entry of the bacterium ileal symbiont *intracellularis* into cultured enterocytes and its subsequent release. *Res Vet Sci*. 1995;59:255-60.
14. McOrist S, Mackie RAM, Lawson GHK, Smith DGE. In-vitro interactions of *Lawsonia intracellularis* with cultured enterocytes. *Vet Microbiol*. 1997;54:385-92.
15. Vannucci FA, Pusterla N, Mapes SM, Gebhart CJ. Evidence of host adaptation in *Lawsonia intracellularis* interaction. *Vet Res*. 2012;20:43-53.
16. Kroll JJ, Roof MB, Hoffman LJ, Dickson JS, Harris DLH. Proliferative enteropathy: a global enteric disease of pigs caused by *Lawsonia intracellularis*. *Anim Health Res Rev*. 2005;6:173-97.
17. Lawson GHK, Mackie RAM, Smith DGE, McOrist S. Infection of cultured rat enterocytes by ileal symbiont *intracellularis* depends on host cell function and actin polymerization. *Vet Microbiol*. 1995;45:339-50.
18. Hannigan J. Identification and preliminary characterization of *Lawsonia intracellularis* cytolytic activity M.Sc [thesis]. Edinburgh: University of Edinburgh; 1997.
19. McCluskey J, Hannigan J, Harris JD, Wren B, Smith DGE. LsaA, an antigen involved in cell attachment and invasion, is expressed by *Lawsonia intracellularis* during infection in vitro and in vivo. *Infect Immun*. 2002;70:2899-907.
20. Guedes RMC, Gebhart CJ. Comparison of intestinal mucosa homogenate and pure culture of the homologous *Lawsonia intracellularis* isolate in reproducing proliferative enteropathy in swine. *Vet. Microbiol*. 2003;93:159-66.
21. McOrist S, Roberts L, Jasni S, Rowland AC, Lawson GHK, Gebhart CJ, et al. Developed and resolving lesions in porcine proliferative enteropathy: possible pathogenic mechanisms. *J Comp Pathol*. 1996;115:35-45.
22. Smith SH, McOrist S. Development of persistent intestinal infection and excretion of *Lawsonia intracellularis* by piglets. *Res Vet Sci*. 1997;62:6-10.
23. Boutrup TS, Boesen HT, Boye M, Agerholm JS, Jensen TK. Early pathogenesis in porcine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. *J Comp Pathol*. 2010;143:101-9.
24. Boutrup TS, Schauer K, Agerholm JS, Jensen TK. Application of pig ligated intestinal loop model for early *Lawsonia intracellularis* infection. *Acta Vet Scand*. 2010;52:17-24.
25. Amann R, Fuchs BM. Single-cell identification by improved FISH. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6:339-48.
26. Jensen TK, Christensen BB, Boye M. *Lawsonia intracellularis* infection in the large intestines of pigs. *APMIS: Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. 2006;114:255-64.

27. Johnson EA, Jacob RO. Transmissible ileal hyperplasia of hamster. *Am J Pathol.* 1978;91:451-68.
28. Frisk C. The etiology and pathogenesis of hamster enteritis [thesis]. Missouri: University of Missouri; 1976.
29. Jacoby RO. Transmissible ileal hyperplasia of hamster. *Am J Pathol.* 1978;91:433-44.
30. Jensen TK, Moller K, Lindercona R, Jorsal SE. Detection of *Lawsonia intracellularis* in the tonsils of pigs with proliferative enteropathy. *Res Vet Sci.* 2000;68:23-6.
31. Machuca MA, Quiroga MA, Riganti J, Massone AR, Idiart JR, Amocida AD, et al. Porcine proliferative enteropathy: immune-labeling of proliferation cell nuclear antigen (PCNA) and apoptosis. In: *Anais do 9º Encontro Nacional de Patologia Veterinária; 1999, Belo Horizonte. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 1999. p.11.*
32. Guedes RMC. Porcine proliferative enteropathy: diagnosis, immune response and pathogenesis [thesis]. St. Paul: University of Minnesota; 2002.
33. Vannucci FA, Borges EL, Oliveira JSV, Guedes RMC. Intestinal absorption and histomorphometry of Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentally infected with *Lawsonia intracellularis*. *Vet Microbiol.* 2010;145:286-91.
34. Fux CA, Shirliff M, Stoodley P, Costerton JW. Can laboratory reference strains mirror “real world” pathogenesis? *Trends Microbiol.* 2005;13:58-63.
35. Vannucci FA, Beckler D, Pusterla N, Mapes SM, Gebhart CJ. Attenuation of virulence of *Lawsonia intracellularis* after in vitro passages and its effects on the experimental reproduction of porcine proliferative enteropathy. *Vet Microbiol.* 2012;162:265-9.
36. Vannucci FA, Foster DN, Gebhart CJ. Comparative transcriptional analysis of homologous pathogenic and non-pathogenic *Lawsonia intracellularis* isolates in infected porcine cells. *PloS One.* 2012;7:e46708.

Recebido em: 04/02/13

Aceito em: 04/03/13