

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**ESCOLA DE VETERINARIA**  
**Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

**Mirtha Elizabet Suarez Duarte**

***Lawsonia intracellularis*: Tráfego intracelular precoce e fatores de virulência.**

**Belo Horizonte**

**2023**

**Mirtha Elizabet Suarez Duarte**

***Lawsonia intracellularis*: Tráfego intracelular precoce e fatores de virulência.**

**Versão final**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal da Escola de Veterinária da  
Universidade Federal de Minas Gerais como requisito  
parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciência  
Animal.**

**Área de concentração:** Patologia Animal

**Orientador:** Prof. Roberto Mauricio Carvalho Guedes.

**Coorientadores:** Prof. Renato de Lima Santos

Profa. Talita Pilar Resende

**Belo Horizonte, 2023**

D812l Duarte, Mirtha Elizabet Suarez ,1989-  
*Lawsonia intracellularis*: Tráfego intracelular precoce e fatores de virulência /Mirtha Elizabet Suarez Duarte. – 2023.  
83f.

Orientador: Roberto Mauricio Carvalho Guedes  
Coorientadores: Renato de Lima Santos  
Talita Pilar Resende

Tese (Doutorado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora.  
Inclui Bibliografia.

1. Intestinos - Infecções - Teses - 2. Diarreia em animais – Teses -  
3. Patologia Veterinária - Teses - I. Guedes, Roberto Mauricio Carvalho -  
II. Santos, Renato de Lima – III. Resende, Talita Pilar - IV.Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária -V. Título.

CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569  
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

MIRTHA ELIZABET SUAREZ DUARTE

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Patologia Animal.

Aprovado(a) em 17 de março de 2023, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Roberto Mauricio Carvalho Guedes - Orientador(a)

Dr.(a). Fabio Augusto Vannucci

Dr.(a). Carlos Eduardo Real Pereira

Dr.(a). Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes

Dr.(a). Andrey Pereira Lage



Documento assinado eletronicamente por **Roberto Mauricio Carvalho Guedes, Professor do Magistério Superior**, em 18/03/2023, às 16:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Eduardo Real Pereira, Usuário Externo**, em 20/03/2023, às 09:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabio Augusto Vannucci, Usuário Externo**, em 20/03/2023, às 13:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andrey Pereira Lage, Membro de comissão**, em 20/03/2023, às 13:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes, Professora do Magistério Superior**, em 24/03/2023, às 12:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2152373** e o código CRC **40E898C1**.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela minha vida, por tantas bênçãos recebidas e oportunidade de aprendizado.

Sou imensamente grata a meus pais, Sindulfo e Liduvina por apoiarem a minha escolha, pela paciência, carinho e palavras de incentivo. Agradeço a meus irmãos Liz, Sindulfo, Hamilton e Dariel que entenderam a distância, os momentos de ausência e que deram suporte para passar por essa etapa. Sem eles nada seria possível.

A Henry pelo apoio incondicional e ter aceitado empreender essa longa caminhada juntos. Meu pilar e lugar de descanso quando tudo parecia não funcionar, um longo abraço muitas vezes foram a melhor medicina para seguir em frente, sem esse apoio nada seria possível.

Agradeço aos familiares que sempre torceram por mim nesta difícil jornada e por entenderem minha ausência em diversos momentos com a família.

Agradeço ao meu orientador Prof. Roberto Guedes. Profissional excepcional, e ser humano exemplar, agradeço a Deus por ter colocado o Senhor como meu orientador, com certeza não teria nem iniciando um doutorado se não fosse por ele. Agradeço por todas as oportunidades que me foram dadas, obrigada pelos ensinamentos, por ter facilitado todo para o desenvolvimento de cada projeto iniciado e pela paciência infinita para meu melhor aprendizado.

Um agradecimento especial aos Professores Renato de Lima Santos, Talita Resende, Carlos Eduardo Pereira e Professora Roselene Ecco, por todo suporte e ajuda para o desenvolvimento do projeto, sem essa ajuda nada seria possível.

Agradeço imensamente aos colegas Guedes et al., Amanda, Ricardo, Paula, Carolina, Matheus, e Gustavo, pelos ensinamentos e trabalho em equipe, companhia, momentos de diversão e de consolo. Obrigada por toda a ajuda, sem todos vocês nada disso seria possível. E obrigada a todas essas pessoas que passaram nestes 4 anos de doutorado que de alguma forma fizeram o processo mais leve, Thaynara, Ayisa, Daniel, Marcelo, Sóstenes, Mayra, Dayse, Monique, Clarissa, Camila, Lari, Daniele, Lorena e muitas outras pessoas que de alguma forma ou outra estiveram ali quando foi preciso.

Aos colegas da Patologia Veterinária pelos cafezinhos, conversas, risadas e choros. Aos professores da Patologia, pelo conhecimento compartilhado.

Agradeço a minha querida Facultad de Ciências Veterinárias da Universidad Nacional de Asunción, por todo suporte e confiança, aos meus colegas de Departamento de Ciências Patológicas, Dra. Leila, Dra. Ali, Dr. Alvaro, Dra. Paola, Emi, Ana, e em especial ao Prof. Andrés Avalos, pelo apoio incondicional, para meu crescimento profissional.

À UFMG e à Escola de Veterinária que se tornaram minha segunda casa nestes anos. Ao suporte da Fapemig, Capes, Cnpq e colegiado de pós-graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da UFMG.

## RESUMO

A doença entérica suína conhecida como enteropatia proliferativa é causada pela *Lawsonia intracellularis*, uma bactéria intracelular obrigatória. É caracterizada pelo espessamento da mucosa intestinal devido à hiperplasia de células intestinais epiteliais, já foi relatada em várias espécies animais, porém, dentre as espécies domésticas, suínos e equinos são as mais severamente afetadas. Os eventos iniciais relacionados a interação entre patógeno e hospedeiro ainda não são completamente compreendidos durante a infecção por *L. intracellularis*, principalmente o mecanismo de interação com a célula hospedeira e o tráfego intracelular. Nesta tese, foi desenvolvido inicialmente um novo método de quantificação de *L. intracellularis*, através da utilização da espectrometria por densidade óptica. Além disso, foi realizado um estudo de busca de genes ortólogos entre bactérias enteropatogênicas e *L. intracellularis*, sendo observada a ortologia de genes de invasão e sobrevivência por evasão de sistema de digestão lisossomal destas bactérias. Foi ainda realizada uma avaliação aprofundada do tráfego intracelular de *L. intracellularis* em células epiteliais intestinais imortalizadas (IEC-18) e em macrófagos de origem primária de suínos, verificando co-localização de marcadores de endossomos precoces e tardios com *L. intracellularis*. Assim, foi demonstrado o recrutamento da Rab 5, Rab 7 e Catepsina D no processo de endocitose de *L. intracellularis* em células epiteliais intestinais (IEC-18) de ratos e em macrófagos (suínos). Os resultados obtidos neste experimento fornecem novos dados que contribuem para um melhor entendimento do tráfego e interação entre a *L. intracellularis* e a célula hospedeira.

**Palavras-chave:** *enteropatia proliferativa, patogênese, ortólogos, GTPases, endocitose*

## ABSTRACT

A common enteric disease known as proliferative enteropathy is caused by *Lawsonia intracellularis*, an obligatory intracellular bacterium. The characteristic thickening of the intestinal mucosa due to hyperplasia of intestinal epithelial cells has been reported in several animal species, however, among the most severely affected domestic species, pigs, and horses. The initial events related to the interaction between pathogen and host are not fully understood during infection by *L. intracellularis*, mainly the mechanism of interaction with the host cell and intracellular traffic. In this case, a new method of quantification of *L. intracellularis* was initially developed using optical density spectrometry. Furthermore, a study was carried out to search for orthologous genes between enteropathogenic bacteria and *L. intracellularis*, and the orthology of invasion and survival genes was observed due to the evasion of the lysosomal digestion system of these bacteria. An in-depth evaluation of the intracellular trafficking of *L. intracellularis* in immortalized intestinal epithelial cells (IEC-18) and in macrophages of primary pig origin has also been carried out, verifying co-localization of markers of early and late endosomes with *L. intracellularis*. Thus, the recruitment of Rab 5, Rab 7 and Cathepsin D was demonstrated in the endocytosis process of *L. intracellularis* in intestinal epithelial cells (IEC-18) in rats and in macrophages (swine). The results obtained in this experiment provide new data that contribute to a better understanding of the traffic and interaction between *L. intracellularis* and the host cell.

**Keywords:** proliferative enteropathy, pathogenesis, orthologs, GTPases, endocytosis

## **Lista de Figuras.**

Figura 1.	Localização de proteínas Rab nas células	21
Figura 1.1	Amostras e equipamentos básicos utilizados para realização dos testes	32
Figura 2.1.	Mapa de calor (heatmap) com porcentagem de similaridade entre os genomas anotados	44
Figura 2.2.	Porcentagem de genes ortólogos de invasão a <i>L. intracellularis</i>	47
Figura 2.3.	Porcentagem de genes ortólogos de sobrevivência a <i>L. intracellularis</i>	49
Figura 3.1.	Microscopia confocal de células IEC-18 infectadas com <i>L. intracellularis</i> . Tempo 45 min. Rab5	64
Figura 3.2.	Microscopia confocal de células IEC-18 infectadas com <i>L. intracellularis</i> . Tempo 60 min. Rab5	65
Figura 3.3.	Microscopia confocal de células IEC-18 infectadas com <i>L. intracellularis</i> . Tempo 75 min. Rab5	66
Figura 3.4	Marcação de fluorescência Rab 5 nos três tempos	66
Figura 3.5	Microscopia confocal de células IEC-18 infectadas com <i>L. intracellularis</i> . Tempo 45 min. Rab7	67
Figura 3.6	Microscopia confocal de células IEC-18 infectadas com <i>L. intracellularis</i> . Tempo 60min. Rab 7	68
Figura 3.7	Microscopia confocal de células IEC-18 infectadas com <i>L. intracellularis</i> . Tempo 75 min. Rab 7	69
Figura 3.8	Marcação de fluorescência Rab 7 nos três tempos	69
Figura 3.9	Microscopia confocal de células IEC-18 infectadas com <i>L. intracellularis</i> . Tempo 45 min. Catepsina D	70
Figura 3.10	Microscopia confocal de células IEC-18 infectadas com <i>L. intracellularis</i> . Tempo 60min. Catepsina D	71
Figura 3.11	Microscopia confocal de células IEC-18 infectadas com <i>L. intracellularis</i> . Tempo 75 min. Catepsina D	72
Figura 3.12	Microscopia confocal de células IEC-18 infectadas com <i>L. intracellularis</i> . Tempo 75 min. Catepsina D com projeção em 3 D	72
Figura 3.13	Marcação de fluorescência Catepsina D nos três tempos	73
Figura 3.14	Microscopia confocal de macrófagos suínos infectados com <i>L. intracellularis</i> . Tempo 75 min. Rab 5	73
Figura 3.15	Microscopia confocal de macrófagos suínos infectados com <i>L. intracellularis</i> . Tempo 75 min. Rab 7	74
Figura 3.16	Microscopia confocal de macrófagos suínos infectados com <i>L. intracellularis</i> . Tempo 75 min. Catepsina D	74
Figura 3.17	Células IEC-18 infetadas com <i>L. intracellularis</i> demonstradas por TEM	75
Figura 3.18	Macrófagos suínos infetados com <i>L. intracellularis</i> demonstradas por TEM	77



## **Lista de Tabelas**

Tabela 1.	Proteínas Rab em vias endocíticas, transcíticas e exocíticas	22
Tabela 1.1	Resultado de Correlação entre estudo de Espectrofotometria e RT-qPCR. Teste 1	33
Tabela 1.2	Resultado de Correlação entre estudo de Espectrofotometria e RT-qPCR. Teste 2	34
Tabela 1.3	Resultado de correlação entre espectrofotometria e RT-qPCR, de acordo com os parâmetros avaliados de comprimento de onda e recipiente.	34
Tabela 1.4	Resultado de transformação de densidade óptica (DO) para quantidade de <i>L. intracellularis</i> por ml. do Teste 1	35
Tabela 1.5	Resultado de transformação de densidade óptica (DO) para quantidade de <i>L. intracellularis</i> por ml. do Teste 2.	35
Tabela 1.6	Transformação dos resultados de densidade óptica OD da espectrofotometria para determinar a quantidade de <i>L. intracellularis</i> por ml 1.	35
Tabela 1.7	Transformação dos resultados de densidade óptica OD da espectrofotometria para determinar a quantidade de <i>L. intracellularis</i> por ml 2.	36
Tabela 2.1.	Bactérias e respectivos genes ortólogos encontrados na análise de ocorrência de genes ortólogos de invasão da <i>L. intracellularis</i> .	46
Tabela 2.2.	Bactérias e respectivos genes ortólogos encontrados na análise de ocorrência de genes ortólogos de sobrevivência intracelular da <i>L. intracellularis</i> .	48
Tabela 2.3.	Comparação de genes ortólogos de invasão a genes expressos em cepas de <i>L. intracellularis</i> patogênica e atenuada	50
Tabela 2.4.	Comparação de genes ortólogos de sobrevivência intracelular a genes expressos em cepas de <i>L. intracellularis</i> patogênica e atenuada	50
Tabela 3.1.	Marcadores utilizados para análise do tráfego intracelular de <i>L. intracellularis</i> em macrófagos suínos e células IEC-18.	63

## **Lista de tabelas suplementares**

Tabela Suplementar 1	Comparação de genomas de <i>L. intracellularis</i> no GenBank.	1
Tabela Suplementar 2.1	Seleção de genes para comparação de ortologia de Invasão	1
Tabela Suplementar 2.2	Seleção de genes para comparação de ortologia sobrevivência	3
Tabela Suplementar 2.3	Genes ortólogos de invasão e suas funções	5
Tabela Suplementar 2.4	Genes ortólogos de sobrevivência e suas funções.	7

## **Lista de Abreviaturas**

BCV: Vacúolo contendo *Brucella*

C.C: Cultura celular

C.t: Número de ciclo

DO: Densidade Óptica

EP: Enteropatia Proliferativa

IEC-18: Células epiteliais intestinais de rato

IPMC: Imunoperoxidase em monocamadas de células

LVC: Vacúolo contendo *Listeria*

MIC: Concentração inibitória mínima

PCR: Reação em cadeia da polimerase

RT-qPCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real

SVC: Vacúolo contendo *Salmonella*

TEM: Microscopia Eletrônica de transmissão

## Sumário

Introdução.....	12
Hipótese .....	13
Objetivos .....	13
Revisão Bibliográfica.....	14
<i>Lawsonia intracellularis</i> .....	14
Patogenese.....	15
Apresentação patológica.....	17
Diagnostico.....	18
Tratamento e controle.....	19
Tráfego intracelular .....	20
Mecanismos de endocitose.....	20
Manipulação das vias por patógenos bacterianos intracellularis.....	22
Referencias.....	23
<b>Capítulo 1 - Novo método de quantificação de <i>Lawsonia intracelullaris</i> através da densidade óptica por espectrofotometria .....</b>	<b>28</b>
Resumo.....	28
Introdução.....	29
Material e métodos .....	30
Resultados.....	33
Discussão.....	36
Referências.....	37
<b>Capítulo 2 - Avaliação <i>in-silico</i> de genes ortólogos da <i>Lawsonia intracellularis</i> presentes em outros enteropatogenos.....</b>	<b>40</b>
Resumo.....	40
Introdução.....	41
Material e métodos.....	43
Resultados.....	44
Discussão.....	51
Referências .....	55
<b>Capítulo 3 - <i>Lawsonia intracellularis</i> recruta endossomos iniciais e tardios no processo de tráfego intracelular - .....</b>	<b>59</b>
Resumo.....	59
Introdução.....	60
Material e métodos.....	61
Resultados.....	63
Discussão.....	76
Referências .....	80
Conclusões finais.....	83

## INTRODUÇÃO

A enteropatia proliferativa (EP), causada por *Lawsonia intracellularis*, é uma doença entérica que afeta diversas espécies de animais domésticos e silvestres. Dentre as espécies domésticas, suínos e equinos são as mais severamente afetadas. Em rebanhos suínos, a infecção por *L. intracellularis* pode resultar em diarreia aguda sanguinolenta, em diarreia crônica, ou mesmo não levar ao aparecimento de sinais clínicos (forma subclínica). Em todas essas formas, a EP resulta em comprometimento do ganho de peso e a aumento de custos com prevenção, controle e tratamento da doença.

Estima-se que a prevalência de EP nos rebanhos suínos dos EUA seja de 75% (MARSTELLER et al., 2003), enquanto que em algumas províncias do Canadá, a prevalência de rebanhos positivos pode ser de até 100% (PARADIS et al., 2007). A prevalência de EP em países europeus e asiáticos é variável, mas a circulação de *L. intracellularis* tem sido reportada constantemente (BRANDT et al., 2010; JENSEN, et al., 2017; NISHIKAWA et al., 2018; WU et al., 2014; YEH; GA, 2018). No Brasil, a circulação de *L. intracellularis* em rebanhos suínos foi confirmada na regiões sudeste, sul e centro-oeste (ALBERTON et al., 2011; MORENO et al., 2002; RESENDE et al., 2015)

Em rebanhos equinos destinados a reprodução, a EP afeta principalmente os potros desmamados, resultando em diarreia profusa com intensa perda proteica, levando frequentemente a morte do animal, se o diagnóstico e o tratamento não forem realizados de maneira rápida e eficiente. Apesar de não haver estudos abrangentes em relação a prevalência de EP em criatórios equinos, a EP tem sido reportada em diversos países como Estados Unidos, Japão, Alemanha (BREUER et al., 2011; NIWA et al., 2022; PUSTERLA e GEBHART, 2013) inclusive no Brasil (GABARDO et al., 2015; GUIMARÃES-LADEIRA et al., 2009).

Estudos recentes não demonstraram alterações no perfil de susceptibilidade de *L. intracellularis* aos antimicrobianos comuns na prática da suinocultura (WATTANAPHANSACK et al., 2019) e nos tratamentos clínicos de equinos (PEREIRA et al., 2019). A atual preocupação em relação ao aumento de resistência bacteriana a antimicrobianos e sua correlação às práticas de manejo na agropecuária têm estimulado a identificação, desenvolvimento e aplicação de alternativas para controle de doenças infecciosas (LLOYD; PAGE, 2018).

A pesquisa e desenvolvimento de “pequenas moléculas” (*small molecules*, em inglês), por exemplo, tem se destacado como uma das estratégias para prevenção e tratamento de infecções bacterianas entéricas causadas por *Escherichia coli* (KATHAYAT et al., 2018), *Salmonella spp* e *Campylobacter spp* (JOHNSON e ABRAMOVITCH, 2017). Essas pequenas moléculas são utilizadas para bloquear um ponto estratégico do mecanismo de infecção do agente, sem que haja comprometimento de processos fisiológicos ou de resposta imune do hospedeiro (JOHNSON e ABRAMOVITCH, 2017). Contudo, para o sucesso na identificação e desenvolvimento dessas moléculas, é imprescindível o conhecimento da patogênese do agente infeccioso em questão.

Os eventos iniciais relacionados à interação patógeno-hospedeiro ainda não são completamente compreendidos durante a infecção por *L. intracellularis*. Experimentos *in vitro* demonstraram que a internalização de *L. intracellularis* pode utilizar do maquinário endocítico mediado por clatrina da célula eucariota, mas se torna mais eficaz quando a bactéria está metabolicamente ativa (MCORIST et al., 1995; PEREIRA et al., 2023).

Além disso, foi comprovado recentemente que *L. intracellularis* não somente sobrevive no citoplasma de macrófagos suínos, mas também se propaga nesta célula. (PEREIRA et al., 2020). Esses achados corroboram a hipótese de que *L. intracellularis* possua mecanismos para evadir aparatos de defesa inata do hospedeiro, ficando livre no citoplasma de macrófagos.

Baseado em pesquisas realizadas com *L. intracellularis* na fase inicial da caracterização da bactéria e da EP (JOHNSON e JACOBY, 1977; LAWSON et al., 1995; McORIST et al., 1995) e em recentes estudo (PEREIRA et al., 2020), parece que essa bactéria segue a via extrafagossomal, assim como acontece com *Listeria monocytogenes* e *Shigella* spp., para evadir a resposta do hospedeiro. Contudo, cada patógeno apresenta seu próprio mecanismo de interação com a célula hospedeira e são essas particularidades que proporcionam a base para o entendimento de sua patogênese. Consequentemente, é essencial a obtenção de informações para identificação de estratégias de controle da infecção.

Assim, propõe-se uma investigação aprofundada do tráfego intracelular de *L. intracellularis* em células epiteliais intestinais e em macrófagos suínos, verificando sua colocalização utilizando marcadores de endossomos precoces e tardios, de modo a esclarecer em que momento do tráfego intracelular *L. intracellularis* consegue evadir as reações da célula hospedeira e se propagar livremente em seu citoplasma. Em longo prazo, o esclarecimento desse mecanismo ampliará as possibilidades para desenvolvimento de intervenções profiláticas e terapêuticas na infecção por *L. intracellularis* em suínos, equinos e outras espécies de interesse.

## **HIPÓTESE**

A *L. intracellularis* evita o contato direto com os mecanismos de defesa do hospedeiro, como estratégia para acelerar a internalização e permitir a multiplicação no interior de células epiteliais intestinais e macrófagos.

## **OBJETIVOS**

### ***Objetivo geral:***

Estudar o tráfego intracelular de *L. intracellularis* em células intestinais epiteliais e em macrófagos suínos derivados de sangue periférico *in vitro*, utilizando técnicas de marcação fluorescente e microscopia confocal para colocalização de *L. intracellularis* e marcadores de tráfego intracelular.

### ***Objetivos específicos:***

- Desenvolver um método de quantificação bacteriana rápida para estimar a concentração de bactérias para a realização de estudos *in vitro* com maior acurácia e precisão;
- Pesquisar genes de *L. intracellularis* ortólogos à genes associados a invasão e sobrevivência por escape ou evasão de sistema de digestão lisossomal em diferentes enteropatógenos;

- Determinar a colocalização de *L. intracellularis* com marcadores de endossomos precoces Rab5;
- Determinar se há envolvimento de endossomos tardios no tráfego intracelular de *L. intracellularis* pela colocalização da bactéria com Rab7;
- Avaliar se há acidificação de vacúolos contendo *L. intracellularis* pela colocalização de marcadores de endossomos tardios com catepsina D.

## REVISÃO DE LITERATURA

### *Lawsonia intracellularis*

*Lawsonia intracellularis* é o agente etiológico da enteropatia proliferativa (EP), uma doença diarreica caracterizada pelo espessamento da mucosa intestinal em consequência da hiperplasia de células epiteliais intestinais acometendo diversas espécies animais, principalmente suínos e equinos (McORIST et al., 1995). O primeiro relato de EP mostra a presença de bactérias intracelulares em associação com a proliferação das células de revestimento das criptas intestinais (ROWLAND e LAWSON, 1973), onde diferentes designações foram atribuídas ao organismo ao longo do tempo como *Campylobacter like-organism*, *Ileal symbiont intracellularis* e *Ileobacter intracellularis* (MCORIST et al., 1995a).

O isolamento de *L. intracellularis* foi bem-sucedido em 1993 (LAWSON et al., 1993b). Para o cultivo *in vitro* de *L. intracellularis* são necessários monocamada de células permissivas à infecção, como por exemplo células epiteliais intestinais de rato (IEC-15) (epitélio intestinal de rato), McCoy (fibroblastos de camundongo), IPEC-J2 (célula de jejuno suíno), INT-407 (intestino fetal humano), CRL 1677 (adenocarcinoma colônico de rato), e Caco-2 (adenocarcinoma colón-retal humano) (GUEDES e GEBHART, 2003; LAWSON et al., 1993; RESENDE et al., 2019), em atmosfera microaerofílica com 82,2% de nitrogênio, 8,8% de dióxido de carbono e 8% de oxigênio, a 37 °C, que se assemelham as condições do ambiente intestinal (LAWSON et al., 1993).

Para criar este ambiente favorável foi elaborado um método alternativo para o cultivo de *L. intracellularis*, onde uma mistura de gás contendo hidrogênio, dióxido de carbono e nitrogênio era colocada em sacos plásticos utilizados para armazenamento de roupas a vácuo (*bags*) (VANNUCCI et al., 2011). A flexibilidade deste método permitiu o cultivo da bactéria sem a necessidade de jarras de anaerobiose ou estufas tri-gás (VANNUCCI et al., 2011).

*L. intracellularis* é uma bactéria gram-negativa, que apresenta forma curva ou sigmoide, com um comprimento de 1,25 a 1,75 µm e 0,25 a 0,43 µm de largura, parede celular com envelope trilaminar externo, flagelo único e móvel (LAWSON e GEBHART, 2000). Em seu genoma estão presentes sequências múltiplas de VNTR (*variable number of tandem repeats*), importantes na identificação de diferentes cepas da bactéria isoladas a partir de amostras de campo (KELLEY e GEBHART, 2010). O genoma circular de *L. intracellularis* tem 1.719.014 pares de bases (pb), constituído por um cromossoma (1.457.619 pb) e três plasmídeos (plasmídeo A: 27.048 pb, plasmídeo B: 39.794 pb e plasmídeo C: 194.553 pb) (VANNUCCI et al., 2012).

Existem somente cerca de 30 isolados de *L. intracellularis*, obtidos por pesquisadores localizados em apenas cerca de cinco laboratórios em todo o mundo, sendo um laboratório localizados nos EUA, na Universidade de Minnesota; (RESENDE et al.,

2019), um laboratório no Brasil, na Universidade Federal de Minas Gerais, um laboratório na Tailândia na Universidade Chulalongkorn, um na Escócia, na Universidade de Edinburgo e um na Austrália, no Elizabeth Macarthur Agricultural Institute. Mais recentemente um grupo de pesquisa chinês publicou um relato de isolamento de *L. intracellularis* a partir de amostras de uma marrã com a forma aguda da EP (XIAO et al., 2022). Contudo, ainda não há relato de reprodução experimental da doença em suínos utilizando o isolado obtido, tampouco foi disponibilizado seu genoma em plataformas de acesso público.

Um estudo comparativo entre isolados dos Estados Unidos da América e isolados europeus demonstrou que *L. intracellularis* exibe comportamento e requerimentos de crescimento fastidiosos similares (KNITTEL et al., 1996), assim como, a níveis genéticos aparentemente não há diferenças relevantes entre esses isolados (BENGTSSON et al., 2020).

No Brasil foi possível o isolamento e propagação *in vitro* de duas cepas. A primeira cepa brasileira de *L. intracellularis* foi caracterizada como PHE-UFMG/BR2011 (SAES, J, 2012), atualmente nominada BRPHE01\_E5. A cepa BRPHE01\_E5 foi obtida de um suíno com sinais clínicos de EP aguda de uma granja comercial da região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, em 2011. A segunda cepa, BRPHE02\_E8, foi obtida a partir de um suíno, também com sinais clínicos de enteropatia proliferativa aguda, de um rebanho localizado no estado de São Paulo, Brasil, em 2011 (PEREIRA et al., 2017). Essas cepas foram incluídas num estudo abrangente sobre concentração inibitória mínima de antimicrobianos, publicado em 2019 (WHATAPHANASAK et al., 2019).

### Patogênese

A ingestão de matéria fecal contaminada é um dos mecanismos mais importantes na transmissão de *L. intracellularis* (GUEDES e GEBHART, 2003a). Esta bactéria apresenta tropismo pelas células epiteliais intestinais e a consequência patológica principal da infecção é a hiperplasia das células epiteliais infectadas (LAWSON e GEBHART, 2000).

Após a infecção intestinal por inoculação experimental, as bactérias intracelulares podem ser detetadas nas células intestinais epiteliais e fezes por uma a três semanas, com um pico de infecção e de lesões três semanas após o desafio. A lesão proliferativa e a excreção fecal da bactéria persistem por aproximadamente quatro semanas, mas em alguns suínos, a excreção pode persistir por 10 semanas (GUEDES e GEBHART, 2003).

Há pouca evidência de disseminação de *L. intracellularis* além do epitélio intestinal, ou a presença de uma resposta inflamatória significativa no intestino (LAWSON e GEBHART, 2000), diferente do que se é observado para outros agentes enteroinvasivos como a *Salmonella* sp, *Shigella*, e *Listeria monocytogenes*. Os determinantes bacterianos específicos que conferem patogenicidade e causam esses efeitos patológicos distintos ainda são pouco conhecidos, mas a adesão e a entrada bacteriana ocorrem através da superfície apical de células epiteliais imaturas, em um processo que parece exigir uma interação específica ligante-receptor bacteriano (McORIST et al., 1997; PEREIRA et al., 2023).

Sabe-se que a *L. intracellularis* já está presente em enterócitos maduros no ápice de vilosidades 12 horas após inoculação oral em suínos. Foi observado também que a

bactéria infecta inicialmente uma variedade de tipos de células nas criptas e vilosidades, porém, parece haver uma preferência pelas células da junção cripta-vilosidade (BOUTRUP et al., 2010).

Além disso, os mecanismos de internalização celular de *L. intracellularis* parecem requerer uma interação hospedeiro-bactéria específica, uma vez que o processo de invasão não depende da viabilidade da bactéria. Aparentemente, ocorre um processo endocítico envolvendo a polimerização da actina da célula hospedeira (LAWSON et al., 1995), com envolvimento de clatrina (PEREIRA et al., 2023). Contudo, fatores de virulência associados à adesão e entrada da *L. intracellularis* nas células epiteliais intestinais ainda precisam ser bem caracterizados. Foi observada a internalização de *L. intracellularis* inativada com formalina, com redução da invasão bacteriana após bloqueio do rearranjo do citoesqueleto usando citocalasina D (inibidor da polimerização da actina) *in vitro* (LAWSON et al., 1995).

Contudo, esse estudo também descreveu que independente do tratamento com citocalasina D (inibidor da polimerização da actina) são observadas bactérias intracelulares em células tratadas com sugerindo que outros mecanismos estão envolvidos no processo de internalização da bactéria (LAWSON et al., 1993).

Entre os mecanismos utilizados por *L. intracellularis* para a internalização, é mencionado o maquinário endocítico da célula eucariota mediado por clatrina, porém foi observado que a internalização se torna mais eficaz quando a bactéria está metabolicamente ativa (PEREIRA et al., 2023).

A análise da sequência do genoma da cepa PHE/MN1-00 de *L. intracellularis*, isolada de suíno com a forma hemorrágica na University of Minnesota em 2000, revelou a presença de um sistema de secreção tipo 3 (T3SS) (ALBERDI et al., 2009). O T3SS parece ser conservado entre os isolados de *L. intracellularis* e, potencialmente, contribui para a patogenicidade durante a invasão celular, independentemente da atividade da célula hospedeira (ALBERDI et al., 2009). Estudos sugerem que *L. intracellularis* pode ser capaz de influenciar a regulação da expressão de MUC2 (gene marcador de mucina) para que atravesse a barreira do muco e invada a camada mucosa, potencialmente favorecendo a adesão e invasão bacteriana (BENGTSSON et al., 2015)

Outras proteínas potencialmente envolvidas na patogênese da *L. intracellularis* têm sido caracterizadas nos últimos anos. As proteínas autotransportadoras são amplamente presentes entre as bactérias gram-negativas, sendo que várias dessas proteínas têm sido associadas a funções relacionadas à virulência (WELLS et al., 2007). Uma proteína de 72 kDa, identificada como uma proteína A autotransportadora (LatA) foi identificada por análise de espectrometria de massa de proteínas de *L. intracellularis* (WATSON et al., 2011).

Essa proteína é fortemente reconhecida por soros de suínos naturalmente infectados e pode estar associada à patogênese da bactéria. Outro antígeno envolvido na ligação e invasão celular expresso por *L. intracellularis* durante a infecção *in vitro* e *in vivo*, denominado de antígeno de superfície A (LsaA), é expresso em cultura de células e em tecido ileal infectado e foi identificado usando primers degenerados (McCLUSKEY et al., 2002).

Por último, em um estudo empregando ferramentas de bioinformática e ensaios moleculares baseados em proteínas *in vivo* e *in vitro*, foram avaliadas as características antigênicas da proteína LI0004, que foi definida como *L. intracellularis* hemolysin A



(LhlyA). Essa proteína foi considerada antigênica por ser fortemente reconhecida pelos soros coletados de camundongos infectados experimentalmente por *L. intracellularis*. Esses dados sugerem que a proteína LhlyA é um antígeno altamente imunorreativo de *L. intracellularis* (KIM et al., 2017).

Uma vez dentro da célula, *L. intracellularis* escapa do compartimento vacuolar para o citoplasma, onde se multiplica e se espalha de célula para célula após a divisão celular (LAWSON e GEBHART, 2000). Contudo, os mecanismos usados por *L. intracellularis* para entrar na célula, escapar do vacúolo, multiplicar-se intracitoplasmicamente, assim como sair da célula e modular a função da célula hospedeira não são conhecidos. Sabe-se que organismos de *L. intracellularis* entram nas células epiteliais individualmente em aproximadamente três horas após a inoculação, formando vacúolos ligados à membrana celular (MCORIST et al., 1995), que posteriormente, são associados a proteína Rab5, nos chamados endossomos precoces (PEREIRA, 2018).

Estes endossomos são desmontados por mecanismos ainda desconhecidos, liberando organismos de *L. intracellularis* no citoplasma de células epiteliais (MCORIST et al., 1995a). Em estudo *in vitro*, foi observado que as bactérias dentro dos vacúolos estão claramente separadas da membrana circundante por uma área eletro-luminosa e, neste momento, uma ruptura da matriz citoplasmática adjacente aos vacúolos vazios é evidente (McORIST et al., 1995).

A quebra do vacúolo ocorre logo após a entrada bacteriana e, após este evento, a maioria das bactérias se localiza no citoplasma. Assim, após o escape vacuolar, a relação observada na cultura de células é muito semelhante à observada na infecção animal (McORIST et al., 1995).

Tipicamente, *L. intracellularis* se localiza no citoplasma apical dos enterócitos, com alguma associação às mitocôndrias, mas sem relação com nenhuma outra estrutura celular, embora a matriz celular citoplasmática seja geralmente adjacente à membrana externa bacteriana (McORIST et al., 1995).

Estudos relatam atividade citolítica de *L. intracellularis* em células infectadas (HANNIGAN, 1997) assim como há a expressão de uma hemolisina que pode favorecer a adesão e invasão celular, tendo sido descrita tanto *in vitro* como *in vivo* (McCLUSKEY et al., 2002). Um estudo sugere que a proteína LhlyA é um antígeno altamente imunorreativo de *L. intracellularis* e pode potencialmente ser usado para desenvolver estratégias de proteção eficazes contra EP (KIM et al., 2017).

### **Apresentação patológica**

O início dos sinais clínicos da EP é observado mais comumente em suínos pós-desmame, entre oito e 20 semanas de idade, sendo diarreia e diminuição do ganho de peso os sinais clínicos mais característicos. A diarreia ocorre quando existem lesões intestinais significativas, podendo apresentar-se clinicamente de formas, aguda e crônica. A forma aguda causa diarreia hemorrágica e/ou morte súbita em suínos de terminação e em leitoas de reprodução. A forma crônica causa principalmente diminuição do ganho de peso diário e diarreia pastosa em animais em crescimento (McORIST et al., 1996).

As lesões macroscópicas da EP são comumente encontradas no íleo, embora, com menor frequência, é possível serem observada no ceco, colón, reto, duodeno e jejuno (GUEDES et al., 2017). Na forma aguda, as lesões são caracterizadas por edema e hiperemia do mesentério e espessamento da parede intestinal. A mucosa apresenta-se com pregas evidentes e conteúdo hemorrágico pode ser observado no lúmen intestinal (GUEDES e GEBHART, 2003a).

A apresentação crônica é caracterizada pelo aspecto cerebroide na serosa intestinal, além de edema de mesentério, espessamento da mucosa e presença de membrana necrótica aderida à mucosa. A diarreia observada em animais de recria e terminação, pela sua baixa especificidade, necessita da coleta de amostras para exames complementares para determinação da etiologia (McORIST et al., 1996).

Durante o pico da infecção, quando os animais desenvolvem as lesões mais graves, há níveis elevados de vários transcritos de genes envolvidos em proliferação celular e inflamação, incluindo metaloproteinase-7 (MMP7), transglutaminase-2 (TGM2) e oncostatina M (OSM) (LEITE et al., 2019). Contudo, infiltração de células inflamatórias no sítio de infecção não é normalmente verificada como acontece em lesões intestinais causada por *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium ou por *Brachyspira hyodysenteriae* (DRUMO et al., 2016; HONTECILLAS et al., 2005).

A diarreia malabsortiva parece ser o principal processo envolvido na fisiopatologia da diarreia causada por *L. intracellularis*. Em reprodução experimental em hamsters foi demonstrada uma redução significativa da absorção intestinal de glicose e eletrólitos (VANNUCCI et al., 2010). Resultados recentes demonstram que a digestibilidade é reduzida durante a infecção por *L. intracellularis* em suínos. Essa baixa digestibilidade pode estar relacionada à abolição da capacidade digestiva do tecido lesionado, já que foi demonstrado que células epiteliais intestinais infectadas com *L. intracellularis* carecem de sacarase-isomaltase, uma enzima de membrana da borda dos enterócitos, responsável pela absorção de alguns sacarídeos (HELM et al., 2021).

### **Diagnóstico**

Os métodos de diagnóstico tradicionais para a EP baseiam-se nos exames realizados *ante mortem* ou *post-mortem*. Os exames em animais vivos podem ser realizados pela sorologia ou por reação em cadeia da polimerase (PCR). Os testes sorológicos são a imunoperoxidase em monocamadas de células (IPMC) (GUEDES et al., 2002; LAWSON; GEBHART, 2000), imunofluorescência indireta de anticorpos (IFA), e teste de ELISA (ELISA kit -BioScreen Ileitis Antibody ELISA, Synbiotics Corporation, Lyon, France). Todas estas técnicas, além de detectar a presença de anticorpos específicos anti-*L. intracellularis*, podem ser utilizadas na construção do soroperfil do rebanho. Com este soroperfil, é possível estimar o momento em que ocorre a infecção, considerando que, em geral, a seroconversão ocorre duas semanas a quatro semanas após a infecção (GUEDES e GEBHART, 2003a; RESENDE et al., 2015; STEGE et al., 2004). Essas informações são importantes para a determinação de protocolos vacinais ou protocolos medicamentosos.

A PCR é amplamente utilizada para diagnóstico da EP. O ensaio de PCR atualmente mais utilizado na rotina diagnóstica, por ser de menor custo, é a PCR convencional. Porém, também podem ser realizados testes de PCR em tempo real, que, apesar de seu relativo alto custo, apresentam sensibilidade satisfatória, alta precisão e acurácia diagnóstica, além de também fornecer resultados quantitativos (RT-qPCR) (NATHUES et al., 2009; WATTANAPHANSAK et al., 2010).

Já para testes com amostras obtidas *post-mortem*, como tecidos frescos, tecidos congelados ou amostras fixadas, podem ser realizadas técnicas de diagnóstico histopatológico em cortes histológicos corados pela hematoxilina e eosina (H&E), onde podem ser observadas lesões características de hiperplasia de epitélio em criptas intestinais. Porém, a bactéria não é visualizada nessa coloração, sendo por isto necessário colorações especiais como impregnação prata (por ser uma bactéria argirofílica), a técnica de imuno-histoquímica para detecção do organismo intracelular através de reação com anticorpo *anti-L. intracellularis* marcado com cromógeno (GUEDES e GEBHART, 2003a), ou a hibridização *in situ* fluorescente, onde pode ser observada a presença de bactérias vivas pela ligação entre uma sonda fluorescente e o DNA bacteriano (BOYE et al., 1998).

### **Tratamento e controle**

O tratamento de escolha para o controle da EP é o uso de antimicrobianos (McORIST e GEBHART, 1995). Alguns antimicrobianos inibem o crescimento bacteriano em uma determinada concentração, a concentração inibitória mínima (CIM, ou *MIC*, em inglês) e necessitam de uma concentração maior para matar o microrganismo, a concentração bactericida mínima (CBM, ou *MBC*, em inglês). Quanto maior a distância entre esses valores diz-se que o antimicrobiano tem atividade bacteriostática. Por outro lado, quanto mais próximos forem esses valores, diz-se que o antimicrobiano possui atividade bactericida (SPINOZA et al., 2011).

Experimentos *in vitro* indicam que três cepas norte-americanas de *L. intracellularis* são susceptíveis à macrolídeos como a eritromicina e tilmicosina, e à tetraciclina como a clortetraciclina (McORIST e GEBHART, 1995). Em outro estudo, avaliando isolados europeus e norte-americanos os antimicrobianos mais eficazes foram o carbadox, a tiamulina e a valnemulina. A clortetraciclina, a tilosina e a lincomicina apresentaram-se menos eficazes contra *L. intracellularis* (WATTANAPHANSACK et al., 2009). Para isolados brasileiros, já foram testados alguns antimicrobianos da família das tetraciclina, aminoglicosídeos, pleuromutilinas e macrolídeos. A valnemulina e a tiamulina apresentaram-se mais ativas contra cepas de *L. intracellularis*, e a tilosina, lincomicina, espectinomina e gamitromicina apresentaram atividade intermediária (SUAREZ, 2019; WATTANAPHANSACK et al., 2019)

Atualmente há duas vacinas comerciais para prevenção de EP em suínos. Uma das vacinas é composta por cepa atenuada de *L. intracellularis*, de uso oral, que quando aplicada em leitões de três semanas de idade demonstrou induzir soroconversão, além de proteger contra o aparecimento dos sinais clínicos (McORIST e SMITS, 2007). A outra vacina comercialmente disponível é constituída por inativação de cultura de *L. intracellularis*, é de aplicação parenteral, e também demonstrou eficácia tanto na soroconversão como na eliminação de bactéria nas fezes de leitões experimentalmente inoculados (McORIST; SMITS, 2007; ROERINK et al., 2018).

Não há vacinas contra *L. intracellularis* especificamente desenvolvidas para o controle da EP em equinos, mas a administração intra-retal da vacina viva atenuada comercializada para suínos tem se mostrado eficaz para a proteção de potros. (PUSTERLA et al., 2009)

Ambas as vacinas dependem do cultivo em grande escala de *L. intracellularis* e, sendo *L. intracellularis* uma bactéria intracelular obrigatória, de crescimento lento e que requer uma atmosfera específica para ser propagada em condições laboratoriais, o custo de produção dessas vacinas é elevado. Portanto, muitos produtores de suínos ainda

recorrem ao uso de antimicrobianos na ração para diminuir a pressão de infecção de *L. intracellularis* no rebanho (prevenção e controle) ou para tratamento dos animais afetados (HOLYOAKE et al., 2009; RESENDE et al., 2015). Em equinos, o tratamento da EP baseia-se na administração parenteral de antimicrobianos, como macrolídeos, em associação ou não com outras drogas, por aproximadamente duas a três semanas (PUSTERLA e GEBHART, 2013).

### **Tráfego intracelular em células epiteliais e macrófagos.**

#### **Mecanismos da endocitose**

As células epiteliais intestinais funcionam como a principal barreira que separa o conteúdo interno do corpo do ambiente externo. Estas células são altamente polarizadas, com superfícies apicais expostas ao ambiente externo e superfícies basolaterais conectando-as a uma lâmina basal subjacente. As células epiteliais conferem força e rigidez ao tecido, formando uma monocamada por meio de junções herméticas célula-célula (ALTSCHULER et al., 2003).

Os epitélios regulam o transporte seletivo de substâncias, por exemplo, íons, fluidos, substratos metabólicos e subprodutos, macromoléculas e micropartículas, através da monocamada e alterações no tráfego de receptores de membrana apical, transportadores e canais estão frequentemente associados a doenças (ALTSCHULER et al., 2003).

A endocitose descreve a produção *de novo* de membranas internas a partir da bicamada lipídica da membrana plasmática. Ao fazê-lo, os lipídios da membrana plasmática e as proteínas integrais e o fluido extracelular tornam-se totalmente internalizados na célula (DOHERTY e MCMAHON, 2009). A endocitose é um processo biológico dependente de energia, vital para células. Durante a endocitose, uma porção da membrana plasmática sofre invaginação e forma uma vesícula lipoproteica na porção interior da célula, que é então liberada no citoplasma. Portanto, essa vesícula é constituída de uma porção da membrana plasmática, bem como constituintes do meio externo confinados em uma vesícula intracelular. A endocitose pode ser classificada em fagocitose e pinocitose (DOHERTY e MCMAHON, 2009).

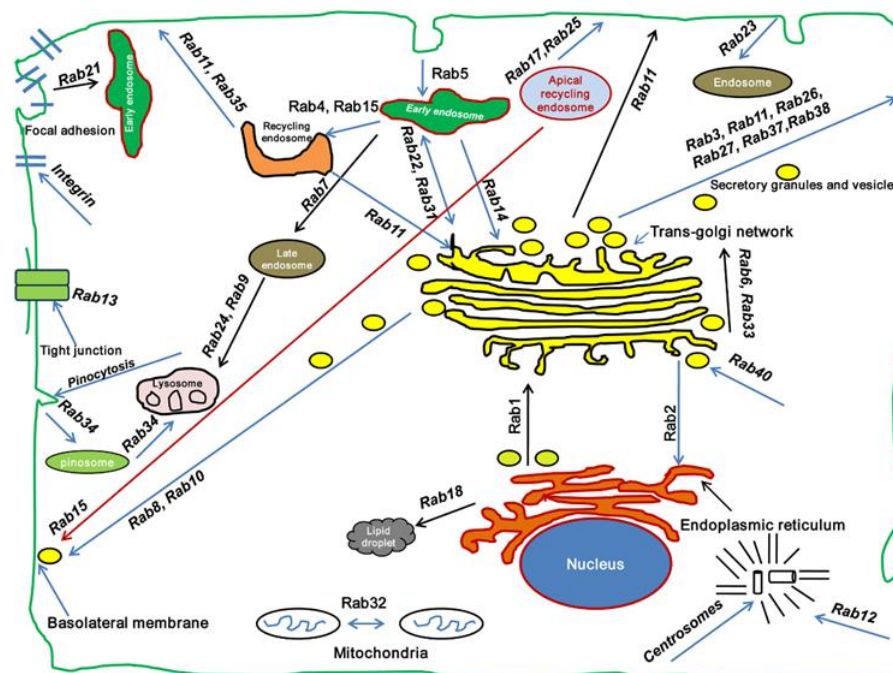
A fagocitose é desempenhada por células do sistema imunológico, principalmente por fagócitos profissionais, como os monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e mastócitos. Nesse processo, as células internalizam materiais exógenos, geralmente com diâmetros maiores que 750 nm, para formar um fagossomo que será processado no interior da célula. Já na pinocitose, a vesícula endocitada é chamada endossomo e essa via é virtualmente presente em todos os tipos celulares (WIEFFER et al., 2009).

A pinocitose pode ser dividida em endocitose mediada por clatrina, endocitose mediada por caveolina, macropinocitose ou endocitose clatrina-caveolina independentes. A via de internalização será determinada por uma série de fatores, incluindo as propriedades físico-químicas dos materiais a serem internalizados, como tamanho, composição química, carga, funcionalização da superfície, reatividade superficial, adsorção superficial, etc. (SAHAY et al., 2010).

Os componentes da maquinaria de tráfico não podem, por si só, conduzir um transporte vesicular eficiente. Por exemplo, combinações específicas dos receptores de proteínas de fijación soluble de NSF (SNARE) podem conduzir à fusão de membranas

sintéticas; no entanto, a reação de fusão é extremamente lenta. Dois tipos de regulamentos altamente conservados garantem que o tráfego intracelular seja um processo específico e eficiente: GTPases monoméricas e modificações pós-translacionais de componentes de carga e máquinas (SEGEV et al., 2012). As GTPases monoméricas das famílias Arf, Rab, Rho e dinamina controlam etapas específicas do transporte vesicular. As GTPases em geral atuam como interruptores moleculares à medida que alternam entre as formas inativas ligadas ao GDP e as formas ativas ligadas ao GTP. Essa troca é catalisada por fatores de troca de nucleotídeos guanina (GEFs), que ativam as GTPases, e por proteínas ativadoras de GTPase (GAPs), que as inativam (SEGEV et al., 2012).

Cada Rab tem como alvo uma organela e especifica uma etapa de transporte ao longo das vias exocítica, endocítica e de reciclagem. Assim, as Rabs podem controlar o brotamento da membrana e a formação de vesículas de transporte, o movimento da vesícula ao longo do citoesqueleto e a fusão da membrana no compartimento alvo (**Figura 1**).



**Figura 1.** Localização de proteínas Rab em células eucariotas (Modificado de BHUIN; ROY, 2014)

O grande número de proteínas Rab reflete a complexidade do sistema de transporte intracelular, que é essencial para a localização e função da membrana e proteínas secretoras, como hormônios, fatores de crescimento e seus receptores de membrana (BHUIN e ROY, 2014).

As proteínas Rab encontram-se localizadas na superfície citoplasmática de uma organela ligada à membrana, e no estado estacionário, as proteínas Rab se acumulam em seu compartimento alvo e, portanto, têm sido usadas como marcadores para diferentes organelas (**Tabela 1**). A maioria das proteínas Rab são onipresentes em sua expressão, enquanto algumas têm uma distribuição específica de tecido-célula mais limitada.

**Tabela 1.** Proteínas Rab em vias endocíticas, transcíticas e exocíticas (\*)

<b>Rab</b>	<b>Localização intracelular</b>	<b>Função</b>
<b>Rab1</b>	RE-Golgi intermediário	Tráfico ER-Golgi
<b>Rab2</b>	RE-Golgi intermediário	Tráfico ER-Golgi
<b>Rab3</b>	Membranas TGN-apico-laterais	Exocitose de grânulos secretores e vesículas de TGN para membranas apico-laterais
<b>Rab4</b>	Endossomas iniciais e de reciclagem	Reciclagem endocítica para membrana plasmática
<b>Rab5</b>	Vesículas revestidas por clatrina e endossomos iniciais	Internalização endocítica e fusão endossomal precoce
<b>Rab6</b>	Intra-Golgi	Transporte Intra-Golgi
<b>Rab7</b>	endossomos tardios	Controlar o tráfego endocítico tardio
<b>Rab8</b>	Golgi mediano e TGN	Transporte de proteínas basolaterais do Golgi mediano e TGN
<b>Rab9</b>	endossomos tardios	Transporte de endossomos tardios para <i>trans</i> -Golgi
<b>Rab10</b>	Golgi mediano e TGN	Transporte de proteínas basolaterais do Golgi mediano e TGN
<b>Rab11</b>	Vesículas TGN/pós-Golgi e endossomas de reciclagem	Transporte do Golgi e reciclagem endocítica apical e basolateral
<b>Rab12</b>	Região periférica da célula aos centrosomos perinucleares	Transporte da região periférica da célula para centrosomos perinucleares
<b>Rab14</b>	Endossomos precoces e Golgi	Transporte entre endossomos iniciais e Golgi
<b>Rab15</b>	Endossomas iniciais e de reciclagem	Inibidor da internalização endocítica
<b>Rab17</b>	Epitelial específico; endossomo de reciclagem apical	Transporte através de endossomos de reciclagem apical
<b>Quarta 18</b>	RE-Golgi intermediário	Tráfico ER-Golgi
<b>Rab20</b>	Nos túbulos densos apicais, estruturas endocíticas	Na endocitose/reciclagem apical
<b>Rab21</b>	Endossomos precoces	Internalização endocítica
<b>Rab22</b>	Endossomos precoces e TGN	Transporte entre TGN e endossomos iniciais e vice-versa
<b>Rab23</b>	Membranas plasmáticas e vesículas endocíticas precoces	Transporte entre as membranas plasmáticas e as vesículas endocíticas iniciais
<b>Rab24</b>	RE/ região <i>cis</i> -Golgi e em estruturas endossomais tardias	Processos relacionados à autofagia
<b>Rab25</b>	Epitelial específico; endossomo de reciclagem apical	Transporte através de endossomos de reciclagem apical
<b>Rab26</b>	Membranas TGN-apico-laterais	Exocitose de grânulos secretores e vesículas de TGN para membranas apico-laterais
<b>Rab27</b>	Do	Do
<b>Rab31</b>	Endossomos precoces e TGN	Transporte entre TGN e endossomos iniciais e vice-versa
<b>Rab33</b>	Intra-Golgi	Transporte Intra-Golgi
<b>Rab35</b>	Reciclagem de endossomos	Reciclagem endocítica apical
<b>Rab37</b>	Membranas TGN-apico-laterais	Exocitose de grânulos secretores e vesículas de TGN para membranas apico-laterais
<b>Rab38</b>	Do	Do
<b>Rab43</b>	RE-Golgi intermediário	Tráfico ER-Golgi

\* (Tabela modificada de BHUIN e ROY, 2014)

## 2.2 Manipulação das vias endocíticas por patógenos bacterianos intracelulares

Muitas bactérias patogênicas intracelulares têm a capacidade de entrar e sobreviver dentro dos seus hospedeiros. Isto é feito mediante vários mecanismos altamente especializados que estes patógenos desenvolveram para evitar a degradação intracelular, além de terem a capacidade de obter nutrientes e evitar a detecção do sistema imunológico (GARCIA-DEL PORTILLO e FINLAY, 1995). Apresentam a capacidade de escapar do fagossomo e se replicar dentro da célula rica em nutrientes, podem inibir ou retardar a maturação do fagossoma evitando a fusão com os lisossomos, assim como também podem inibir as interações com a via endocítica-lissosomal (SINAI e JOINER, 1997).

Bactérias como *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium têm a capacidade de modular a expressão de vários Rabs (Rab5, Rab7, Rab9 e Rab18) nos fagossomos, para assim residir em um compartimento especializado, de baixa acidez, desprovido de ácidos, enzimas lisossômicas e receptores de transferrina, alterando dessa forma o padrão de tráfego intracelular, mecanismo que permite a sobrevivência de *Salmonella* dentro do vacúolo (HASHIM et al., 2000).

Espécies de *Mycobacterium* compartilham a capacidade de colonizar um fagossomo não degradativo em macrófagos (STURGILL-KOSZYCKI et al., 1994). Porém, outros dados relatados demonstraram que *M. marinum*, *M. tuberculosis* e *M. leprae* também têm a capacidade de escapar dos fagossomos e crescer dentro do citosol das células hospedeiras (STAMM et al., 2003).

Por outro lado, existem patógenos que apresentam a capacidade de se desligar da via endocítica, como *Legionella pneumophila*, que interrompem a maturação fagossômica em estágios muito iniciais e exploram proteínas reguladoras de PI3P para evitar a degradação. Por exemplo, os fagossomos contendo *L. pneumophila* não recrutam Rab5 ou os marcadores endossomais tardios Rab7 e LAMP-1 e -2 (GASPAR e MACHNER, 2014).

Dessa forma, a compreensão de como os patógenos evitam tais mecanismos celulares é essencial para descobrir estratégias de infecção bacteriana. Por consequência, um melhor entendimento desse processo pode revelar o funcionamento interno das células hospedeiras, e trazer possibilidades de desenvolvimento de novas táticas de controle para EP.

## Referências

- ALBERDI, M. P. et al. Expression by *Lawsonia intracellularis* of type III secretion system components during infection. **Veterinary Microbiology**, v. 139, n. 3–4, p. 298–303, nov. 2009.
- ALBERTON, E. L. et al. Prevalência da enteropatia proliferativa suína causada por *Lawsonia intracellularis* em suínos abatidos no estado de Mato Grosso. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 1, 2011.
- BHUIN, T.; ROY, J. K. Rab proteins: The key regulators of intracellular vesicle transport. **Experimental Cell Research**, v. 328, n. 1, p. 1–19, 2014.
- BOYE, M. et al. Specific detection of *Lawsonia intracellularis* in porcine proliferative enteropathy inferred from fluorescent rRNA in situ hybridization. **Veterinary pathology**, v. 35, n. 2, p. 153–156, mar. 1998.
- BRANDT, D. et al. Evaluation of *Lawsonia intracellularis* infection in a group of pigs in a subclinically affected herd from weaning to slaughter. **Veterinary Microbiology**, v. 146, p. 361–365, 2010.
- BREUER, J. et al. A follow up study on antibodies against *Lawsonia intracellularis* in mares and foals from two breeding farms in Germany. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr.**, v. 124, n. 7–8, p. 337–342, 2011.

- DRUMO, R. et al. Salmonella enterica serovar typhimurium exploits inflammation to modify swine intestinal microbiota. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, n. JAN, p. 1–13, 2016.
- GABARDO, M. P. et al. Equine proliferative enteropathy on a Brazilian farm. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 35, n. 5, p. 443–447, 2015.
- GARCIA-DEL PORTILLO, F.; FINLAY, B. B. The varied lifestyles of intracellular pathogens within eukaryotic vacuolar compartments. **Trends in microbiology**, v. 3, n. 10, p. 373–380, out. 1995.
- GASPAR, A. H.; MACHNER, M. P. VipD is a Rab5-activated phospholipase a1 that protects Legionella pneumophila from endosomal fusion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 12, p. 4560–4565, 2014.
- GUEDES, R. M. C. et al. Validation of an immunoperoxidase monolayer assay as a serologic test for porcine proliferative enteropathy. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 14, n. 6, p. 528–530, 2002.
- GUEDES, R. M. C. et al. *Lawsonia intracellularis* in Pigs: Progression of Lesions and Involvement of Apoptosis. **Veterinary Pathology**, v. 54, n. 4, p. 620–628, 2017.
- GUEDES, R. M. C.; GEBHART, C. J. Onset and duration of fecal shedding, cell-mediated and humoral immune responses in pigs after challenge with a pathogenic isolate or attenuated vaccine strain of *Lawsonia intracellularis*. **Veterinary Microbiology**, v. 91, n. 2–3, p. 135–145, 2003.
- HANNIGAN, J. O. **Identification and preliminary characterisation of *Lawsonia intracellularis* cytolytic activity** University of Edinburgh, 1997.
- HASHIM, S. et al. Live *Salmonella* modulate expression of Rab proteins to persist in a specialized compartment and escape transport to lysosomes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 21, p. 16281–16288, 2000.
- HOLYOAKE, P. K. et al. Identifying obstacles to reducing the use of antibiotics to control porcine proliferative enteropathy. **Australian Veterinary Journal**, v. 87, p. 33–34, 2009.
- HONTECILLAS, R. et al. CD4+ T-cell responses and distribution at the colonic mucosa during *Brachyspira hyodysenteriae*-induced colitis in pigs. **Immunology**, v. 115, n. 1, p. 127–135, 2005.
- JENSEN, V. F.; JORSAL, S. E. L.; TOFT, N. A cross-sectional study of oral antibacterial treatment patterns in relation to specific diarrhoeal pathogens in weaner pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 203, p. 18–27, 2017.
- JOHNSON, B. K.; ABRAMOVITCH, R. B. Small Molecules That Sabotage Bacterial Virulence Expanding the Search for New Antibiotic Targets. **Cell Press**, 2017.
- JOHNSON, E. A.; JACOBY, R. O. Transmissible ileal hyperplasia of hamsters. II. Ultrastructure. **American Journal of Pathology**, v. 91, n. 3, p. 451–468, 1978.



- KATHAYAT, D. et al. Novel small molecules affecting cell membrane as potential therapeutics for avian pathogenic *Escherichia coli*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 2018.
- KELLEY MF, GEBHART CJ, O. S. **Multilocus sequencing typing system for *Lawsonia intracellularis***. Chicago, IL.: [s.n.].
- KNITTEL, J. P. et al. United States isolates of *Lawsonia intracellularis* from porcine proliferative enteropathy resemble European isolates. **Journal of Swine Health and Production**, v. 4, n. 3, p. 119–122, 1996.
- LAWSON, G. H.; GEBHART, C. J. Proliferative enteropathy. **Journal of comparative pathology**, v. 122, n. 2–3, p. 77–100, 2000.
- LAWSON, G. H. K. et al. Intracellular bacteria of porcine proliferative enteropathy: Cultivation and maintenance in vitro. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 5, p. 1136–1142, 1993.
- LAWSON, G. H. K. et al. Infection of cultured rat enterocytes by Ileal symbiont intracellularis depends on host cell function and actin polymerisation. **Veterinary Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 339–350, 1995.
- LLOYD, D. H.; PAGE, S. W. Antimicrobial Stewardship in Veterinary Medicine. **Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals**, n. 1, p. 675–697, 2018.
- MARSTELLER, T. A. et al. Monitoring the prevalence of *Lawsonia intracellularis* IgG antibodies using serial sampling in growing and breeding swine herds. **Journal of Swine Health and Production**, v. 11, n. 3, p. 127–130, 2003.
- McCLUSKEY, J. et al. LsaA, an antigen involved in cell attachment and invasion, is expressed by *Lawsonia intracellularis* during infection in vitro and in vivo. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 6, p. 2899–2907, 2002.
- McORIST, S. et al. Entry of the bacterium ileal symbiont intracellularis into cultured enterocytes and its subsequent release. **Research in Veterinary Science**, v. 59, n. 3, p. 255–260, 1995.
- McORIST, S. et al. Developed and resolving lesions in porcine proliferative enteropathy: Possible pathogenetic mechanisms. **Journal of Comparative Pathology**, v. 115, n. 1, p. 35–45, 1996.
- McORIST, S.; GEBHART, C. J. In vitro testing of antimicrobial agents for proliferative enteropathy (ileitis). **Swine Health and Production**, n. Mic, p. 146–149, 1995.
- McORIST, S.; SMITS, R. J. Field evaluation of an oral attenuated *Lawsonia intracellularis* vaccine for porcine proliferative enteropathy (ileitis). **Veterinary Record**, v. 161, n. 1, p. 26–28, 2007.
- MORENO, A. M. *Lawsonia intracellularis* detection in swine feces from important producing regions in. **Arquivos do Instituto Biológico**, n. January, 2002.

- NATHUES, H.; HOLTHAUS, K.; GROSSE BEILAGE, E. Quantification of *Lawsonia intracellularis* in porcine faeces by real-time PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 6, p. 2009–2016, 2009.
- NISHIKAWA, S. et al. Draft Genome Sequences of *Lawsonia intracellularis* Swine Strains Causing Proliferative Enteropathy in Japan. **Microbiology Resource Announcements**, v. 7, n. 9, p. 1–2, 2018.
- PARADIS, M. A. et al. Seroprevalence of *Lawsonia intracellularis* in different swine populations in 3 provinces in Canada. **Canadian Veterinary Journal**, v. 48, n. 1, p. 57–62, 2007.
- PEREIRA, C. E. R. ***Lawsonia intracellularis*: Macrophages permissibility, mechanism of cell entry and antimicrobial susceptibility**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2018.
- PEREIRA, C. E. R. et al. In vitro antimicrobial activity against equine *Lawsonia intracellularis* strains. **Equine Veterinary Journal**, p. 0–2, 2019.
- PEREIRA, C. E. R. et al. Survival of *Lawsonia intracellularis* in porcine peripheral blood monocyte-derived macrophages. **PloS one**, v. 15, n. 7, p. e0236887, 2020.
- PEREIRA, P. R. et al. Lesões intestinais em suínos abatidos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 5, p. 823–831, 2018.
- PUSTERLA, N.; GEBHART, C. *Lawsonia intracellularis* infection and proliferative enteropathy in foals. **Veterinary Microbiology**, v. 167, n. 1–2, p. 34–41, 2013.
- RESENDE, T. P. et al. Serological profile, seroprevalence and risk factors related to *Lawsonia intracellularis* infection in swine herds from Minas Gerais State, Brazil. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, 2015.
- RESENDE, T. P. et al. Effects of *Lawsonia intracellularis* infection in the proliferation of different mammalian cell lines. **Veterinary microbiology**, v. 228, p. 157–164, jan. 2019.
- ROERINK, F. et al. A novel inactivated vaccine against *Lawsonia intracellularis* induces rapid induction of humoral immunity, reduction of bacterial shedding and provides robust gut barrier function. **Vaccine**, v. 36, n. 11, p. 1500–1508, 2018.
- SAES, J. V. 2012. **Isolamento e propagação da cepa autóctone de *Lawsonia intracellularis* in vitro e sua utilização em diagnóstico sorológico**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.
- SEGEV, N. et al. **Trafficking Inside Cells: Pathways, Mechanisms and Regulation**. [s.l.] Springer New York, 2012.
- SINAI, A. P.; JOINER, K. A. Safe haven: The cell biology of nonfusogenic pathogen vacuoles. **Annual Review of Microbiology**, v. 51, p. 415–462, 1997.
- STAMM, L. M. et al. Mycobacterium marinum Escapes from Phagosomes and Is Propelled by Actin-based Motility. **Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n. 9, p. 1361–1368, 2003.

- STEGE, H. et al. Infection dynamics of *Lawsonia intracellularis* in pig herds. **Veterinary Microbiology**, v. 104, n. 3–4, p. 197–206, 2004.
- STURGILL-KOSZYCKI, S. et al. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. **Science**, v. 263, n. 5147, p. 678–681, 1994.
- VANNUCCI, F. A.; FOSTER, D. N.; GEBHART, C. J. Comparative Transcriptional Analysis of Homologous Pathogenic and Non-Pathogenic *Lawsonia intracellularis* Isolates in Infected Porcine Cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, 2012.
- VANNUCCI, F. A.; WATTANAPHANSAK, S.; GEBHART, C. J. An alternative method for cultivation of *Lawsonia intracellularis*. **Journal of Clinical Microbiology**, 2011.
- WATTANAPHANSAK, S. et al. Isolation and in vitro antimicrobial susceptibility of porcine *Lawsonia intracellularis* from Brazil and Thailand. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 27, p. 1–7, 2019.
- WATTANAPHANSAK, S.; SINGER, R. S.; GEBHART, C. J. In vitro antimicrobial activity against 10 North American and European *Lawsonia intracellularis* isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 3–4, p. 305–310, 2009.
- WELLS, T. J. et al. Autotransporter proteins: Novel targets at the bacterial cell surface. **FEMS Microbiology Letters**, v. 274, n. 2, p. 163–172, 2007.
- WU, Z. et al. Seroprevalence of *Lawsonia intracellularis* antibodies in intensive pig farms in China. **BMC Veterinary Research**, v. 10, n. 100, 2014.
- YEH, J.; GA, A. Systemic cytokine response in pigs infected orally with a *Lawsonia intracellularis* isolate of South Korean origin. **The Journal of veterinary medical science**, v. 80, n. 1, p. 13–19, 2018.

## Capítulo 1 – Novo método de quantificação de *Lawsonia intracellularis* através de densidade óptica por espectrofotometria.

Mirtha E. Suarez-Duarte<sup>1</sup>; Ricardo P. Laub<sup>1</sup>; Carlos E. R. Pereira<sup>2</sup>; Talita P. Resende<sup>3</sup>; Renato de Lima Santos<sup>1</sup>; Matheus D. Araujo<sup>1</sup>; Jessica C. R. Barbosa<sup>1</sup>; Paula A. Correia<sup>1</sup>; Roberto M. C. Guedes<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Department of Clinic and Surgery, Veterinary School, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil; <sup>2</sup>Department of Veterinary Medicine, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brazil;

<sup>3</sup>Department of Veterinary Medicine, Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil;  
E-mail: [guedesufmg@gmail.com](mailto:guedesufmg@gmail.com)

### Resumo

Estudos para determinação da patogênese da *L. intracellularis* necessitam de quantificação de concentração bacteriana em suspensão para serem realizados com acurácia, tanto para modelos *in vitro*, quanto *in vivo*. Pela característica do crescimento fastidioso de *L. intracellularis* – intracelular e microaerofílica - não é viável que essa contagem seja realizada por métodos tradicionais, como a contagem de unidade formadora de colônias. Até o momento, a única técnica de contagem amplamente disponível para este fim é a PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR). Contudo, o tempo necessário para realização dessa técnica é incompatível com a sobrevivência da *L. intracellularis* fora de seu ambiente intracelular e microaerofílico. A espectrofotometria por densidade óptica é um método rápido, embora indireto, de estimar a concentração de bactérias em suspensão e tem sido utilizado com esta finalidade para estimar a concentração bacteriana para algumas espécies procariotas de crescimento fastidioso. Assim, o objetivo deste estudo foi determinar a correlação entre os resultados da qPCR com a densidade óptica (DO) de suspensões de *L. intracellularis*, de modo a viabilizar a utilização da espectrofotometria durante os experimentos que necessitem de uma determinação imediata da concentração bacteriana de amostras em suspensão. Foram obtidas as DOs a 405 e 450nm, utilizando cubeta ou microplaca, e a RT-qPCR foi utilizada para determinar a curva padrão a partir de amostras de concentração conhecida e para determinar concentração de *L. intracellularis* nas suspensões testadas. Assim, quatro variações de comparação entre DO e RT-qPCR foram determinadas: 1) espectrofotometria a 405nm utilizando cubeta vs RT-qPCR; 2) espectrofotometria a 405nm em microplaca vs RT-qPCR; 3) espectrofotometria a 450nm em cubeta vs RT-qPCR e 4) espectrofotometria a 450nm utilizando microplaca vs RT-qPCR. Os testes foram feitos em duas repetições independentes, com cada amostra testada em duplicata. A correlação entre os resultados da concentração bacteriana obtida por RT-qPCR e a DO foi superior a 80% com  $p < 0.05$  para todas as variações testadas. As seguintes equações de conversão de DO para número de microrganismos/mL foram obtidas: 1)  $f(x) = - 7,438 \times 10^8 + 1,797 \times 10^{10} \cdot x$ ; 2)  $f(x) = 3,255 \times 10^8 + 3,003 \times 10^9 \cdot x$ ; 3)  $f(x) = - 8,006 \times 10^8 + 2,169 \times 10^{10} \cdot x$ ; 4)  $f(x) = 3,107 \times 10^8 + 3,758 \times 10^9 \cdot x$ , sendo “X” o valor de Ct obtido pela RT-qPCR. Com esses resultados, pesquisadores poderão otimizar a acurácia de seus experimentos com *L. intracellularis*, utilizando-se da espectrometria óptica, um método de fácil execução e resultado imediato para determinação da concentração bacteriana em suspensões.

**Palavras- chave:** densidade óptica, enteropatia proliferativa, contagem indireta, RT-qPCR, espectrofotômetro.

## Introdução

O estudo da patogênese de microrganismos é indispensável para entender o processo de instalação das lesões e aparecimento de sinais clínicos, assim como para o desenvolvimento de estratégias eficazes e modernas de controle e prevenção das infecções e alternativas de tratamento. O entendimento da patogênese, portanto, depende extensivamente de estudos controlados, primeiramente executados *in vitro* e, posteriormente, aplicados *in vivo*.

A patogênese da *Lawsonia intracellularis* ainda carece de esclarecimentos. Essa é uma bactéria intracelular obrigatória, que requer uma atmosfera microaerofílica com 82,2% de nitrogênio, 8,8% de dióxido de carbono e 8% de oxigênio e temperatura de 37°C para sua propagação *in vitro* (LAWSON et al., 1993). *L. intracellularis* causa uma doença intestinal relevante em suínos, equinos, além de vários outros mamíferos como os coelhos (FRAZER, 2008; GABARDO et al., 2017; McORIST et al., 1996, YEH, 2023).

Os detalhes da infecção por *L. intracellularis* nas células intestinais epiteliais ainda não foram elucidados e, até o momento, os mecanismos utilizados para levar à lesão de hiperplasia epitelial, característico da enteropatia proliferativa, ainda não foram esclarecidos. Além disso, muitas das pesquisas aplicadas relacionadas à *L. intracellularis* são necessariamente desenvolvidas *in vitro*, como estudos de determinação da concentração inibitória mínima (MIC) (WATTANAPHANSAK et al., 2019) e estudos de epidemiologia (GABARDO et al., 2017) e, para tanto, é essencial um método de quantificação para o desenvolvimento de um desenho experimental acurado.

Existem poucos laboratórios de pesquisa em todo o mundo têm a capacidade de cultivar a *L. intracellularis in vitro*. Infelizmente, todos eles passam por dificuldades ao delinear experimentos que requerem a utilização de *L. intracellularis* em uma concentração pré-determinada. Atualmente, a PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) é o método mais utilizado para a determinação da concentração bacteriana em inóculos experimentais (NATHUES et al., 2009; PEREIRA et al., 2020; RESENDE et al., 2019). Contudo, mesmo que o tempo de execução de uma RT-qPCR seja considerado curto, ele é longo o suficiente para se fazer incompatível com a manutenção da viabilidade da *L. intracellularis* até a liberação dos resultados. Desse modo, normalmente o experimento é executado com uma concentração subjetivamente determinada e, somente após a finalização da RT-qPCR, o número real de bactérias por unidade de volume é definido.

Uma outra técnica de contagem de *L. intracellularis* é a quantificação por imunocitoquímica, uma coloração por imunoperoxidase indireta usando um anticorpo monoclonal específico para *L. intracellularis*. Nesta técnica, são realizadas diluições seriadas a partir da cultura bacteriana pura, e então é efetuada a contagem individualizada das bactérias em um microscópio ótico (McORIST et al., 1987). Contudo, assim como a RT-qPCR, este método não oferece um resultado imediato, além de demandar a disponibilidade de anticorpo monoclonal anti-*L. intracellularis*, o qual não é comercialmente disponível (GUEDES et al., 2002).

Existem diversos métodos para avaliar a concentração microbiana, medindo o número de células, massa ou constituintes, e podem ser utilizados para diversas espécies. As abordagens mais amplamente utilizadas para determinar a concentração bacteriana são a contagem de placas viáveis, que mede a unidade formadora de colônias por mililitro

(UFC/mL), e a espectrofotometria, que determina a densidade ótica (DO) de uma amostra líquida. A abordagem que mede a unidade UFC/mL é altamente sensível, porém o método apresenta algumas desvantagens, pois apenas células bacterianas vivas e cultiváveis que geram colônias visíveis podem ser contabilizadas por este método (KOCH, 1970).

A DO é um método de quantificação do crescimento microbiano em relação à turbidez de um inóculo, ou seja, sua DO. É estabelecido que o número de bactérias dentro da suspensão é diretamente proporcional à turbidez da cultura e, como tal, a diluição para uma DO definida representa uma concentração microbiana específica. Esta medição é amplamente utilizada em pesquisas e laboratórios para várias bactérias, uma vez que se baseia num método rápido e simples de ajuste das suspensões bacterianas para definir as concentrações, o que permite que os pesquisadores possam diluir rapidamente as suspensões para uma concentração estimada usando densidade ótica e, em seguida, confirmar que a estimativa estava correta usando a contagem de concentração de células (BROWN, 2022).

Contudo, alguns fatores são importantes para a conversão da DO para o número de microrganismos por unidade de volume, sendo o tamanho do microrganismo um dos mais relevantes. O tamanho da *L. intracellularis*, 1,7µm de comprimento por 0,23 a 0,32 µm de largura, é ímpar em relação a outras bactérias intestinais mais amplamente estudadas, como a *E. coli*, com 1,2 a 2,0 µm de comprimento por 0,5 µm de largura (DE PETRIS, 1965), e a *Salmonella* com 2,0 a 5,0 µm de comprimento e 0,7 a 1,5 µm de largura, essas singularidades em tamanho celular dificulta a utilização de resultados de estudos anteriores (FREDLUND et al., 2018).

Devido à necessidade de contar com um método de quantificação de resultado imediato para *L. intracellularis*, este trabalho teve objetivo desenvolver o método de espectrofotometria por densidade ótica (DO) correlacionado à RT-qPCR para quantificação de *L. intracellularis*.

## **Materiais e Métodos**

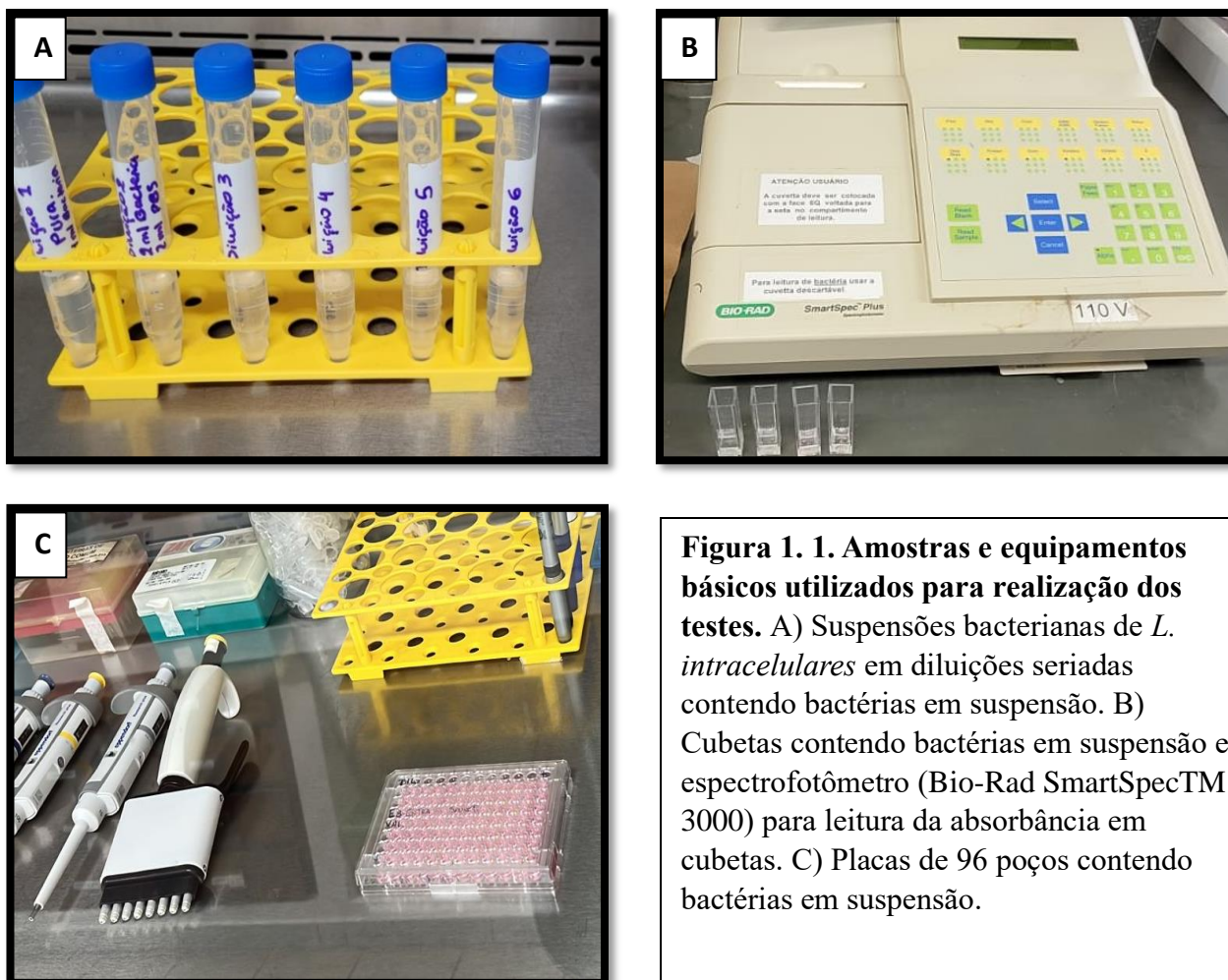
### **Propagação *in vitro* de *Lawsonia intracellularis***

A cepa vacinal de *L. intracellularis* (ATCC PTA-3457) foi propagada em fibroblastos de camundongo (Células McCoy; ATCC CRL-1696) cultivados em Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco Invitrogen Corporation), suplementado com 7% de soro fetal bovino (FBS; Corning 35011CV), como descrito em anteriormente (GUEDES e GEBHART, 2003). Em resumo, monocamadas de células McCoy com cerca de 30% de confluência foram infectadas com *L. intracellularis*, 24 h da passagem das células, sendo então incubadas a 37°C em atmosfera controlada (VANNUCCI et al., 2011). Sete dias após a infecção, as monocamadas de células McCoy foram imergidas em cloreto de potássio a 0,1%, lisadas mecanicamente, centrifugadas e suspensas em solução de tampão fosfato salino (PBS) (GUEDES e GEBHART, 2003a). A suspensão resultante foi filtrada em filtro de 0.80 µm para remoção de restos celulares e foi então utilizada para a mensuração da densidade ótica e para realização de RT-qPCR em tempo real. Além disso foi considerado um controle negativo, este controle foi feito apenas com as células McCoy filtradas pelo filtro 0,08 µm, tirando o artefato na turbidez causada pelos resíduos dela.

### **Análise espectrofotométrica de Densidade Óptica (DO) da cultura de *L. intracellularis*.**

A DO da cultura correspondente à absorvância foi determinada com base na expressão  $DO = \log(I_0/I)$ , onde  $I_0$  é a intensidade da luz incidente e  $I$  é a intensidade da luz transmitida através da suspensão de bactérias, com um comprimento de onda de 405 e 450nm, respectivamente. Em tubos cônicos de 15 mL foram colocadas amostras do cultivo de *L. intracellularis* em diluições seriadas (Figura 1.1). A primeira diluição (D1) correspondeu ao material ressuspendido, puro e filtrado proveniente diretamente do lisado das células. A partir desta amostra inicial foram feitas as diluições subsequentes, em uma relação 2:1, sendo feitas no total cinco diluições (D1, D2, D3, D4, D5). A quantidade de diluições foi determinada com base em um teste piloto, no qual a DO de maiores diluições não foi detectada pelo espectrofotômetro (dados não apresentados).

Para a leitura no espectrofotômetro foram utilizadas cubetas de plástico com 4,40 cm de altura e 1,25 cm de comprimento, preenchidas com 1mL da suspensão bacteriana e também microplacas de 96 poços, com poços com dimensões externas de 85,4x 127,6 x 3 x 14,40 mm, preenchidos com 200 µl de suspensão bacteriana (Figura 1.1). O equipamento utilizado para a espectrofotometria em cubetas foi o Bio-Rad SmartSpec™ 3000 (**Figura 1.1**) e para a mensuração em microplacas, foi utilizado o leitor de Elisa semi automático MCL-2100C.



**Figura 1. 1. Amostras e equipamentos básicos utilizados para realização dos testes.** A) Suspensões bacterianas de *L. intracelulares* em diluições seriadas contendo bactérias em suspensão. B) Cubetas contendo bactérias em suspensão e espectrofotômetro (Bio-Rad SmartSpec™ 3000) para leitura da absorbância em cubetas. C) Placas de 96 poços contendo bactérias em suspensão.

### PCR Quantitativo.

Para o ensaio de RT-qPCR, as mesmas diluições utilizadas nas análises de espectrometria foram utilizadas para extração do DNA com o kit de extração comercial DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen Inc., Toronto, ON), de acordo com as instruções do fabricante. Para a RT-qPCR foram utilizados os primers bcL.intra114f (5'CACTTGCAAACAATAAACTTGGTCTTC-3') e bcL.intra-263r (5'CATTCATATTTGTA CTTGTCCCTGCA-3'), associados a sonda intra201p (TCCTTGATCAATTTGTTGTGGATTGTATTCAAGG), que tem como alvo o gene *amonia aspartato lyase (aspA)*, com limite de detecção entre as bases  $10^4$ - $10^{11}$ . A reação foi realizada em um volume final de 20  $\mu$ L, composta por primer 20x e sondas para o sistema TaqMan, com uma concentração final de 400 nM para cada primer, 80 nM para a sonda TaqMan e PCR Mastermix (TaqMan Universal PCR Mastermix; Applied Biosystems), de acordo com as indicações do fabricante. As amostras foram colocadas em placas de 96 poços e amplificadas em termociclador ViiATM 7 Real-Time PCR System (appliedbiosystems®), com as seguintes condições de amplificação: 2 min a 50° C, 10 min a 95° C, 40 ciclos de 15 seg a 95° C, e 1 min a 60° C. Todas as reações foram realizadas em duplicata e cada reação incluiu a curva padrão e controle negativo. Os resultados foram analisados no software QuantStudio™ RealTime PCR v1.2. A curva



padrão foi delineada de acordo com outros estudos de RT-qPCR (SAMPIERI et al., 2013; WATTANAPHANSAK et al., 2010).

### Análise estatística

Com base na variação dos comprimentos de onda para a espectrofotometria e com o recipiente utilizado para leitura das amostras (cubeta ou microplacas de 96 poços), foram criados quatro grupos experimentais: 1) espectrofotometria a 405nm utilizando cubeta vs RT-qPCR; 2) espectrofotometria a 405nm em microplaca vs RT-qPCR; 3) espectrofotometria a 450nm em cubeta vs RT-qPCR; e 4) espectrofotometria a 450nm utilizando microplaca vs RT-qPCR. Para cada grupo experimental foram realizados dois testes independentes, sendo cada amostra analisada em duplicata.

Os resultados da RT-qPCR e da espectrofotometria foram utilizados para determinação da correlação entre DO e o Ct, com posterior análise de regressão para determinar a equação para transformação dos valores DO no número de bactérias por mL. Para verificação da repetibilidade dos resultados, foram delineados dois testes independentes utilizando-se *L. intracellularis* em passagens diferentes (teste 1: Vac /passagem 6; teste 2: Vac/passagem 8). As análises estatísticas foram realizadas por meio do software R (R Core Team, ((2019), [s.d.]).

## Resultados

### Espectrofotometria e RT-qPCR

Foram realizados dois testes independentes utilizando cepas de *L. intracellularis* em passagens diferentes. Os dados obtidos na espectrofotometria ótica e na RT-qPCR para o teste 1 e para o teste 2, estão nas **Tabelas 1.1. e 1.2.**, respectivamente. Conforme esperado, as diluições seriadas das suspensões bacterianas foram acompanhadas pelo aumento dos valores de Ct da RT-qPCR e diminuição da DO (**Tabelas 1.1 e 1.2**).

**Tabela 1.1. Valores de densidades ópticas para o teste 1, referentes às suspensões de *Lawsonia intracellularis* em diluição seriada de 2:1, a partir da suspensão D1.**

Diluições	Cubeta 405nm	Cubeta 450nm	Microplaca 405nm	Microplaca 450nm	RT-qPCR (Ct)
<b>D1</b>	0,604	0,487	0,161	0,137	15,706
<b>D2</b>	0,302	0,245	0,106	0,091	16,094
<b>D3</b>	0,149	0,125	0,085	0,073	16,520
<b>D4</b>	0,077	0,064	0,073	0,063	18,657
<b>D5</b>	0,026	0,024	0,066	0,057	19,191

**Tabela 1.2. Valores de densidades ópticas para o teste 2, referentes as suspensões de *Lawsonia intracellularis* em diluição seriada de 2:1, a partir da suspensão D1.**

Diluições	Cubeta 405nm	Cubeta 450nm	Microplaca 405nm	Microplaca 450nm	RT-qPCR (Ct)
D1	0,381	0,305	0,178	0,152	16,708
D2	0,182	0,147	0,120	0,102	17,392
D3	0,076	0,057	0,086	0,075	18,282
D4	0,044	0,032	0,068	0,057	19,004
D5	0,027	0,019	0,058	0,051	20,361

### Análise de regressão

Os resultados de correlação entre a DO obtida pela espectrofotometria e quantidade de bactérias determinada pela conversão do Ct obtido na RT-qPCR pela curva padrão são apresentados na **Tabela 1.3**. A análise de correlação demonstrou que independente do comprimento de onda e do tipo de recipiente utilizado para análise da amostra na espectrofotometria (microplaca ou cubeta), a correlação com os resultados de RT-qPCR foi considerada alta, com valores de  $R^2 > 0,8$  para todas as variações testadas e nível de significância com valor de  $p < 0,05$  para todas elas.

**Tabela 1.3. Resultado de correlação entre espectrofotometria e RT-qPCR, de acordo com os parâmetros avaliados de comprimento de onda e recipiente.**

Parâmetros	R <sup>2</sup>	Nível de significância (p)	Equação
RT-qPCR vs. DO em microplaca a 405nm	0,8149	0,0359	$f(x) = -7,438 \times 10^8 + 1,797 \times 10^{10} \cdot X$
RT-qPCR vs. DO em cubeta a 405nm	0,8423	0,0279	$f(x) = 3,255 \times 10^8 + 3,003 \times 10^9 \cdot X$
RT-qPCR vs. DO em microplaca a 450nm	0,82	0,0343	$f(x) = -8,006 \times 10^8 + 2,169 \times 10^{10} \cdot X$
RT-qPCR vs. DO em cubeta a 450nm	0,846	0,027	$f(x) = 3,107 \times 10^8 + 3,758 \times 10^9 \cdot X$

A partir dessa análise foi determinada a equação para conversão das DO para número de bactérias por mL, de modo de que cada uma das quatro combinações entre comprimento de onda e recipiente para espectrofotometria pode ser utilizada de acordo com a disponibilidade em cada laboratório. Apesar da pouca diferença entre os coeficientes de correlação para cada uma das variações testadas, a melhor correlação entre a DO e a quantidade de bactéria foi a correspondente a espectrofotometria digital em cubeta com o comprimento de onda de 450nm com a respectiva fórmula para a realização da contagem final de bactérias por este método:  $f(x) = 3,107 \times 10^8 + 3,758 \times 10^9 \cdot X$ . Os cálculos da quantidade de *L. intracellularis* por mL de suspensão bacteriana a partir dos valores de Ct obtidos pela reação da RT-qPCR estão nas **Tabelas 1.4 e 1.5**.

**Tabela 1.4. Resultado de transformação de Ct obtidos pela RT-qPCR para quantidade de *Lawsonia intracellularis* / mL do Teste 1, para comprimento de onda 450nm e leitura em cubeta, e equação ( $f(x) = -3,584x + 48,983$ ) de Cultivo celular.**

Amostra	Ct	Log (X=-Y-48,983/3,584)	<i>L. intracellularis</i> / mL
D1	15,706	9,285	1,93 x 10 <sup>9</sup>
D2	16,094	9,177	1,50E+ 10 <sup>9</sup>
D3	16,520	9,058	1,14E+10 <sup>9</sup>
D4	18,657	8,461	2,89E+10 <sup>8</sup>
D5	19,191	8,313	2,05E+10 <sup>8</sup>

**Tabela 1. 5. Resultado de transformação de Ct obtidos pela RT-qPCR para quantidade de *Lawsonia intracellularis* / mL do Teste 2, para espectrofotometria a 450nm e leitura em cubeta, e equação ( $f(x) = -3,584x + 48,983$ ).**

Amostra	Ct	Log (X=-Y-48,983/3,584)	<i>L. intracellularis</i> /mL.
D1	16,844	8,967	9,28E+10 <sup>8</sup>
D2	17,568	8,765	5,83E+10 <sup>8</sup>
D3	18,334	8,552	3,56E+10 <sup>8</sup>
D4	18,954	8,379	2,39E+10 <sup>8</sup>
D5	20,451	7,961	9,14E+10 <sup>7</sup>

#### **Transformação da DO para mL de suspensão bacteriana.**

Finalmente foi realizada a transformação das DOs obtidas pela espectrofotometria óptica para o número de *L. intracellularis* por mL, tanto para o teste 1 como para o teste 2, conforme apresentado nas **Tabela 1.6 e 1.7**, respectivamente. Nestas tabelas podemos observar os resultados da DO já transformados na base logarítmica, o que permite finalmente ter uma quantificação da cultura celular de forma imediata. Nas **Tabelas 1.6 e 1.7** vemos as DO com a quantificação de bactérias.

**Tabela 1.6. Resultado de transformação de densidade óptica (DO) para quantidade de *Lawsonia intracellularis* por mL do Teste 1 em cubeta com leitura espectrofotométrica a 450 nm.**

Amostra	DO	<i>L. intracellularis</i> /mL de contagem celular (CC).
D1	0,487	2,14E+09
D2	0,25	1,23E+09
D3	0,13	7,80E+08
D4	0,06	5,51E+08

D5	0,02	4,01E+08
----	------	----------

**Tabela 1.7. Resultado de transformação de DO para quantidade de *Lawsonia intracellularis* por mL do Teste 2 em cubeta com leitura espectrofotométrica a 450 nm.**

Amostra	DO	<i>L. intracellularis</i> /mL de contagem celular (C.C.)
D1	0,305	1,46E+09
D2	0,15	8,63E+08
D3	0,06	5,25E+08
D4	0,03	4,31E+08
D5	0,02	3,82E+08

## Discussão

A *L. intracellularis* por seu tipo de cultivo fastidioso em células eucariotas permissivas e em atmosfera microaerofílica específica, não permite a realização de métodos de contagem imediatos, como a contagem de unidade formadora de colônias, por exemplo. Métodos como a citometria de fluxo e a microscopia ótica são sensíveis e precisos, e têm capacidade de fazer distinção entre bactérias vivas e mortas quando os corantes apropriados são empregados (JEPRAS et al., 1997).

Contudo, estes métodos também não são factíveis para a quantificação de *L. intracellularis* em suspensão. Além de ambos requererem um tempo relativamente longo para serem executados, a citometria de fluxo requer equipamento de alto custo, e a microscopia ótica só é efetiva quando há uma fácil visualização do agente bacteriano, o que não é o caso com *L. intracellularis*. Deste modo, suspensões de *L. intracellularis* têm sido quantificadas rotineiramente pela imunocitoquímica e por RT-qPCR para sua utilização em experimentos. Contudo, como essas técnicas não fornecem um resultado imediato, o pesquisador acaba utilizando uma avaliação subjetiva da concentração bacteriana, a qual só é confirmada ou retificada após a finalização da técnica.

A espectrofotometria ótica é uma técnica utilizada para determinar a quantidade de uma substância ou elementos em solução ou suspensão em uma amostra. A realização das medições de DO não é complexa, particularmente quando realizada em leitores de placas, pois essas medições são extremamente rápidas, baratas, simples, relativamente sem interrupções, de alto rendimento e prontamente automatizadas (BEAL et al., 2020). Além disso, a espectrofotometria ótica é um método rápido, embora indireto, de estimar a concentração de bactérias em suspensão em meio líquido (BROWN, 2022).

Apesar do espectrofotômetro ser um equipamento relativamente de fácil acesso para a maioria dos laboratórios, até o momento não há registros da padronização de uma técnica de quantificação de *L. intracellularis* por densidade ótica, como já é a realidade para bactérias como *E. coli*, *Salmonella*, e alguns vírus há muito tempo (FACHINI, 2015; MIRA et al., 2022; ZHOU, et al., 2007).

Com as equações para conversão de DO em número de bactérias por mL desenvolvidas de maneira pioneira no presente estudo, passa-se a ser possível a quantificação rápida e serial de uma cultura de *L. intracellularis* em qualquer laboratório que tenha um espectrofotômetro disponível com comprimentos de onda para leitura de 405 ou 450nm, seja ele para leitura de placas ou de cubetas (JACOBSON et al., 2004; MCORIST et al., 1987).

Ao combinar a metodologia de cálculos quantitativos da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) com a leitura espectrofotométrica, têm-se a disponibilização de um método quantitativo indireto para contagem bacteriana de resultado imediato. Este é o primeiro estudo a determinar a quantificação de *L. intracellularis* em suspensão utilizando a técnica de espectrofotometria por densidade óptica, uma técnica rápida, acessível e de fácil execução, que facilitará etapas seguintes dos estudos de patogênese e outros estudos necessários com esta bactéria em laboratórios de todo o mundo. A utilização desta técnica irá favorecer a acurácia e repetibilidade para o desenvolvimento de experimentos tanto *in vitro* como *in vivo* com *L. intracellularis*.

## Conclusão

Neste trabalho foi desenvolvido pela primeira vez um método de quantificação de resultado imediato para a *L. intracellularis*, utilizando a espectrofotometria por densidade óptica correlacionada com a RT-qPCR. Este método é rápido, fácil, de alta reprodutibilidade e pouco laborioso, que pode ser usado na rotina do cultivo de *L. intracellularis* para avaliar e quantificar as bactérias no cultivo *in vitro* por pesquisadores do mundo todo.

## Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela FAPEMIG. RMCG e RLS são beneficiários de bolsas do CNPq, Brasil. MESD contou com bolsa de doutorado cedida pela CAPES. **Conflito de interesses**

Não existe conflito de interesse na condução deste estudo.

## Referências

R Core Team (2019) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Title.

BEAL, J. et al. Robust estimation of bacterial cell count from optical density. *Communications biology*, v. 3, n. 1, p. 512, 2020.

BROWN, H. L. Microbial Growth. In: REZAEI, N. (Ed.). *Encyclopedia of Infection and Immunity*. Oxford: Elsevier, 2022. p. 324–335.

DE, E. et al. Luciana Fachini da Costa. 2015.

DE PETRIS, S. Ultrastructure of the cell wall of *Escherichia coli*. Journal of Ultrastructure Research, v. 12, n. 3, p. 247–262, 1965.

FRAZER, M. L. Lawsonia intracellularis Infection in Horses: 2005-2007. Journal of Veterinary Internal Medicine, v. 22, n. 5, p. 1243–1248, 2008.

FREDLUND, J. et al. The entry of Salmonella in a distinct tight compartment revealed at high temporal and ultrastructural resolution. Cellular Microbiology, v. 20, n. 4, p. 1–13, 2018.

GABARDO, M. DE P. et al. Evaluation of the involvement of mice (*Mus musculus*) in the epidemiology of porcine proliferative enteropathy. Veterinary Microbiology, v. 205, n. April, p. 75–79, 2017.

GUEDES, R. M. C. et al. Validation of an immunoperoxidase monolayer assay as a serologic test for porcine proliferative enteropathy. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, v. 14, n. 6, p. 528–530, 2002.

GUEDES, R. M. C.; GEBHART, C. J. Onset and duration of fecal shedding, cell-mediated and humoral immune responses in pigs after challenge with a pathogenic isolate or attenuated vaccine strain of Lawsonia intracellularis. Veterinary Microbiology, v. 91, n. 2–3, p. 135–145, 2003.

JACOBSON, M. et al. Routine diagnostics of Lawsonia intracellularis performed by PCR, serological and postmortem examination, with special emphasis on sample preparation methods for PCR. Veterinary Microbiology, v. 102, n. 3–4, p. 189–201, 2004.

JEPRAS, R. I. et al. Rapid assessment of antibiotic effects on Escherichia coli by bis-(1, 3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol and flow cytometry. Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 41, n. 9, p. 2001–2005, 1997.

LAWSON, G. H. K. et al. Intracellular bacteria of porcine proliferative enteropathy: Cultivation and maintenance in vitro. Journal of Clinical Microbiology, v. 31, n. 5, p. 1136–1142, 1993.

McORIST, S. et al. Monoclonal antibodies to intracellular campylobacter-like organisms of the porcine proliferative enteropathies. The Veterinary record, v. 121, n. 18, p. 421–422, out. 1987.

McORIST, S. et al. Developed and resolving lesions in porcine proliferative enteropathy: Possible pathogenetic mechanisms. Journal of Comparative Pathology, v. 115, n. 1, p. 35–45, 1996.

NATHUES, H.; HOLTHAUS, K.; GROSSE BEILAGE, E. Quantification of Lawsonia intracellularis in porcine faeces by real-time PCR. Journal of Applied Microbiology, v. 107, n. 6, p. 2009–2016, 2009.

PEREIRA, C. E. R. et al. Survival of Lawsonia intracellularis in porcine peripheral blood monocyte-derived macrophages. PloS one, v. 15, n. 7, p. e0236887, 2020.

RESENDE, T. P. et al. Effects of *Lawsonia intracellularis* infection in the proliferation of different mammalian cell lines. *Veterinary microbiology*, v. 228, p. 157–164, jan. 2019.

SAMPIERI, F. et al. Species-specificity of equine and porcine *Lawsonia intracellularis* isolates in laboratory animals. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire*, v. 77, n. 4, p. 261–272, out. 2013.

VANNUCCI, F. A.; WATTANAPHANSAK, S.; GEBHART, C. J. An alternative method for cultivation of *Lawsonia intracellularis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011.

ZHOU, Q.; QI, Y. P.; YANG, F. Application of spectrophotometry to evaluate the concentration of purified White Spot Syndrome Virus. *Journal of Virological Methods*, v. 146, n. 1–2, p. 288–292, 2007.

## Capítulo 2 – Avaliação *in-silico* de genes de *Lawsonia intracellularis* ortólogos a genes associados a patogênese em outros enteropatógenos

Mirtha E. Suarez-Duarte<sup>1</sup>; Renato de Lima Santos<sup>1</sup>; Talita P. Resende<sup>3</sup>; Carlos E. R. Pereira<sup>2</sup>; Jessica C. R. Barbosa<sup>1</sup>; Paula A. Correia<sup>1</sup>; Matheus D. Araujo<sup>1</sup>; Flavia Aburjaile<sup>1</sup>; Diego Neres<sup>1</sup>; Roberto M. C. Guedes<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Department of Clinic and Surgery, Veterinary School, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil; <sup>2</sup>Departament of Veterinary, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brazil;

<sup>3</sup>Department of Veterinary, Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil;

E-mail: [guedesufmg@gmail.com](mailto:guedesufmg@gmail.com)

### Resumo

A enteropatia proliferativa é uma doença entérica causada pela bactéria *Lawsonia intracellularis*, que afeta diversas espécies de animais domésticos e silvestres. Métodos de genômica comparativa para a pesquisa de genes ortólogo a genes sabidamente associados a patogênese em espécies permitem a identificação de genes potencialmente envolvidos em patogênese pelo patógeno de interesse. A grande maioria dos mecanismos moleculares subjacentes à patogenicidade ainda são poucos compreendidos na *L. intracellularis*. O objetivo deste estudo foi realizar pesquisas *in silico* de genes de *L. intracellularis* ortólogos a genes necessários para invasão e sobrevivência intracelular presentes em outras bactérias patogênicas, particularmente: *Brucella abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, *Salmonella*, *Yersinia pestis*, *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*. Um total de 127 genes, associados a invasão e à sobrevivência intracelular, de cinco enteropatógenos já conhecidos foram mapeados contra os proteomas preditos de todas as linhagens de *L. intracellularis* disponíveis de forma pública na plataforma GenBank, utilizando o programa OrthoFinder. Um total de 45 genes do genoma de *L. intracellularis* ortólogos à genes associados a patogêneses de outros enteropatógenos foram encontrados. Assim, foram detectados genes ortólogos a genes com importância na transdução de sinal de quimiotaxia, de motilidade celular, genes de importância na ligação e reparo do DNA, alguns auxiliando na associação de bactérias com macrófagos ou induzindo respostas pró-inflamatórias. Os achados deste estudo fornecem novos genes alvo a serem mais bem estudados, uma vez que, por homologia, tais genes podem estar envolvidos na virulência e patogenicidade de *L. intracellularis*.

**Palavras- chave:** enteropatia proliferativa, genoma, expressão genica, patogênese, virulência.



## Introdução

A *Lawsonia intracellularis* é o agente etiológico da enteropatia proliferativa, uma doença entérica caracterizada pelo espessamento da mucosa intestinal em consequência da hiperplasia de células intestinais epiteliais, acometendo diversas espécies animais, principalmente suínos (McORIST et al., 1995).

Desde 1974, *L. intracellularis* tem sido associada à hiperplasia epitelial em intestinos infectados (ROWLAND e LAWSON, 1974). Contudo, as designações iniciais da bactéria foram de *Campylobacter like-organism*, *Ileal symbiont intracellularis* e *Ileobacter intracellularis* (McORIST et al., 1995). Somente em 1993 essa bactéria foi formalmente classificada como membro da subdivisão delta de *Proteobacteria*, pertencente à família *Desulfovibrionaceae*, sendo o único membro do gênero *Lawsonia*.

Baseado em estudos das sequências de DNA do gene ribossômico 16S e do operon *groE*, *L. intracellularis* pode ser classificada taxonomicamente de maneira diferente em relação a outros patógenos intracelulares, como as famílias *Rickettsiae* e *Chlamydiae*. *Desulfovibrio desulfuricans*, uma bactéria redutora de sulfato, é a espécie de bactéria geneticamente mais próxima à *L. intracellularis*, com somente 91% de similaridade genética (LAWSON et al., 1993).

Morfologicamente, *L. intracellularis* apresenta forma sigmoide, estrutura da parede celular com envelope trilaminar externo, flagelo único e móvel, com um comprimento aproximado de 1,25 a 1,75 µm e 0,25 a 0,43 µm de largura (LAWSON et al., 2000). Em uma análise de sequência do DNA ribossômico 16S (rDNA) de isolados da bactéria originários de diferentes espécies animais, foi observado que não existe diferença entre elas, o que caracterizou *L. intracellularis* como o agente etiológico da doença em todas as espécies acometidas (BENGTSSON et al., 2020; COOPER et al., 1997; LEVY et al., 2015).

O genoma completo da cepa PHE/MN1-00 de *L. intracellularis*, foi sequenciado e anotado no GenBank (acesso: locus AM180252), bioprojeto PRJNA183, e conta com um total de 1.719.014 pares de bases distribuídos em um cromossomo de 1,4 Mb e três plasmídeos de 27, 39 e 194 kbp. A ausência de potenciais genes codificadores de fatores de virulência identificados por análise comparativa de sequências e proteínas hipotéticas sugerem que esse organismo adotou mecanismos de sobrevivência e patogênese que são únicos entre os patógenos bacterianos (KAUR K et al., 2005). Em estudo de análise comparativa de *L. intracellularis*, denominada N343, com outras cepas desta bactéria consideradas patogênicas, revelou os mesmos cromossomos e plasmídeos identificados anteriormente em suínos, revelando diferenças genéticas restritas (SAIT et al., 2013).

Vannucci et. al. (2013) mostraram a atenuação das propriedades de virulência de *L. intracellularis* entre 20 e 40 passagens celulares *in vitro*, porém sem conhecimento do mecanismo molecular responsável por este fenótipo. Esta perda de propriedades patogênicas de *L. intracellularis* poderia estar associada à sua adaptação a condições *in vitro* (VANNUCCI et al., 2013).

Estudos de sequências múltiplas de VNTR (*variable number of tandem repeats*) no genoma de *L. intracellularis*, importantes na identificação de diferentes cepas da bactéria obtidas à campo, mostraram genótipos idênticos em variantes patogênicas de baixa passagem e atenuadas de alta passagem (OLIVEIRA., 2008).

É sabido que vários enteropatógenos intracelulares utilizam ou compartilham alguns mecanismos genéticos que contribuem com funções essenciais para a patogenicidade, como invasão celular, aumento ou diminuição da apoptose, sobrevivência intracelular e supressão de defesas inatas (J WORLEY, 2023). Entre esses mecanismos genéticos está o sistema de secreção tipo III (T3SS), um complexo de proteínas responsável pela translocação de proteínas bacterianas efetoras para o citoplasma da célula hospedeira.

O T3SS tem estrutura complexa composta por várias subunidades, que por sua vez são compostas por aproximadamente 20 proteínas bacterianas, suas proteínas estruturais compõem o aparelho T3SS, as proteínas chamadas translocadoras têm a função de translocar outro conjunto de proteínas para o citoplasma da célula hospedeira, já as proteínas translocadas são denominadas efetoras, pois são os fatores de virulência que efetuam as alterações nas células hospedeiras, permitindo que o patógeno invada, colonize, multiplique e, em alguns casos, persista cronicamente no hospedeiro (GHOSH, 2004), estes componentes estão presentes em bactérias como *Shigella*, *Salmonella* e *Yersinia* (COBURN et al., 2007; CORNELIS, 2006; ESPINOSA e ALFANO, 2004) e também já teve sua expressão demonstrada pela *L. intracellularis* durante a infecção *in vitro* e em amostras de tecidos infectadas com *L. intracellularis* (ALBERDI et al., 2009).

Além da descrição da expressão deste componente ATPase do T3SS, no primeiro relato do perfil transcricional de *L. intracellularis*, no qual foi realizado uma comparação dos níveis de expressão gênica de isolados homólogos patogênico e atenuado, foram observados altos níveis de expressão de genes que codificam transportadores ABC e reguladores transcricionais específicos, identificados exclusivamente na variante patogênica (VANNUCCI et al., 2012). Estes resultados sugerem uma adaptação metabólica específica de *L. intracellularis*, incluindo a aquisição de substrato que permite sua proliferação eficiente no hospedeiro infectado (VANNUCCI et al., 2012).

Para conseguir uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à patogenicidade, acredita-se que possam existir genes ortólogos em bactérias enteroinvasivas e ainda não descritos em *L. intracellularis* que poderiam desempenhar papel significativo em sua patogenicidade. Conseqüentemente, foi postulado que as bactérias *Brucella abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium* subespecie *paratuberculosis*, *Salmonella enterica* Typhimurium, *Yersinia pestis*, *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*. poderiam apresentar mecanismos similares no processo de infecção quando comparados à *L. intracellularis*, necessários nos estágios de adesão e invasão da célula hospedeira, assim como sua sobrevivência intracelular, multiplicação intracelular e posterior proliferação extracelular.

Assim, os objetivos do presente estudo foram verificar, *in silico*, a ocorrência em *L. intracellularis* de genes ortólogos, aqueles necessários na invasão e sobrevivência intracelular, das cinco bactérias patogênicas mencionadas em relação ao genoma de *L. intracellularis*. Além dessa análise, foram realizadas comparações de expressão destes genes em cepas patogênica e não-patogênica de *L. intracellularis*, descrita anteriormente no perfil transcricional de Vannucci et al (2012).

## Material e Métodos

### Comparação de genomas de *Lawsonia intracellularis* no GenBank

A partir de acesso ao GenBank, foram obtidos todos os genomas de *L. intracellularis* disponíveis na plataforma NCBI (PRUITT et al., 2007) até o dia 27 de outubro de 2022. Os genomas foram obtidos em formato FASTA e, posteriormente, anotados utilizando o pipeline PROKKA (SEEMANN, 2014) com todos os parâmetros mínimos por *default*. Em seguida, os genomas foram comparados entre si para a verificação do grau de similaridade entre eles. Para isso, foi utilizado o programa pyANI (PRITCHARD et al., 2015) para o desenvolvimento da análise de identidade média de nucleotídeos e avaliação global de similaridade. A análise por mapa de calor (*heatmap*) foi realizada para mostrar a porcentagem de similaridade entre os genomas anotados utilizando o Software Heat Map.

### Seleção de genes para comparação

A partir de uma ampla revisão de literatura, foram selecionados todos os genes descritos como importantes para invasão celular e sobrevivência intracelular das bactérias *Brucella abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium* subespécie *paratuberculosis*, *Salmonella enterica* Typhimurium, *Yersinia pestis*, *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*. Esses genes foram procurados no sistema UniProt (Universal Protein), que é uma extensa base de dados de sequências de proteínas e as suas funções, onde foram analisadas as funções biológicas destes genes. Os genes selecionados para cada bactéria são listados na **Tabela Suplementar 2.1 e 2.2**.

### Comparação de genes ortólogos *in silico*

Para a análise *in silico* de genes ortólogos de enteropatógenos envolvidos no processo de invasão celular de *L. intracellularis* foi realizado um enriquecimento da via de interesse nas bactérias estudadas. Para isso, foi criado um banco de dados *ad hoc* baseado em genes codificadores de proteínas conhecidamente envolvidas em processos de invasão celular das espécies bacterianas enteropatógenas selecionadas. Esses genes alvo foram prospectados de artigos buscados sistematicamente em bancos de dados públicos. As sequências dos genes foram manualmente extraídas do banco de dados UniProt (“UNIPROT: THE UNIVERSAL PROTEIN KNOWLEDGEBASE IN 2021.”, 2021) em formato *multifasta*, sendo priorizadas sequências encontradas nas espécies relevantes para o trabalho. O banco de dados formado foi mapeado contra os proteomas preditos de nove linhagens de *L. intracellularis* disponíveis de forma pública na plataforma NCBI (PRUITT et al., 2007).

Visando determinar a possível relação de ortologia entre os genes disponíveis no banco de dados *ad hoc* e os proteomas das linhagens de *L. intracellularis*, foi utilizado o programa OrthoFinder (EMMS e KELLY, 2019) que realiza múltiplas comparações entre o conteúdo biológico das linhagens adicionadas ao *dataset* inicial e a informação disponível no banco de dados formado e prediz a relação evolutiva genética com base em alinhamentos e estatísticas de clusterização por similaridade. O critério utilizado para inferir ortologia foi um e-value inferior à  $5e^{-06}$  (% de alinhamento ser ao acaso) (EMMS e KELLY, 2019). Os resultados obtidos foram analisados e a função dos genes ortólogos presentes em cada linhagem foi averiguada com base em informações disponíveis na literatura científica.

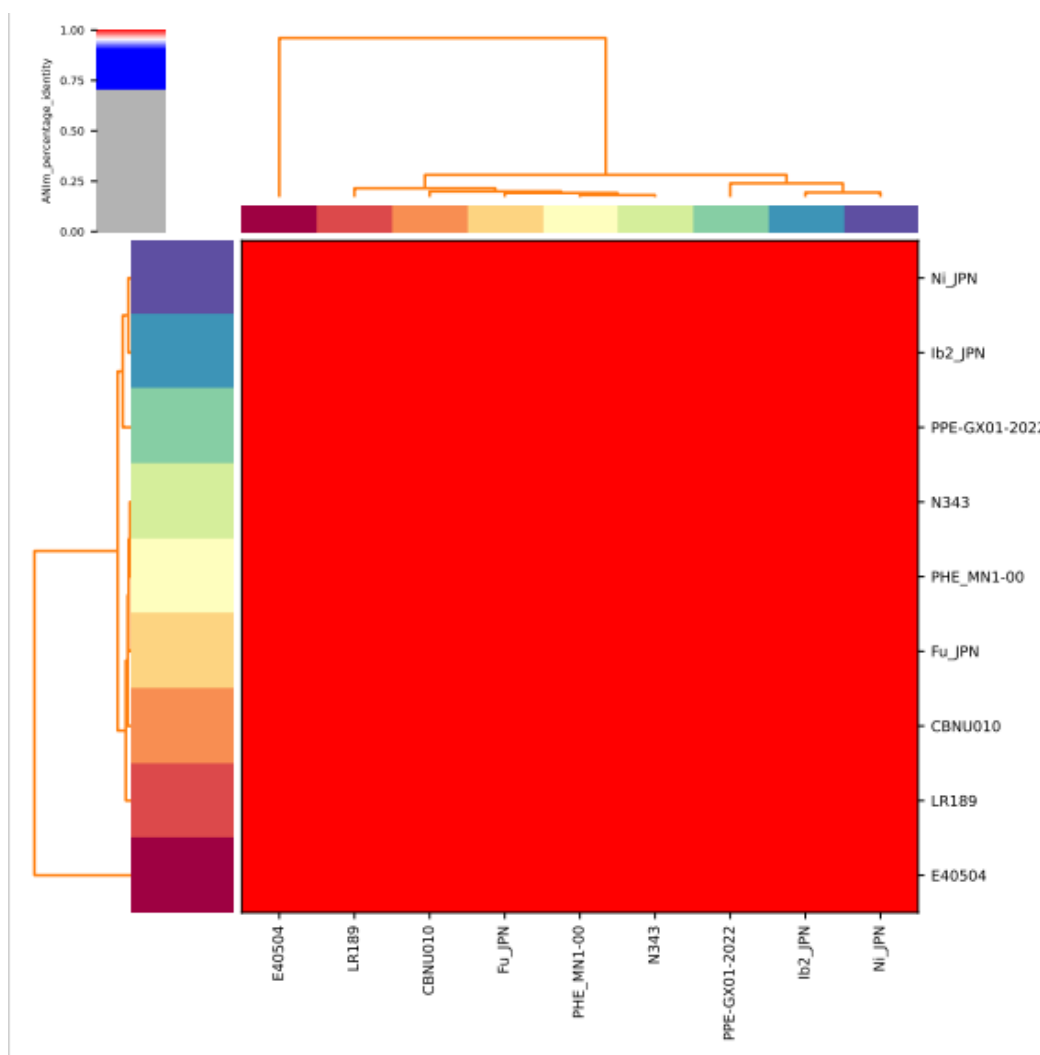
## Avaliação de genes expressos

Para avaliação dos genes ortólogos observadas *in-silico* neste trabalho, e comparar com aqueles genes expressos pela *L. intracellularis*, foram utilizados os dados publicados em artigo sobre o perfil transcricional de duas cepas de *L. intracellularis*, uma de 10 passagem considerada como cepa patogênica, e outra cepa acima de 60 passagem, considerada como não-patogênica ou atenuada durante infecção *in vitro* (VANNUCCI et al., 2012).

## Resultados

### Comparação de genomas de *L. intracellularis* no GenBank

Foram encontradas 10 anotações para o genoma de *L. intracellularis* no GenBank, porém uma das anotações não permitia o acesso a seus dados. Portanto, foram utilizados nove genomas para as análises posteriores, sendo os genomas PHE\_MN1-00(USA), N343(USA) e PPE-GX01-2022(China) com anotações completas e seis de anotações parciais: Ib2\_JPN(Japão), E40504(equino-USA), CBNU010(Coreia), Ni\_JPN(Japão), LR189(Reino unido), Fu\_JPN(Japão). Mesmo considerando os genomas incompletos, foi observada altíssima porcentagem de similaridade entre eles, ao ponto de serem consideradas clonais (**Tabela Suplementar 1- Figura 2.1**).



**Figura 2.1.** Mapa de calor (*heatmap*) da análise realizada para mostrar a porcentagem de

similaridade, demonstrando altíssima similaridade entre os genomas anotados de *Lawsonia intracellularis*.

### **Resultados dos genes de *Lawsonia intracellularis* ortólogos a outros genes associados a patogenicidade em outros enteropatógenos**

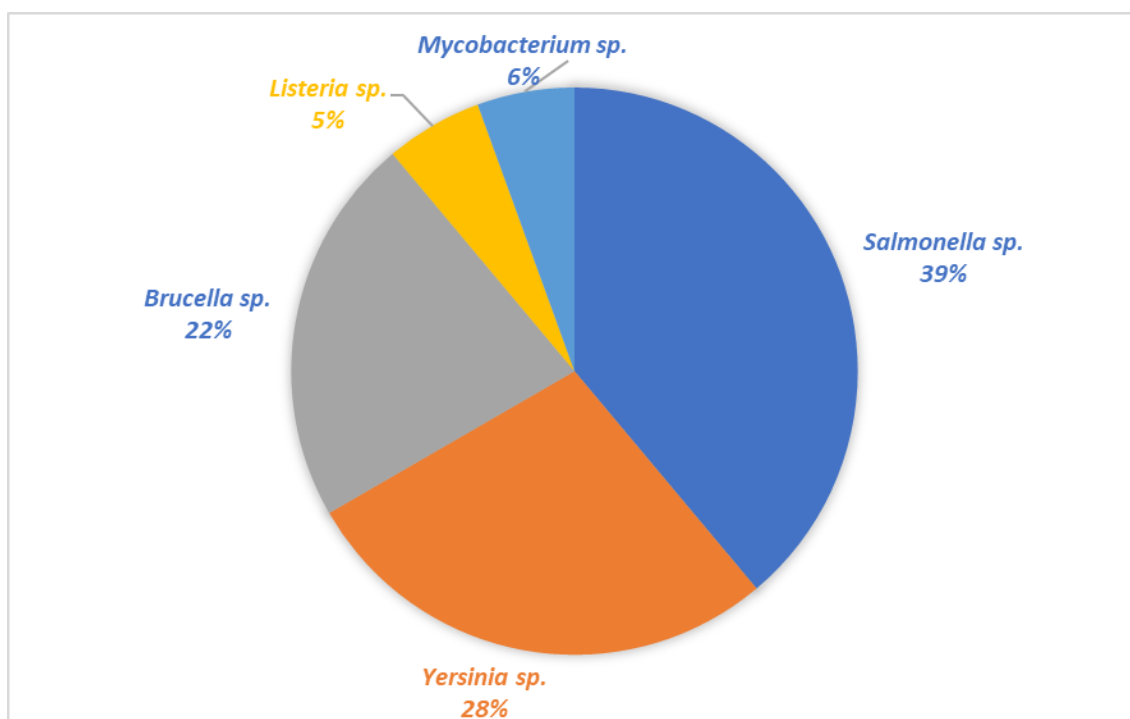
Dada a altíssima similaridade entre os genomas de *L. intracellularis* anotados no sistema, foram escolhidos apenas dois genomas de anotação completa (PHE\_MN1-00 e N343) e um genoma de anotação parcial (E40504) para a procura dos genes ortólogos. Considerando estes três genomas, foram encontrados os mesmos genes ortólogos a genes de patogenicidade de diferentes enteropatógenos em todos eles, de modo que o genoma identificado como PHE\_MN1-00 passou a ser o único genoma utilizado nas análises posteriores.

Para genes caracterizados como importantes na invasão das bactérias, 52 genes foram submetidos à avaliação. Destes 52 genes, 18 foram identificados no genoma PHE\_MN1-00-00, sendo sete genes ortólogos com *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, cinco genes ortólogos com as espécies de *Yersinia, sp*, quatro genes ortólogos com *Brucella sp.*, um gene ortólogo com *L. monocytogenes* e um gene ortólogo com *Mycobacterium sp*. Três genes foram encontrados em mais de uma bactéria (**Tabela 2.1**). Genes ortólogos de invasão e suas funções são apresentados na **Tabela suplementar 2.3**.

Do total de genes ortólogos de invasão, 39% dos genes identificados em *L. intracellularis* (PHE\_MN1-00) foram ortólogos a *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, enquanto *Mycobacterium sp* e *Listeria monocytogenes* tiveram menor proporção de ortologia, com 5 % e 6% de genes ortólogos, respectivamente (**Figura 2.2**).

**Tabela 2.1.** Bactérias e respectivos genes ortólogos em diferentes enteropatógenos encontrados na análise de ocorrência de genes de invasão de *Lawsonia intracellularis*.

Locus_tag	Bactéria	Gene	Nome da proteína
PHE_MN1-00_00947	<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>sctN1 (invC, spaI, spaL)</i>	SPI-1 ATPase do sistema de secreção tipo 3
PHE_MN1-00_00595	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> . Sorotipo I. <i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>sctN (yscN)</i>	ATPase do sistema de secreção tipo 3
PHE_MN1-00_00605	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>lcd</i>	Proteína D do locus de baixa resposta ao cálcio
PHE_MN1-00_00585	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>flhA</i>	Proteína de biossíntese flagelar FlhA
PHE_MN1-00_01288 PHE_MN1-00_00596	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> . Sorotipo I	<i>sctL (lcrKC, yscL)</i>	Proteína do estator do sistema de secreção tipo 3
PHE_MN1-00_01265	<i>Brucella abortus</i>	<i>bvrR</i>	Regulador transcricional flagelar FtcR
PHE_MN1-00_00693	<i>Mycobacterium avium</i> sub <i>paratuberculosis</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	<i>groEL1,2 (groL2, hsp65, mopA).</i> Chaperonina GroEL 2	Chaperonina GroEL 1,2
PHE_MN1-00_01294	<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>cheW</i>	Quimiotaxia Proteína CheW
PHE_MN1-00_00296	<i>Brucella melitensis</i> . <i>Listeria monocytogenes</i> sorovar 1/2a	<i>rho</i>	Fator de terminação de transcrição Rho
PHE_MN1-00_00828	<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>flgK (flaS, flaW)</i>	Proteína flagelar associada ao gancho 1
PHE_MN1-00_00510	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>yadB (gluQ) (não revisada)</i>	Glutamyl-Q tRNA(Asp) sintetase
PHE_MN1-00_00430	<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>rsep (yaeL)</i>	Regulador da protease sigma-E RseP
PHE_MN1-00_00972	<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>phoQ (phoZ)</i>	Sensor de virulência histidina quinase PhoQ
PHE_MN1-00_01197	<i>Brucella abortus</i>	<i>bvrS (não revisada)</i>	Histidina quinase
PHE_MN1-00_01283	<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>sctC2 (spiA, ssaC)</i>	Secretina do sistema de secreção SPI-2 tipo 3



**Figura 2.2.** Proporção de genes ortólogos de invasão comuns entre espécies de bactérias intracelulares com a *L. intracellularis* PHE\_MN1-00.

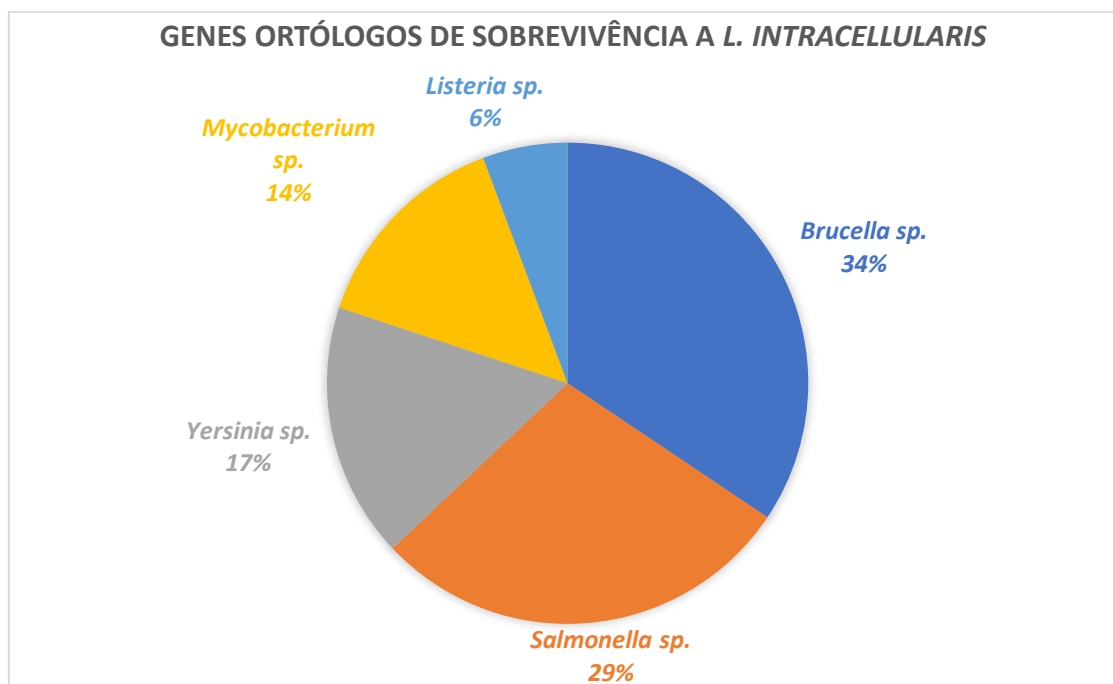
Já para os genes caracterizados importantes na sobrevivência intracelular, foram avaliados 75 genes, dos quais um total de 27 genes foram ortólogos à PHE\_MN1-00. Destes, 14 genes estavam repetidos em mais de uma bactéria. Assim, foram observados 12 genes ortólogos com as espécies de *Brucella sp.*, 10 genes ortólogos com *Salmonella* Typhimurium, cinco genes ortólogos com *Mycobacterium sp.*, seis com *Yersinia sp.* e dois com *L. monocytogenes* (**Tabela 2.2**). Genes ortólogos entre as bactérias relacionados à sobrevivência e suas funções são apresentados na **Tabela suplementar 2.4**.

**Tabela 2.2. Bactérias e respectivos genes ortólogos de sobrevivência intracelular encontrados na *L. intracellularis*.**

<b>Locus_tag.</b>	<b>Bactéria</b>	<b>Gene</b>	<b>Nome da Proteína</b>
PHE_MN1-00_01458 PHE_MN1-00_00396	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> . <i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>dnaB</i>	Helicase de DNA replicativo
PHE_MN1-00_00545	<i>Yersinia pestis</i> , <i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>Brucella abortus</i> , <i>Brucella suis</i> biovar 1. <i>Brucella melitensis</i> biotipo 1	<i>ssb</i>	Proteína de ligação ao DNA de fita simples
PHE_MN1-00_00974	<i>Salmonella</i> Typhimurium. <i>Yersinia</i> <i>pseudotuberculosis</i> serotype I	<i>sfsA</i>	Proteína A de estimulação da fermentação do açúcar
PHE_MN1-00_00191	<i>Brucella melitensis</i> biotipo 1. <i>Brucella abortus</i> . <i>Brucella suis</i> biovar 1	<i>rsh</i>	GTP pirofosfoquinase rsh
PHE_MN1-00_00172	<i>Brucella suis</i> biovar 1. <i>Brucella</i> <i>abortus</i> . <i>Brucella melitensis</i> biotipo 1 <i>Yersinia enterocolitica</i> . <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . <i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>ribH</i>	6,7-dimetil-8-ribitilumazina sintase 2
PHE_MN1-00_00339	<i>Salmonella</i> Typhimurium. <i>Brucella</i> <i>melitensis</i> biotipo 1 <i>Yersinia</i> <i>pseudotuberculosis</i> . <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . <i>Listeria monocytogenes</i>	<i>recO</i>	Proteína de reparo do DNA RecO
PHE_MN1-00_00988	<i>Salmonella</i> Typhimurium. <i>Brucella</i> <i>melitensis</i> biotipo 1	<i>lnt (cutE)</i>	Apolipoproteína N-aciltransferase
PHE_MN1-00_00378	<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>livH</i>	Proteína permease do sistema de transporte de aminoácidos de cadeia ramificada de alta afinidade
PHE_MN1-00_01265	<i>Brucella abortus</i>	<i>ctrA</i>	Regulador de resposta do ciclo celular CtrA
PHE_MN1-00_01068	<i>Yersinia enterocolitica</i> . <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . <i>Brucella melitensis</i>	<i>rplW</i>	Proteína ribossômica 50S L23
PHE_MN1-00_01312	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>eccA1</i>	Proteína do sistema de secreção ESX-1 EccA1
PHE_MN1-00_00581	<i>Brucella abortus</i>	<i>cpdR</i>	Proteína receptora reguladora de resposta CpdR
PHE_MN1-00_00498	<i>Brucella melitensis</i> biotipo 1	<i>pyrG</i>	CTP sintase
PHE_MN1-00_00072	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>eccCa1</i> ( <i>snm1</i> )	Proteína do sistema de secreção ESX-1 EccCa1
PHE_MN1-00_00278	<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>hypA</i>	Fator de maturação da hidrogenase HypA
PHE_MN1-00_01140	<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>epmA</i> ( <i>genX</i> , <i>yjeA</i> )	Fator de alongamento P--(R)-beta- lisina ligase
PHE_MN1-00_01197	<i>Brucella abortus</i>	<i>ccA</i>	Sensor quinase CckA
PHE_MN1-00_00036	<i>Brucella abortus</i> biovar 1. <i>Brucella</i> <i>melitensis</i> biotipo 1 <i>Yersinia pestis</i>	<i>fur</i>	Proteína reguladora da captação férrica
PHE_MN1-00_01306	<i>Brucella abortus</i>	<i>recA</i>	Proteína RecA
PHE_MN1-00_00504	<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>rpoN</i>	RNA polimerase fator sigma-54



Assim, do total de genes ortólogos de sobrevivência intracelular, *Brucella sp.* apresentou a maior porcentagem de ortologia em reação à PHE\_MN1-00 (34 %) e *L. monocytogenes* a menor porcentagem (6%), como ilustrado na **Figura 2.3**.



**Figura 2.3.** Proporção de genes ortólogos de sobrevivência comuns entre espécies de bactérias intracelulares com a *L. intracellularis* PHE-MN-00.

### Resultados de comparação de genes ortólogos observados em outros enteropatógenos relacionados a genes expressos em cepas patogênicas e não patogênicas da *Lawsonia intracellularis*

A partir dos dados publicados no artigo de Vannucci et al (2012), foi realizada a comparação de genes ortólogos associados a patogênese em outros enteropatógenos e observados na *L. intracellularis* com genes que foram expressos ou não em *L. intracellularis* patogênica e *L. intracellularis* atenuada. Quando comparados os genes ortólogos de invasão e os genes expressos pelas cepas patogênica e não patogênica, foi identificado um gene ortólogo expresso na *L. intracellularis* patogênica, dois genes ortólogos expressos na *L. intracellularis* atenuada, e um gene expresso em ambas as variantes. O gene ortólogo expresso em *L. intracellularis* patogênica corresponde ao gene *cheW*, que codifica uma proteína de transdução de sinal de quimiotaxia, envolvida na transmissão de sinais sensoriais dos quimiorreceptores para os motores flagelares. Este gene está presente na *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium.

Dois genes ortólogos foram observados em *L. intracellularis* não-patogênica: *sctN* (*yscN*) e o gene *flgK*. O gene *sctN* codifica um sistema de secreção *yscN* tipo III ATPase. Este componente, também chamado de injetossomo, é usado para injetar proteínas efetoras bacterianas em células hospedeiras eucarióticas e é descrito em *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium e *Yersinia sp.* O gene *flgK*, que codifica uma proteína associada ao gancho flagelar e funciona ajudando na motilidade celular, foi observado em *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium.

Por último, foi observado que o gene *groEL* foi altamente expresso pelas variantes patogênica e atenuada de *L. intracellularis*. Este gene codifica proteínas que ajudam a aderência a outras proteínas e estão envolvidos na associação de bactérias com macrófagos, além de atuarem como uma adesina, ligando-se ao CD43 na superfície do macrófago hospedeiro. Estes genes são observados em *Mycobacterium tuberculosis* (Tabela 2.3).

**Tabela 2.3. Comparação de genes ortólogos de invasão a genes expressos em cepas de *Lawsonia intracellularis* patogênica e não-patogênica.**

Locus_tag.	Genes ortólogos	Genes expressos em <i>L. intracellularis</i> patogênicas	Genes expressos em <i>L. intracellularis</i> não patogênicas
PHE_MN1-00_01294	<i>cheW</i>	cheW chemotaxis signal transduction protein	—
PHE_MN1-00_00595	<i>sctN (yscN)</i>	—	<i>yscN</i> type III secretion system ATPase
PHE_MN1-00_00828	<i>flgK (flaS, flaW)</i>	—	<i>flgK</i> flagellar hook-associated protein
PHE_MN1-00_00693	<i>groEL1 e 2 (groL2, hsp65, mopA).</i>	<i>GroEL</i> (Chaperonina)	<i>GroEL</i> (Chaperonina)

Para genes ortólogos de sobrevivência intracelular foram encontrados oito genes expressos em alto nível no cromossoma de *L. intracellularis* patogênica, sendo que nenhum deles foi expresso em *L. intracellularis* não-patogênica. Os genes observados foram *ribH*, *livH*, *rplW*, *hypA*, *sfsA*, *recO*, *fur*, *rpoN*, sendo considerados genes importantes como transportadores ABC de aminoácidos, além de serem proteínas importantes na ligação e reparo do DNA, ou agirem na regulação do ferro e zinco, importantes na oxido redução (Tabela 2.4).

**Tabela 2.4. Comparação de genes ortólogos de sobrevivência intracelular a genes expressos em cepas de *Lawsonia intracellularis* patogênica e não-patogênica.**

Locus_tag.	Genes ortólogos	Genes expressos em <i>L. intracellularis</i> patogênica	Genes expressos em <i>L. intracellularis</i> não-patogênica
PHE_MN1-00_00172	<i>ribH</i>	ribH riboflavin synthase beta-chain	—
PHE_MN1-00_00378	<i>livH</i>	livH branched chain amino acid ABC transporter (permease)	—
PHE_MN1-00_01068	<i>rplW</i>	rplW. 50S ribosomal protein L23	—
PHE_MN1-00_00278	<i>hypA</i>	hypA zinc finger protein	—
PHE_MN1-00_00974	<i>sfsA</i>	sfsA DNA-binding protein, stimulates sugar fermentation	—
PHE_MN1-00_00339	<i>recO</i>	recO DNA repair protein RecO (recombination protein O)	—
PHE_MN1-00_00036	<i>fur</i>	fur Fe <sup>2+</sup> /Zn <sup>2+</sup> uptake regulation proteins	—
PHE_MN1-00_00504	<i>rpoN</i>	rpoN Sigma54-like protein	—

## Discussão

Pelas suas condições específicas de crescimento *in vitro* e principalmente pela sua natureza intracelular, muitos estudos são profundamente afetados e limitam o entendimento sobre algumas características e funções de *L. intracellularis* em relação a sua patogênese molecular. Neste estudo de análise *in silico* foram avaliados a presença de genes ortólogos à *L. intracellularis* envolvidos na invasão e sobrevivência celular de bactérias enteroinvasivas importantes, várias das quais já possuem genes com funcionalidade amplamente demonstrada. As bactérias alvo do presente estudo foram *Brucella abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium* subespecie *paratuberculosis*, *Salmonella entérica* sorovar Typhimurium, *Yersinia pestis*, *Y. enterocolitica*, e *Y. pseudotuberculosis*, bactérias que já tem mostrado os diferentes mecanismos moleculares utilizados para invadir a célula e poder sobreviver nela.

Foram analisadas primeiramente todas as sequências do genoma de *L. intracellularis* depositadas no NCBI, onde consta um total de 10 genomas anotados, porém com apenas nove de acesso permitido. Destes, três foram genomas com anotação completa, e seis genomas de anotação parcial. Comparando-se esses nove genomas disponíveis, foi observada altíssima porcentagem de similaridade, ao ponto de serem considerados clonais, conforme já constatado anteriormente por Bengtson et al. (2020). Neste referido estudo, foi realizado um sequenciamento metagenômico de amostras clínicas, onde a análises genômicas e filogenéticas comparativas da estrutura populacional de *L. intracellularis* revelaram um clone geneticamente monomórfico responsável por infecções em suínos e subtipos distintos associados a infecções em equinos (BENGTSSON et al., 2020).

A partir desses dados, todos os genes de interesse, tanto de invasão como de sobrevivência, foram anotados em um banco de dados formado, e foi mapeado contra os proteomas preditos das nove linhagens de *L. intracellularis* disponíveis de forma pública na plataforma NCBI (PRUITT et al., 2007), visando determinar a possível relação de ortologia entre os genes disponíveis no banco de dados *ad hoc* e os proteomas das linhagens de *L. intracellularis*.

Como resultado foram encontrados 18 genes ortólogos de invasão, de um total de 52 genes submetidos à avaliação. Entre os genes destacáveis, mencionamos o gene *sctN1* (*sctN yscN*) presente tanto em *S. enterica* Typhimurium como em *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*, fazendo ortologia com *L. intracellularis*. Este gene é componente ATPase do sistema de secreção tipo III (*T3SS*), chamado de injetossomo, que é usado para injetar proteínas efetoras bacterianas nas células hospedeiras, o que favorece a alteração de vários processos celulares. A expressão deste gene foi demonstrada pela primeira vez por Alberdi et al., (2009), onde detectaram que os componentes *T3SS* de *L. intracellularis* são expressos durante a infecção. Por analogia com outras bactérias, pode-se inferir que o *T3SS* tem uma função crucial para o desenvolvimento intracelular, sendo plausível um papel significativo na virulência deste patógeno incomum (ALBERDI et al., 2009).

Também foi encontrado ortologia dos genes *flgK* (*flaS*, *flaW*) e *flhA*, ambos necessários para a formação da estrutura da haste do aparelho flagelar. Esses genes constituem parte do aparelho de exportação de flagelina, importante na motilidade celular, como observado em *S. enterica* sorovar Typhimurium, que expressa essa proteína

no compartimento ligado à membrana. A flagelina é translocada para o citoplasma da célula hospedeira, onde é detectada por receptores citosólicos que são capazes de montar uma resposta imune inata (HOMMA et al., 1990; INOUE et al., 2021; MINAMINO et al., 1994). Na *L. intracellularis* a presença de flagelo unipolar já foi demonstrada extracelularmente em organismos cultivados, porém não existem mais estudos sobre sua funcionalidade na infecção (GEBHART e LAWSON, 2000). Contudo, a expressão deste gene foi observada tanto para cepa patogênica quanto na estirpe atenuada de *L. intracellularis* (VANNUCCI et al., 2012). Assim sendo, ainda que este possa ser um gene relacionado à virulência da cepa, hipotetizamos que não é a ausência ou a presença dele que determina a capacidade de *L. intracellularis* causar a enteropatia proliferativa.

O gene *cheW*, presente no genoma de *L. intracellularis*, de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium e de *E. coli*, codifica uma proteína de acoplamento receptor-quinase, denominada Chew. Esta proteína está envolvida na transmissão de sinais sensoriais dos quimiorreceptores bacterianos para os motores flagelares, de modo que estes sistemas de sinalização quimiotática permitam que bactérias rastreiem gradientes químicos favoráveis em seu ambiente (HAZELBAUER et al., 2008; STOCK et al., 1987). Este gene pelas suas funções, poderia favorecer a *L. intracellularis*, para rastrear os gradientes de quimioefectores tanto atrativos como repelente e de se mover em direção a ambientes ideais para sua invasão.

Um gene ortólogo interessante observado no genoma de *L. intracellularis* foi o *bvrR*, presente em *B. abortus*. Este gene que faz parte de um sistema regulatório de dois componentes, controla a invasão celular e a sobrevivência intracelular, desempenhando um papel no controle da superfície bacteriana e nas interações com a célula hospedeira, sendo conclusivamente implicado na virulência da *Brucella*.

Estudos demonstraram que mutantes *BvrR/BvrS* de *Brucella* são avirulentos em camundongos, apresentam invasibilidade reduzida nas células e são incapazes de inibir a fusão dos lisossomos e de se replicar intracelularmente, fato importante durante a fuga da *Brucella* da resposta da célula hospedeira. Além disso, quando existe uma disfunção de *bvrR/bvrS*, há diminuição da resistência característica da *Brucella* à policatiónes bactericidas e aumenta a sua permeabilidade a surfactantes (FREER et al., 1996; LÓPEZ-GOÑI et al., 2002). Contudo, este gene não foi observado com alta expressão na cepa patogênica nem na cepa não patogênica de *L. intracellularis* (VANNUCCI et al., 2012). Portanto, a expressão desse gene por cepas de *L. intracellularis* deverá ser estudada em condições experimentais diferentes das testadas por Vannucci et al. (VANNUCCI et al., 2012).

Os genes *groEL 1* e *2*, presentes em *Mycobacterium sp*, foram altamente expressos pelas variantes patogênica e não-patogênica de *L. intracellularis*. Estes genes codificam chaperonas moleculares, um grupo de proteínas de invólucro envolvidas em processos de assistência no dobramento de outras proteínas. Alguns estudos mostraram seu desempenho para associação de bactérias com macrófagos, além de atuarem como adesina, se ligando ao CD43 na superfície do macrófago hospedeiro (HICKEY et al., 2009).

Além disso, a proteína completa induz respostas pró-inflamatórias em células dendríticas (DCs), promovendo sua maturação e apresentação do antígeno às células T. Quando as DCs encontram-se expostas à proteína GroEL, elas induzem fortes respostas de interferon-gama antígeno-específico (IFN-gama), interleucina-2 (IL-2) e IL-17A de células TCD4<sup>+</sup> (GEORGIEVA et al., 2018). Todas essas informações são de grande

importância considerando que já foi demonstrada a interação direta entre *L. intracellularis* e macrófagos, e que *L. intracellularis* tem a capacidade de sobreviver ao ambiente fagolisossomal de macrófagos (PEREIRA et al., 2020), assim estes genes poderiam favorecer inicialmente na associação e adesão da *L. intracellularis* aos macrófagos do hospedeiro.

Semelhante ao observado com o gene *groEL*, o gene *phoQ* (*phoZ*), presente também em *S. Typhimurium*, regula a expressão de genes envolvidos na virulência, adaptação a ambientes ácidos e com baixo teor de  $Mg^{2+}$  e resistência a peptídeos antimicrobianos de defesa do hospedeiro. Além disso, esse gene apresenta a função de regulação negativa para o gene *prgH*, o qual é necessário para a invasão das células epiteliais e também está envolvido à tolerância bacteriana a meios ácidos, essencial para a sobrevivência intramacrófago de *S. Typhimurium* (MILLER; K et al., 1989; SANOWAR e LE MOUAL, 2005). Este gene poderia ser um dos genes que ajudam na tolerância da *L. intracellularis* para sua sobrevivência em ambientes ácidos, já que foi observada a presença da *L. intracellularis* livre no citoplasma de macrófagos (PEREIRA et al., 2020).

Já em relação aos genes de sobrevivência intracelular das bactérias, dentre os 75 genes identificados nas espécies bacterianas usadas como referência, 27 genes ortólogos à PHE\_MN1-00 foram observados. Destes 27 genes, oito foram altamente expressos na *L. intracellularis*, tanto na cepa patogênica quanto na não patogênica (atenuada) (VANNUCCI et al., 2012). Esses genes são encarregados de codificar proteínas relacionadas principalmente à sinalização celular e à biossíntese molecular, dentre elas, destacam-se as proteínas *livH*, *sfsA* e *recO*.

A LivH é uma proteína que faz parte do sistema de transporte dependente de proteína de ligação, responsável pela translocação dos substratos através da membrana bacteriana, enquanto a *sfsA* é uma proteína com função de ligação ao DNA e a *recO* é uma proteína de reparo de DNA. Os genes codificadores destas três proteínas foram identificados em todas as bactérias selecionadas como referenciais para este estudo (ANDERSON et al., 1996; CHAIN et al., 2004; DELVECCHIO et al., 2002; GLASER et al., 2001; ZHENG et al., 2008).

Outros genes interessantes identificados no genoma de *L. intracelulares* como altamente expressos na cepa patogênica estão em ortologia com o genoma das outras bactérias utilizadas como referência, sendo eles: *rplW*, *ribH*, *fur* e o *rpON*. O gene *rplW* codifica uma proteína de montagem que forma o principal local de ancoragem para a ligação do fator desencadeante ao ribossomo, codificado pelo gene *ribH*, que age no penúltimo passo na biossíntese da riboflavina. O gene *fur*, determinante da produção da proteína reguladora da captação férrica, e o *rpON*, relacionado à adaptação bacteriana e resposta ao estresse (VANNUCCI et al., 2012). Todos estes genes poderiam estar favorecendo a adaptação da *L. intracellularis* ao ambiente intracelular, e resposta ao estresse como observado em outras bactérias (BAGG e NEILANDS, 1987).

Em relação à análise de genes de sobrevivência intracelular, foi observado que dos oito genes ortólogos expressos na cepa patogênica de *L. intracellularis*, seis foram ortólogos à *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, representando o 75% dos genes expressos, isto poderia nos mostrar a proximidade da *L. intracellularis* com a *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, com respeito dos genes compartilhados, indicando que

muitos dos mecanismos de sobrevivência intracelulares da *Salmonella* poderiam ser observados na *L. intracellularis*.

Outros achados interessantes em relação aos genes de sobrevivência intracelular foram os dos genes *cpdR*, este gene faz parte do sistema de dois componentes, que codificam uma proteína receptora reguladora de resposta (*cpdR*), que cumpre a importante função de regular e controlar o crescimento, divisão e sobrevivência intracelular da bactéria *B. abortus* dentro de células hospedeiras de mamíferos (WILLETT et al., 2015). O gene *rsh*, por sua vez, funciona como uma proteína essencial para o crescimento intracelular e expressão do sistema de secreção do tipo IV (*virB*), desempenhando um papel na adaptação de *Brucella* ao seu ambiente intracelular (DOZOT et al., 2006).

Avaliando todos os genes ortólogos de sobrevivência intracelular deste estudo, no total de 20 genes, tanto aqueles expressos ou não por *L. intracellularis*, observa-se maior proporção de genes ortólogos com *Brucella* sp., 34 %. Já nesta avaliação, observamos que *L. intracellularis* apresentou mais genes fazendo ortologia com mecanismos utilizados pela *Brucella* para sua sobrevivência intracelular.

São poucos os estudos sobre os genes e funcionalidade de genes na *L. intracellularis*. Como demonstrado pelos resultados do presente estudo, ainda são necessárias pesquisas mais aprofundadas e detalhadas do genoma desta bactéria e das proteínas produzidas por ela. Se presentes em outras bactérias, tais genes podem, por homologia, desempenhar a mesma funcionalidade em *L. intracellularis*, fornecendo novos genes alvo de estudo que possam estar envolvidos na patogênese dessa bactéria.

Genes importantes para quimiotaxia, motilidade celular, ligação e reparo do DNA, associação de bactérias com macrófagos ou indutores de respostas pró-inflamatórias, observados neste trabalho de genes fazendo ortologia, fornecem novos genes alvo a serem estudados em relação à patogênese de *L. intracellularis*. Estudar a história evolutiva dos organismos com base no uso de métodos matemáticos, ajuda a deduzir o passado das espécies em estudo, levando em consideração a identificação de homólogos entre diferentes organismos (SNEL et al., 2005).

Quando eventos evolutivos acontecem, como descendência vertical, duplicação de genes, perda de genes, entre outros, costumam marcar a história dos genes e são os principais eventos da evolução genômica. Assim, quando ocorre uma divergência após um evento de especiação, a relação entre as sequências acontece, e é o que chamamos de ortologia (SNEL et al., 2005). Trazer esta informação para *L. intracellularis* nos ajuda a entender melhor com quais genes compartilha um ancestral comum e se apresentam as mesmas funções, ajudando a entender melhor os diversos mecanismos de patogênese da *L. intracellularis* que ainda não estão claros.

## Conclusão

Este estudo de avaliação *in silico* é o primeiro a trazer uma comparação de ortologia genômica para *L. intracellularis*, ou seja, a relação de genes homólogos ou duplicados de um ancestral comum que poderiam estar compartilhadas entre bactérias intracelulares

enteroinvasivas bem conhecidas quando comparadas com *L. intracellularis*. Com base nos resultados aqui apresentados, os principais candidatos a ser considerados para estudos futuros, seriam os genes *bvrR*, *cpdR*, *phoQ*, por serem genes que regulam a expressão de mecanismos envolvidos na virulência e adaptação a ambientes ácidos. Novos estudos poderiam indicar a sua importância na virulência e invasão das células epiteliais, devido ao seu envolvimento na tolerância bacteriana, favorecendo sua sobrevivência aos meios ácidos dentro de macrófagos.

### Agradecimentos

Ao setor de Bioinformática, departamento de Medicina Veterinária Preventiva – UFMG. Este trabalho foi financiado pela FAPEMIG. RMCG e RLS são beneficiários de bolsas do CNPq, Brasil. MESD contou com o apoio da Fundação Capes, Ministério da Educação, Brasil.

### Conflito de interesses

Não existe conflito de interesse na condução deste estudo.

### Referências

- ALBERDI, M. P. et al. Expression by *Lawsonia intracellularis* of type III secretion system components during infection. **Veterinary Microbiology**, v. 139, n. 3–4, p. 298–303, nov. 2009.
- ANDERSON, P. E. et al. Structure and regulation of the *Salmonella typhimurium* *rnc*-*recO* operon. **Biochimie**, v. 78, n. 11–12, p. 1025–1034, 1996.
- BENGTSSON, R. J. et al. Metagenomic sequencing of clinical samples reveals a single widespread clone of *Lawsonia intracellularis* responsible for porcine proliferative enteropathy. **Microbial Genomics**, v. 6, n. 4, 2020.
- CHAIN, P. S. G. et al. Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 38, p. 13826–13831, set. 2004.
- COBURN, B.; SEKIROV, I.; FINLAY, B. B. Type III secretion systems and disease. **Clinical microbiology reviews**, v. 20, n. 4, p. 535–549, 2007.
- COOPER, D. M. et al. Comparison of the 16S ribosomal DNA sequences from the intracellular agents of proliferative enteritis in a hamster, deer, and ostrich with the sequence of a porcine isolate of *Lawsonia intracellularis*. **International journal of systematic bacteriology**, v. 47, n. 3, p. 635–639, jul. 1997.
- CORNELIS, G. R. The type III secretion injectisome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 11, p. 811–825, 2006.
- DELVECCHIO, V. G. et al. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the**

**United States of America**, v. 99, n. 1, p. 443–448, jan. 2002.

DOZOT, M. et al. The stringent response mediator Rsh is required for *Brucella melitensis* and *Brucella suis* virulence, and for expression of the type IV secretion system virB. **Cellular microbiology**, v. 8, n. 11, p. 1791–1802, nov. 2006.

EMMS, D. M.; KELLY, S. OrthoFinder: phylogenetic orthology inference for comparative genomics. **Genome Biology**, v. 20, n. 1, p. 238, 2019.

ESPINOSA, A.; ALFANO, J. R. Disabling surveillance: bacterial type III secretion system effectors that suppress innate immunity. **Cellular microbiology**, v. 6, n. 11, p. 1027–1040, 2004.

FREER, E. et al. *Brucella*-*Salmonella* lipopolysaccharide chimeras are less permeable to hydrophobic probes and more sensitive to cationic peptides and EDTA than are their native *Brucella* sp. counterparts. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 20, p. 5867–5876, 1996.

GEORGIEVA, M. et al. Mycobacterium tuberculosis GroEL2 Modulates Dendritic Cell Responses. **Infection and immunity**, v. 86, n. 2, fev. 2018.

GLASER, P. et al. Comparative genomics of *Listeria* species. **Science (New York, N.Y.)**, v. 294, n. 5543, p. 849–852, out. 2001.

HAZELBAUER, G. L.; FALKE, J. J.; PARKINSON, J. S. Bacterial chemoreceptors: high-performance signaling in networked arrays. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 33, n. 1, p. 9–19, 2008.

HICKEY, T. B. M. et al. Mycobacterium tuberculosis Cpn60.2 and DnaK are located on the bacterial surface, where Cpn60.2 facilitates efficient bacterial association with macrophages. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 8, p. 3389–3401, 2009.

HICKEY, T. B. M. et al. Mycobacterium tuberculosis employs Cpn60.2 as an adhesin that binds CD43 on the macrophage surface. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 11, p. 1634–1647, 2010.

HOMMA, M.; DEROSIER, D. J.; MACNAB, R. M. Flagellar hook and hook-associated proteins of *Salmonella typhimurium* and their relationship to other axial components of the flagellum. **Journal of molecular biology**, v. 213, n. 4, p. 819–832, jun. 1990.

INOUE, Y. et al. The FlhA linker mediates flagellar protein export switching during flagellar assembly. **Communications biology**, v. 4, n. 1, p. 646, maio 2021.

J WORLEY, M. Immune evasion and persistence in enteric bacterial pathogens. **Gut microbes**, v. 15, n. 1, p. 2163839, 2023.

KAUR, K., ZHANG, Q., BECKLER, D., MUNIR, S., LI, L., KINSLEY, K., HERRON, L., PETERSON, A., MAY, B., SINGH, S., GEBHART, C., KAPUR, V. The complete genome sequence of *Lawsonia intracellularis*: the causative agent of proliferative enteropathy. **Microbiology, University of Minnesota, 1500 Gortner Ave., St. Paul, Minnesota, MN 55108, USA**, p. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AM180252.1>, 2005.

LAWSON, G. H.; GEBHART, C. J. Proliferative enteropathy. **Journal of comparative pathology**, v. 122, n. 2–3, p. 77–100, 2000.

LAWSON, G. H. K. et al. Intracellular bacteria of porcine proliferative enteropathy:



Cultivation and maintenance in vitro. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 5, p. 1136–1142, 1993.

LEVY, M. et al. Microbiota-Modulated Metabolites Shape the Intestinal Microenvironment by Regulating NLRP6 Inflammasome Signaling. **Cell**, v. 163, n. 6, p. 1428–1443, 2015.

LÓPEZ-GOÑI, I. et al. Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system BvrR/BvrS. **Veterinary Microbiology**, v. 90, n. 1–4, p. 329–339, 2002.

MCORIST, S. et al. Characterization of *Lawsonia intracellularis* gen. nov., sp. nov., the obligately intracellular bacterium of porcine proliferative enteropathy. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, n. 4, p. 820–825, 1995.

MILLER, S. I.; KUKRAL, A. M.; MEKALANOS, J. J. A two-component regulatory system (phoP phoQ) controls *Salmonella typhimurium* virulence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 13, p. 5054–5058, jul. 1989.

MINAMINO, T.; IINO, T.; KUTUSKAKE, K. Molecular characterization of the *Salmonella typhimurium* flhB operon and its protein products. **Journal of bacteriology**, v. 176, n. 24, p. 7630–7637, dez. 1994.

OLIVEIRA AR., G. C. Differentiation of *Lawsonia intracellularis* isolates from different animal species using Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) Research Day at the College of Veterinary Medicine, University of Minnesota. [s.l.: s.n.].

PEREIRA, C. E. R. et al. Survival of *Lawsonia intracellularis* in porcine peripheral blood monocyte-derived macrophages. **PLoS one**, v. 15, n. 7, p. e0236887, 2020.

PRITCHARD, L. et al. Genomics and Taxonomy in Diagnostics for Food Security: soft-rotting enterobacterial plant pathogens. **Anal. Methods**, v. 8, 17 dez. 2015.

PRUITT, K. D.; TATUSOVA, T.; MAGLOTT, D. R. NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. **Nucleic acids research**, v. 35, n. Database issue, p. D61–5, jan. 2007.

SAIT, M. et al. Genome sequence of *Lawsonia intracellularis* strain N343, isolated from a sow with hemorrhagic proliferative enteropathy. **Genome Announcements**, v. 1, n. 1, p. 1–2, 2013.

SANOWAR, S.; LE MOUAL, H. Functional reconstitution of the *Salmonella typhimurium* PhoQ histidine kinase sensor in proteoliposomes. **The Biochemical journal**, v. 390, n. Pt 3, p. 769–776, set. 2005.

SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, v. 30, n. 14, p. 2068–2069, 15 jul. 2014.

SNEL, BEREND; HUYNEN, MARTIJN A.; DUTILH, B. E. GENOME TREES AND THE NATURE OF GENOME EVOLUTION. **Annual Review of Microbiology**, v. 59, n. 0066–4227, p. 191, 2005.

STOCK, A. et al. Identification of a possible nucleotide binding site in CheW, a protein required for sensory transduction in bacterial chemotaxis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 2, p. 535–537, 1987.

UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. **Nucleic acids research**, v. 49, n.

D1, p. D480–D489, jan. 2021.

VANNUCCI, F. A. et al. Attenuation of virulence of *Lawsonia intracellularis* after in vitro passages and its effects on the experimental reproduction of porcine proliferative enteropathy. **Veterinary Microbiology**, v. 162, n. 1, p. 265–269, 2013.

VANNUCCI, F. A.; FOSTER, D. N.; GEBHART, C. J. Comparative Transcriptional Analysis of Homologous Pathogenic and Non-Pathogenic *Lawsonia intracellularis* Isolates in Infected Porcine Cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, 2012.

WILLETT, J. W. et al. Structural asymmetry in a conserved signaling system that regulates division, replication, and virulence of an intracellular pathogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 28, p. E3709-18, jul. 2015.

ZHENG, H. et al. Genetic basis of virulence attenuation revealed by comparative genomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Ra versus H37Rv. **PloS one**, v. 3, n. 6, p. e2375, jun. 2008.

### Capítulo 3. *Lawsonia intracellularis* recruta endossomos iniciais e tardios no processo de tráfego intracelular

Mirtha E. Suarez-Duarte<sup>1</sup>; Talita P. Resende<sup>3</sup>; Carlos E. R. Pereira<sup>2</sup>; Renato de Lima Santos<sup>1</sup>; Ricardo P. Laub<sup>1</sup>; Jessica C. R. Barbosa<sup>1</sup>; Paula A. Correia<sup>1</sup>; Matheus D. Araujo<sup>1</sup>; Gustavo H. Siqueira Mariano<sup>1</sup>; Roberto M C Guedes<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Department of Veterinary Clinic and Surgery, Veterinary School, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil; <sup>2</sup>Departament of Veterinary Medicine, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brazil; <sup>3</sup>Department of Veterinary Medicine, Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.

E-mail: [guedesufmg@gmail.com](mailto:guedesufmg@gmail.com)

#### Resumo

Patógenos intracelulares utilizam diversas estratégias de sobrevivência, tanto evadindo o sistema imune do hospedeiro, como criando estratégias para evitar a degradação ao longo do seu tráfego intracelular. Existem diversos estudos demonstrando como e em qual momento bactérias intracelulares conseguem evadir e/ou manipular a via de internalização, desde uma evasão inicial, interrompendo a maturação ou evitando a fusão de fagossomos com lisossomos, sobrevivência intracelular e invasão de outras células do hospedeiro. O objetivo deste capítulo foi estudar o tráfego intracelular de *Lawsonia intracellularis* em células epiteliais intestinais de imortalizadas rato (IEC-18) e em macrófagos primários suínos, verificando sua colocalização com marcadores de endossomos precoces e endossomos tardios. Foi avaliado o processo de infecção tanto em células epiteliais intestinais quanto em macrófagos em três diferentes tempos (45, 60 e 75 minutos pós-inoculação). Foi observado que *L. intracellularis* recruta a Rab 5, marcador de endossomo inicial, assim como a Rab 7, marcador do endossomo tardio em macrófagos e IEC-18. Houve também participação de fagolisossomos no processo de tráfego intracelular pelo recrutamento da cathepsina D, tanto em IEC-18 quanto em macrófagos. Os resultados do presente estudo suportam a hipótese de que *L. intracellularis* segue a via fagolisossomal, na qual o patógeno pode residir e propagar no fagossomo acidificado, se fundir aos lisossomos, antes de romper o vacúolo e invadir novas células.

**Palavras-chave:** patogênese, GTPases, enteropatia proliferativa, virulência, endocitose.

## Introdução

Adenomatose intestinal, ou enteropatia proliferativa suína, caracterizada por um espessamento na parede intestinal por proliferação dos enterócitos, é uma doença intestinal infecciosa associada à infecção por uma bactéria intracelular obrigatória conhecida como *Lawsonia intracellularis*. Essa doença já foi relatada em várias espécies animais, porém, dentre as espécies domésticas, suínos e equinos são mais severamente afetados (FRAZER, 2008; LAWSON e GEBHART, 2000).

Os eventos iniciais relacionados a interação patógeno hospedeiro ainda são incompletamente compreendidos durante a infecção por *L. intracellularis*. Experimentos *in vitro* demonstraram que a internalização de *L. intracellularis* pode utilizar do maquinário endocítico da célula eucariota mediado por clatrina (LAWSON et al., 1995; PEREIRA et al., 2023) que se torna mais eficaz quando a bactéria está metabolicamente ativa.

Organismos de *L. intracellularis* entram nas células epiteliais em aproximadamente 3 horas após inoculação (hpi), formando vacúolos ligados à membrana (McORIST et al., 1995), que posteriormente são associados a proteína Rab5, nos chamados endossomos precoces (PEREIRA, 2018). É hipotetizado que após a internalização estes endossomos sejam desmontados mecanismos ainda desconhecidos, liberando assim *L. intracellularis* no citoplasma de células epiteliais (PEREIRA, 2018).

Algumas bactérias intestinais patogênicas, como *Salmonella enterica* e *Yersinia enterocolitica*, possuem a capacidade de sobreviver no citoplasma de células de defesa, como os macrófagos, utilizando-os como rota para disseminação da infecção para outros sítios, e sua persistência na infecção (JOHNSON e JACOBY, 1978). BOUTRUP et al (2010) observaram a presença de *L. intracellularis* viável dentro de macrófagos da lâmina própria, utilizando a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH).

PEREIRA et al. (2020) demonstraram que *L. intracellularis* não somente sobrevive no citoplasma de macrófagos suínos, mas também se propaga nesta célula. Baseado nesse achado, surgiu a hipótese de que *L. intracellularis* possui mecanismos para evasão dos aparatos de defesa inata do hospedeiro, ficando livre no citoplasma de macrófagos sem incitar resposta inflamatória e, dessa forma, se propagando e se disseminando para outras áreas da mucosa intestinal (PEREIRA et al., 2020).

Cada patógeno apresenta seu próprio mecanismo de interação com a célula hospedeira e suas particularidades. Os patógenos intracelulares seguem uma das três vias de tráfego dentro de uma célula hospedeira: a via extrafagossomal, na qual o patógeno lisa a membrana do fagossomo e reside livremente no citoplasma da célula hospedeira; a via de fagolisossomo, na qual o patógeno reside e se propaga em um fagossomo acidificado que se funde com lisossomos; e a via fagossômica, na qual o patógeno reside em um fagossomo que não se funde com lisossomos (SCOTT et al., 2003).

Com o objetivo de aprofundar o conhecimento sobre o tráfego intracelular da *L. intracellularis* em células epiteliais intestinais e em macrófagos, foram conduzidos estudos verificando a co-localização de marcadores de endossomos precoces e endossomos tardios, de modo a esclarecer em qual momento do tráfego intracelular *L. intracellularis* consegue evadir as reações da célula hospedeira e se propagar livremente em seu citoplasma.

## Material e métodos

### Declaração do comitê de ética

O estudo foi conduzido de acordo com as normas do Comitê de Ética no Uso de Animais na Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo CEUA/UFMG nº 79/2020).

### Propagação *in vitro* de *Lawsonia intracellularis*

A cepa PHE\_MN1-00 de *L. intracellularis* (ATCC PTA-3457) entre as passagens 8 e 20 foram propagadas em cultivo de fibroblastos de camundongo (Células McCoy; ATCC CRL-1696), em Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco Invitrogen Corporation), suplementado com 7% de soro fetal bovino (FBS; Corning 35011CV), como descrito anteriormente (GUEDES e GEBHART, 2003). Em resumo, monocamadas de células McCoy com cerca de 30% de confluência foram inoculadas com *L. intracellularis*, e incubadas a 37°C em atmosfera controlada (VANNUCCI et al., 2011). Sete dias após a infecção, as monocamadas de células McCoy foram imersas em cloreto de potássio a 0,1%, lisadas mecanicamente, centrifugadas e ressuspensas em solução de sacarose-fosfato glutamato (SPG) (GUEDES e GEBHART, 2003). A suspensão resultante foi utilizada para infectar novas células McCoy ou filtrada em filtro de 0,80 µm para, então, ser utilizada como inóculo experimental para infectar células intestinais epiteliais ou macrófagos.

### Cultivos de células epiteliais intestinais de rato imortalizadas e macrófagos derivados de sangue periférico suíno

Células epiteliais intestinais de íleo de rato (ATCC-IEC-18, CRL-1589<sup>TM</sup>) foram utilizadas para o estudo do tráfego intracelular de *L. intracellularis*. Essa linhagem celular foi cultivada, como descrito por (RESENDE et al., 2019), em DMEM (Gibco, Thermo-Fisher Scientific) e soro fetal bovino a 7%. Os frascos de cultura de IEC-18 foram mantidos a 37°C em atmosfera umidificada e 5% de CO<sub>2</sub>, sendo subcultivadas quando a confluência atinja 70 a 90%, utilizando tripsina-etilenodiaminotetracético (EDTA, Gibco, Thermo-Fisher Scientific).

A obtenção dos macrófagos derivados de sangue periférico suíno foi executada de acordo com Pereira e colaboradores (2019). Resumidamente, 60 mL de sangue total heparinizado foram colhidos de matrizes não-gestantes híidas, com resultado negativo prévio em teste de PCR para *L. intracellularis*, e diluídos (proporção 1:1) em DMEM. A amostra de sangue total diluída foi então cuidadosamente transferida para tubos cônicos de polipropileno (BD Bioscience, San Jose, CA, EUA), contendo solução de Histopaque (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) na proporção de 2:1 v/v (sangue + DMEM: Histopaque). Os tubos foram centrifugados e as células mononucleares foram coletadas da interface entre o plasma e o Histopaque com uma pipeta Pasteur e transferidas para outro tubo, sendo ressuspensas em tampão de lise eritrocitária em temperatura ambiente e lavadas duas vezes com DMEM por centrifugação. Posteriormente, as células foram transferidas para frascos de Teflon (Nalge Nunc, Rochester, EUA) e, então, cultivadas por 10 dias a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> em 10 mL de RPMI-1640 suplementado mais antimicrobiano. Após 24 horas de incubação, o meio de cultura foi substituído para remoção de células não aderentes e dos antibióticos (estreptomicina + penicilina). As culturas permaneceram nas condições descritas por 10 dias e o meio foi substituído a cada

três dias. Após esse tempo, os macrófagos derivados de monócitos foram transferidos para placas de cultivo apropriadas para os testes descritos a seguir.

#### **Cultivo de *Listeria monocytogenes*.**

Como controle positivo, foi utilizada a bactéria intracelular *Listeria monocytogenes* (ATCC 19915), que foi cultivada previamente em caldo BHI (Brain Heart Infusion, Kasvi, EUA), a 37°C, por 15 horas, sob agitação (200 rpm). Posteriormente, a cultura bacteriana foi centrifugada a 3.000 g por 10 min em temperatura ambiente e ressuspensa em solução salina tamponada com fosfato (PBS). A densidade óptica OD<sub>600nm</sub> das suspensões bacterianas da *L. monocytogenes*, foram medidas por espectrofotometria. A dose infectante (10<sup>6</sup> UFC/mL) do inóculo foi preparada em meio DMEM (FACHINI, 2015).

#### **Infecção de células IEC-18 e macrófagos suínos com *Lawsonia intracellularis***

Monocamadas de macrófagos diferenciados ou IEC-18 cultivadas em lamínulas de vidro em placas de cultura celular de 24 poços foram infectadas com *L. intracellularis* viáveis a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 100. As células foram infectadas com *L. intracellularis* e, inicialmente centrifugadas por 5 minutos a 1000 g, para otimizar a interação entre as bactérias e as células, e posteriormente incubadas por 45, 60 e 75 min a 37°C. Cada período de tempo foi realizado em placas diferentes, em uma atmosfera adequada para o crescimento de *L. intracellularis* (VANNUCCI et al., 2011). Entre cada período foi feita uma lavagem de placas para eliminar as bactérias que estivessem no meio extracelular de modo a prevenir a interferência na avaliação de tempo. Células não incubadas com *L. intracellularis* foram incluídas como controle negativo. Então, as monocamadas foram lavadas com solução tampão de fosfato (PBS), por três vezes, e fixadas em 4% paraformaldeído por 30 min em temperatura ambiente.

#### **Microscopia eletrônica de transmissão**

Para verificar a presença de *L. intracellularis* dentro dos macrófagos utilizando microscopia eletrônica de transmissão, os poços de placas de 24 poços foram infectados com de aproximadamente 100 bactérias para 1 macrófago. Em seguida, as células foram fixadas e avaliadas em três períodos diferentes pós-infecção: 45 min (infecção inicial), 60 e 75 min após a infecção (infecção tardia e extrafagolissossomal). Como um controle negativo, macrófagos não inoculados foram mantidos nos frascos em condições semelhantes aos macrófagos inoculados.

Culturas de células de macrófagos inoculadas foram fixadas em uma solução contendo 3% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, por 4 horas a 4°C. Em seguida, os macrófagos foram ressuspensos usando um raspador de células, transferido para microtubos e centrifugados por 10 minutos a 1000g, à temperatura ambiente. Posteriormente, um protocolo de pós-fixação foi aplicado, no qual as amostras eram incubadas em 1% tetróxido de ósmio e ferrocianeto de potássio 0,8% por 1 hora, e lavado três vezes em 0,1 M tampão cacodilato. Na próxima etapa, as culturas de células foram lavadas em água destilada e imediatamente desidratado usando acetona em concentrações crescentes de 30, 50, 70, 90 e 100% por 10 minutos em cada concentração. Após a desidratação, as células foram impregnadas lentamente em resina epóxi por 6 horas. Para polimerização e coinfeção dos blocos, o material foi mantido em estufa a 60 °C por 48 horas. Secções ultrafinas (70 nm) obtidas com uma navalha de diamante foram

contrastadas com 5% de uranil acetato e citrato de chumbo e observados em um microscópio eletrônico de transmissão (JEOL Ltd., Tóquio, Japão).

### Imunofluorescência

Para realização de imunofluorescência, as células (macrófagos e IEC-18) foram lavadas novamente com PBS, por três vezes, para remoção de excesso de paraformaldeído e permeabilizadas com 0.1% Triton X-100. As células permeabilizadas foram então incubadas por 30 min em temperatura ambiente com solução de albumina bovina a 4% por 4 h para bloqueio de reações inespecíficas. Para examinar os eventos após a endocitose dos organismos de *L. intracellularis*, as monocamadas de células foram incubadas com anticorpos primários para compartimentos intracelulares (**Tabela 3.1**), lavadas por 5 min em 0.1% Triton X-100 e incubadas por 45 min com anticorpo monoclonal de camundongo anti-*L. intracellularis* e/o poli clonal de coelho, dependendo do da GTPases a serem avaliadas (GUEDES e GEBHART, 2003b). Logo, foram incubadas por mais 60 min à temperatura ambiente com anticorpos anti-GTPases primárias e em seguida lavadas por 5 min em 0.1% Triton X-100. Após a lavagem, as células foram incubadas com anticorpos secundários anti-IgG de coelho produzidos em cabra e anti-IgG de camundongo, ambos fluorescentes, para marcação de *L. intracellularis* e de GTPases, por 60 minutos cada, a 37°C (**Tabela 3.1**). As lamínulas foram então montadas em lâminas de microscopia com meio conjugado com DAPI (ProLong Diamond Antifade Mountant – P36971). Imagens foram adquiridas com microscópio confocal Zeiss 510 Meta com análise de mesmo campo em series-Z, para determinar a co-localização da *L. intracellularis* com as GTPases. Assim também para a marcação da *Listeria monocytogenes* foram utilizadas anticorpos fluorescentes.

### Análise estatística

Os dados quantitativos foram apresentados como mediana. A análise estatística foi realizada pelo teste Kruskal Wallis, com ajuste pelo teste de Dunn e considerada significativa quando  $P < 0,05$ . O software Prisma GraphPad versão 5.0 foi usado para análise estatística.

**Tabela 3.1. Marcadores utilizados para análise do tráfego intracelular de *Lawsonia intracellularis* em macrófagos suínos e células IEC-18.**

Compartimento intracelular	Marcador/ conjugação	Número de referência		Espécie produzida
		Abcam	Millipore-Sigma	Abcam/Millipore-Sigma
Endossomo inicial	Rab5	ab218624	MABT182	Coelho/camundongo
Endossomo tardio	Rab7	ab50533	MABC119	Camundongo/camundongo
(Fago)lisossomo	Catepsina-D	ab133641	06-114	Camundongo/coelho
Anti-IgG de coelho	AlexaFluor-488	ab150077	-	Cabra
Anti-IgG de coelho	Cy3	ab6939	AP187C	Cabra
Anti-IgG de camundongo	AlexaFluor-488	ab150117	AP124JA4	Cabra
Anti-IgG de camundongo	Cy3	ab97035	AP124C	Cabra

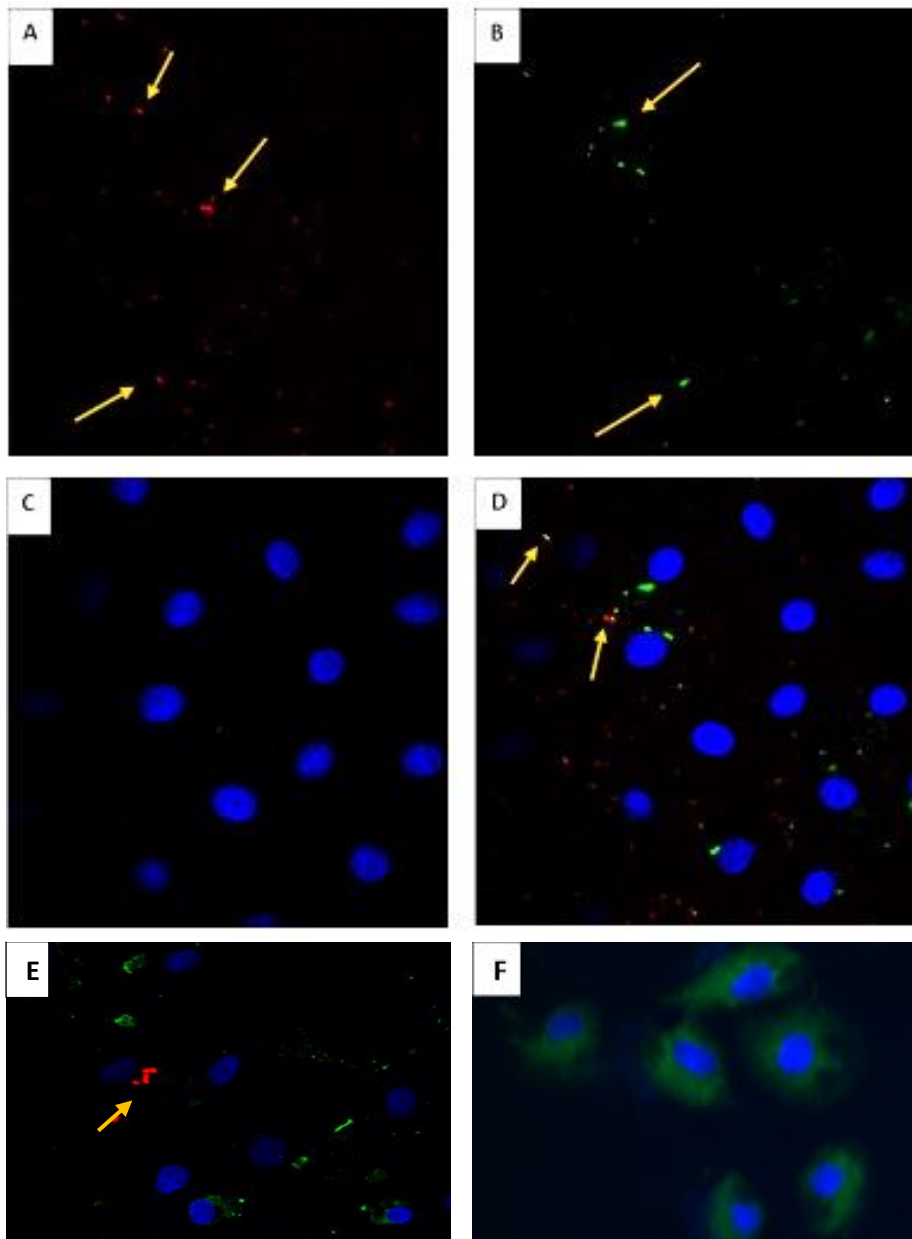
## Resultados

### Microscopia confocal

Após infecção com *L. intracellularis* viáveis a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 100, monocamadas de células IEC-18 e macrófagos diferenciados e cultivados em lamínulas de vidro em placas de cultura celular de 24 poços foram incubadas com anticorpos primários e secundários (**Tabela 3.1**). Posteriormente, essas lamínulas foram montadas em lâminas microscópicas com meio conjugado com DAPI e avaliadas com microscópio confocal para determinação de co-localização. Os três tempos de cultivo avaliados (45, 60 e 75 min) apresentaram marcação de infecção para *L. intracellularis*,

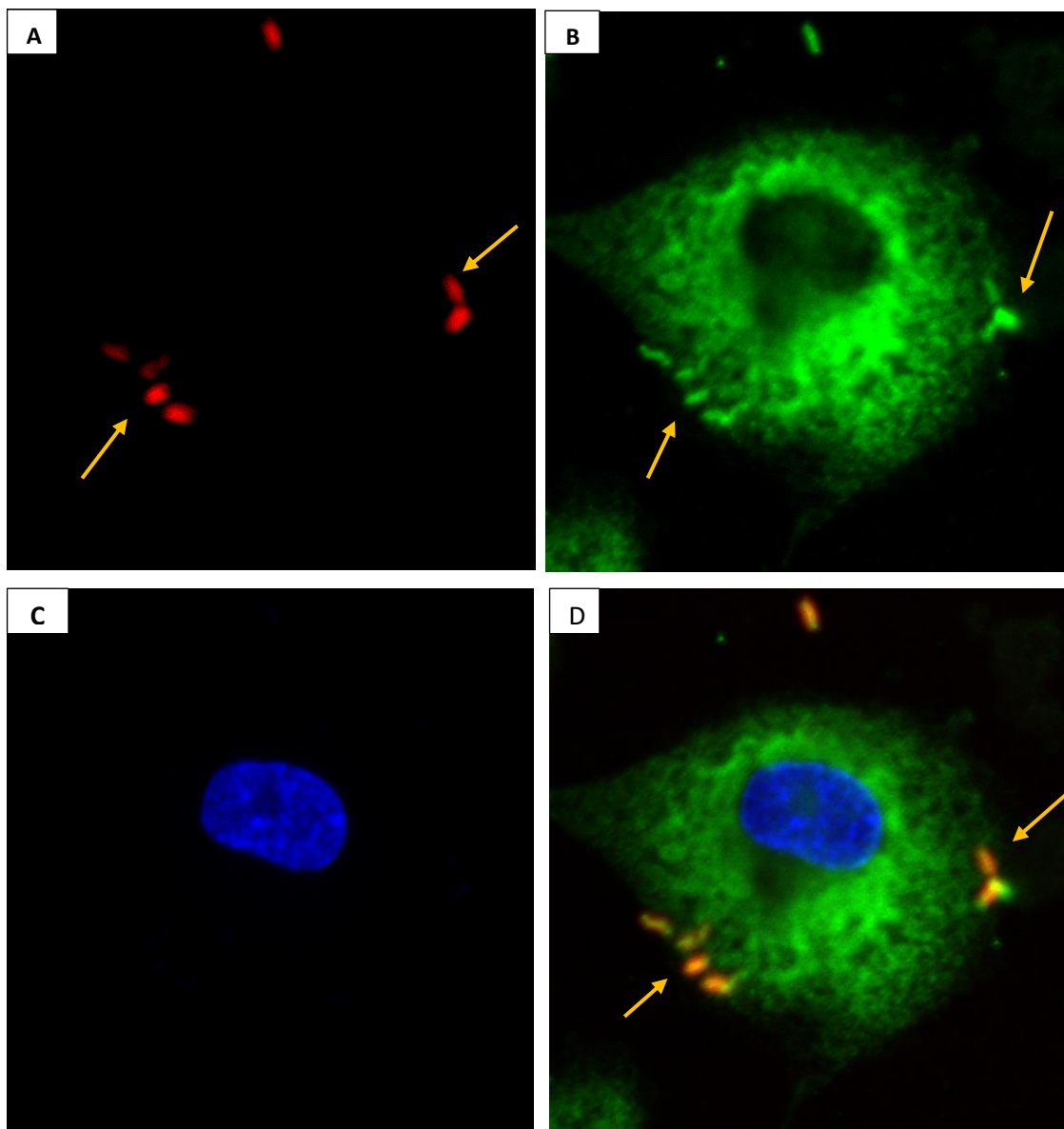
mostrando sucesso no modelo experimental. Para cada tempo de infecção foi avaliada a co-localização de *L. intracellularis* com as GTPases Rab 5, Rab 7 e Catepsina D em células IEC-18 e em macrófagos.

Foi observada co-localização de *L. intracellularis* com a Rab 5 nos três tempos testados. No tempo 45 min, foram observadas três co-localizações, no tempo 60 min foram observadas cinco co-localizações, e no tempo de 75 min foram observadas três co-localizações numa média de 40 células por campo. Contudo, não foi observada diferença estatística entre os números de co-localizações entre os tempos (**Figuras 3.1 a 3.4**).

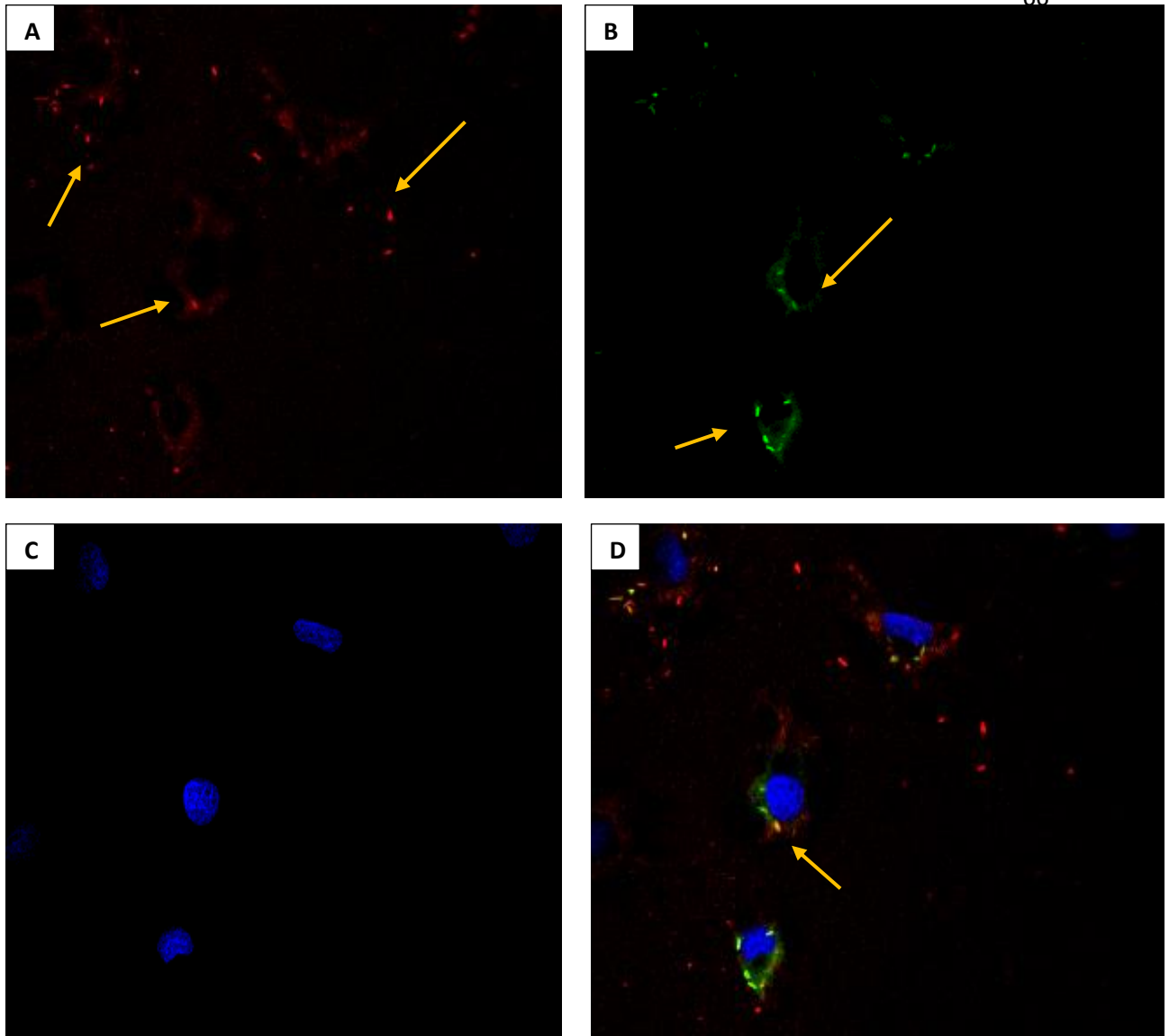


**Figura 3.1.** Microscopia confocal de células IEC-18 infectadas com *Lawsonia intracellularis*. Tempo 45 min. **A)** *L. intracellularis* (marcações em vermelho) **B)** Rab 5 (marcações em verde), **C)** Núcleo celular (azul-DAPI), **D)** Co-localização de *L. intracellularis* e Rab5 (marcações em amarelo) **E)** Controle positivo, *L. monocytogenes* (marcação em vermelho), **F)** Controle negativo. Microscópio confocal 880/ Zeiss. 40X

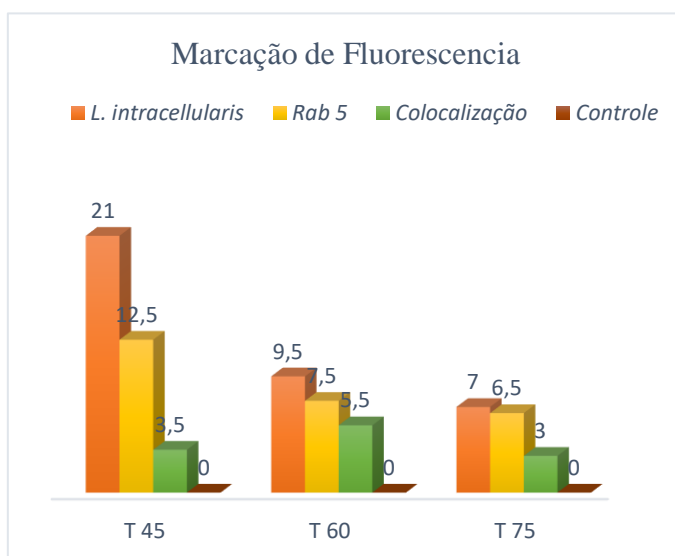




**Figura 3.2.** Microscopia confocal de células IEC-18 infectadas com *Lawsonia intracellularis*. Tempo 60 min. A) *L. intracellularis* (marcações em vermelho) B) Rab 5 (marcações em verde), C) Núcleo celular (azul-DAPI), D) Co-localização de *L. intracellularis* e Rab 5 (marcações em amarelo). Imagem amplificada de umas das células mostrando a co-localização. Microscópio confocal 880/ Zeiss. 40X

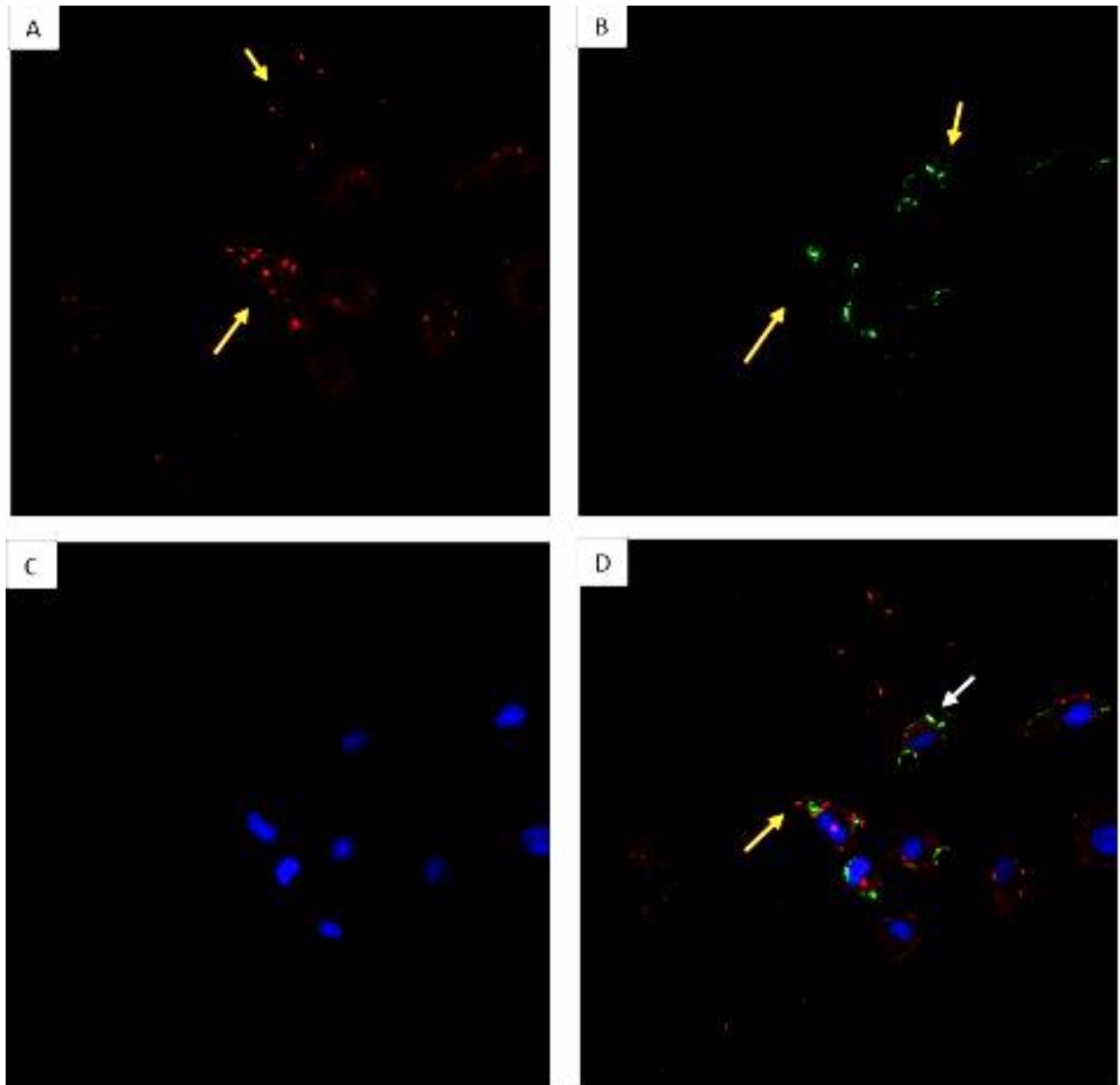


**Figura 3.3.** Microscopia confocal de células IEC-18 infectadas com *Lawsonia intracellularis*. Tempo 75 min. **A)** *L. intracellularis* (marcações em vermelho) **B)** Rab 5 (marcações em verde), **C)** Núcleo celular (azul-DAPI), **D)** Co-localização *L. intracellularis* e Rab 5 (marcações em amarelo). Microscópio confocal 880/ Zeiss. 40X.



**Figura 3.4:** Quantificação de marcação de fluorescência da *L. intracellularis* (Laranja), Rab 5 (amarelo) e Co-localização (verde) em três diferentes tempo pós-infecção (45, 60 e 75 min). Controle Negativo (vermelho). Média de 2 campos de 40X. Microscópio confocal 880/ Zeiss. Não foi observada diferença estatística entre os tempos de infecção.

Posteriormente, foi avaliada a ocorrência de co-localização de *L. intracellularis* e Rab 7 nos três tempos. Foi observado marcação evidente de co-localização apenas no tempo de 75 min (**Figuras 3.5 a 3.8**), que demonstra o contato da bactéria com o endossomo tardio.

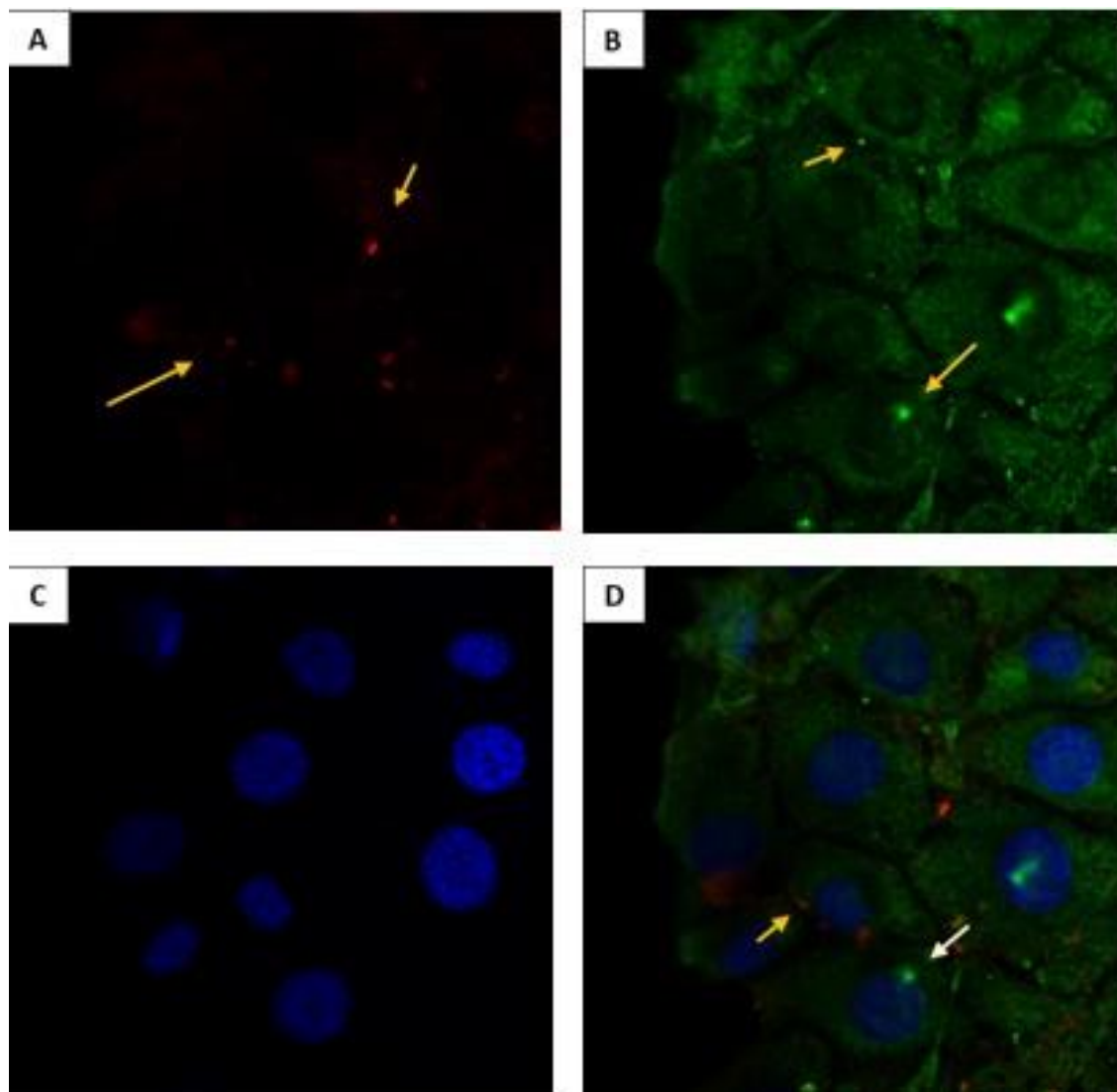


**Figura 3.5.** Microscopia confocal de células IEC-18 infectadas com *Lawsonia intracellularis*. Tempo 45 min. **A)** *L. intracellularis* (marcações em vermelho) **B)** Rab 7 (marcações em verde), **C)** Núcleo celular (azul-DAPI), **D)** Não foi observada **co-localização de *L. intracellularis* e Rab7** neste tempo. Seta amarela indica marcação de *L. intracellularis* e seta cinza marcação da Rab7. Microscópio confocal 880/ Zeiss. 40X

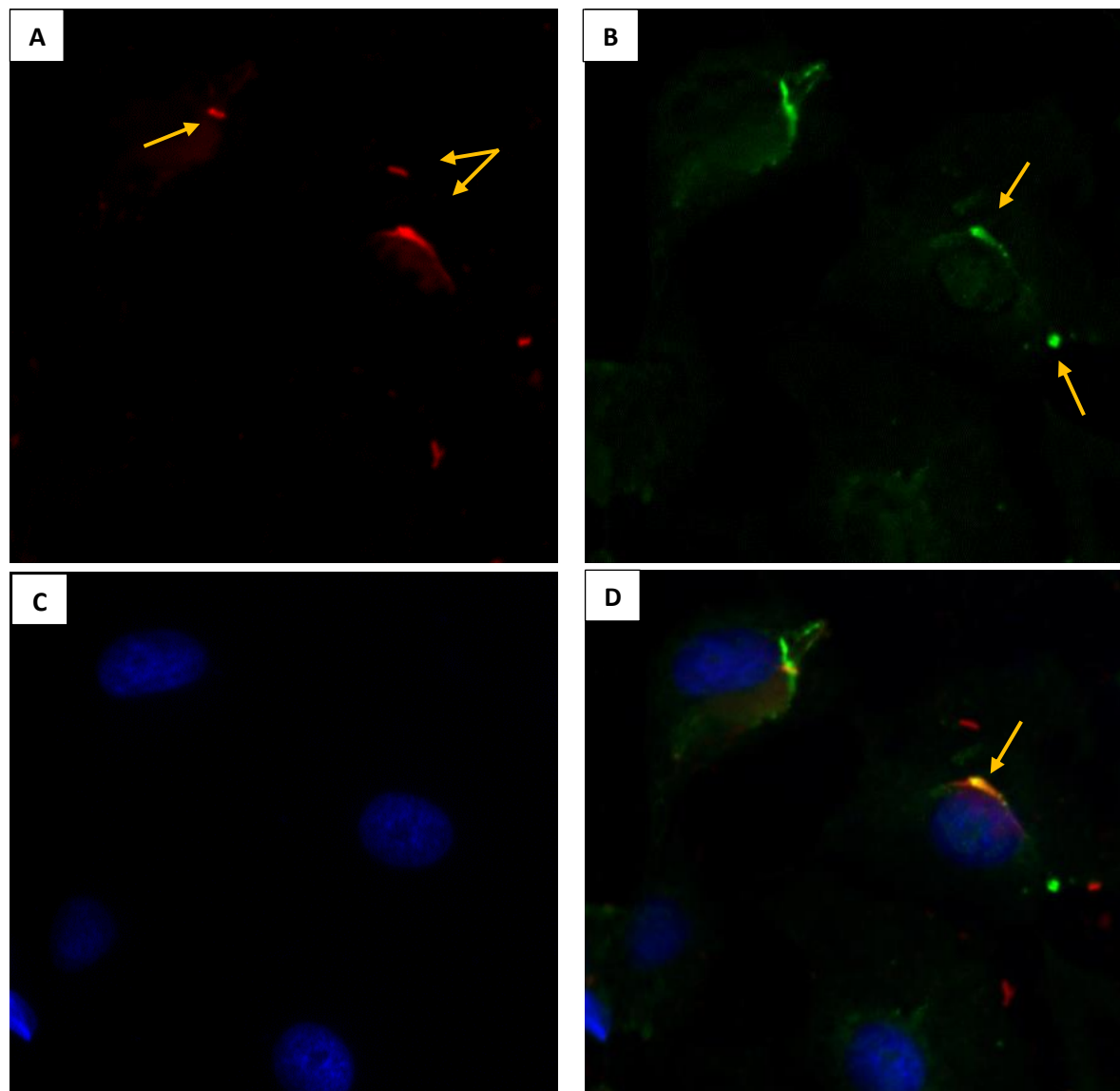
Na avaliação de co-localização de *L. intracellularis* e catepsina D, foi observada marcação de co-localização de bactérias nos três tempos, sendo duas co-localizações no tempo 45 min, 5,5 co-localizações no tempo 60 min e 15,5 co-localizações no tempo 75

min (**Figura 3.9 a 3.13**), sem diferença estatística entre esses valores. Estes resultados demonstram o contato da bactéria com os lisossomos, seguindo a via do fagolisossomo.

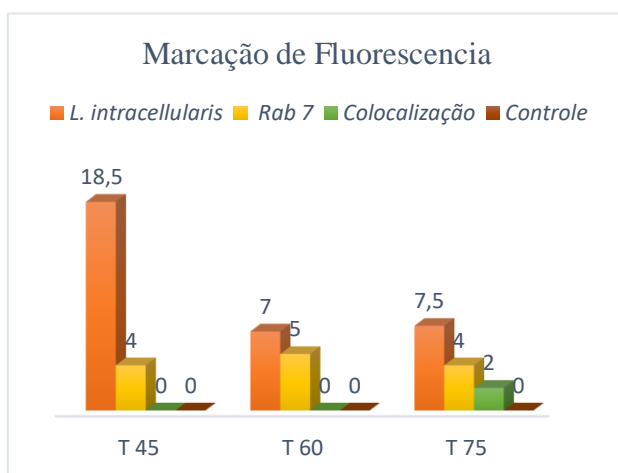
Para a avaliação de co-localização Rab 5, Rab 7 e catepsina D em macrófagos de sangue periférico suínos foi analisada a marcação no tempo de 75 min. Foi demonstrada a co-localização de *L. intracellularis* com a Rab 5 e Rab 7 pela microscopia confocal, e marcação de Catepsina D, pela microscopia de fluorescência (**Figuras 3.14 a 3.16**).



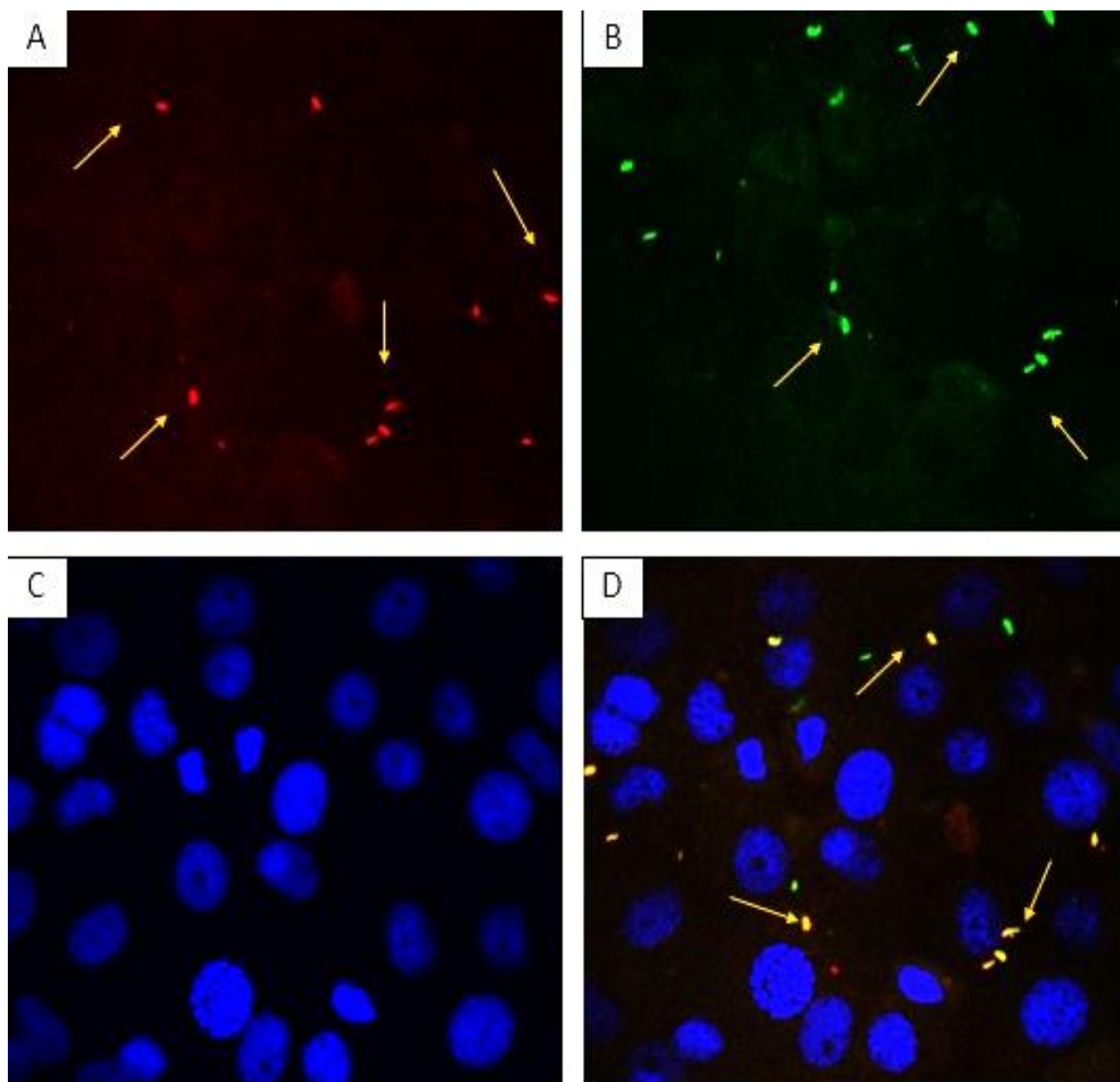
**Figura 3.6.** Microscopia confocal de células IEC-18 infectadas com *Lawsonia intracellularis*. Tempo 60 min. **A)** *L. intracellularis* (seta vermelha) **B)** Rab 7 (seta- verde), **C)** Núcleo celular (azul-DAPI), **D)** Não foi observada **co-localização** de *L. intracellularis* e Rab7 neste tempo. Seta amarela indica marcação de *L. intracellularis* e seta cinza marcação da Rab7. Microscópio confocal 880/ Zeiss. 40X



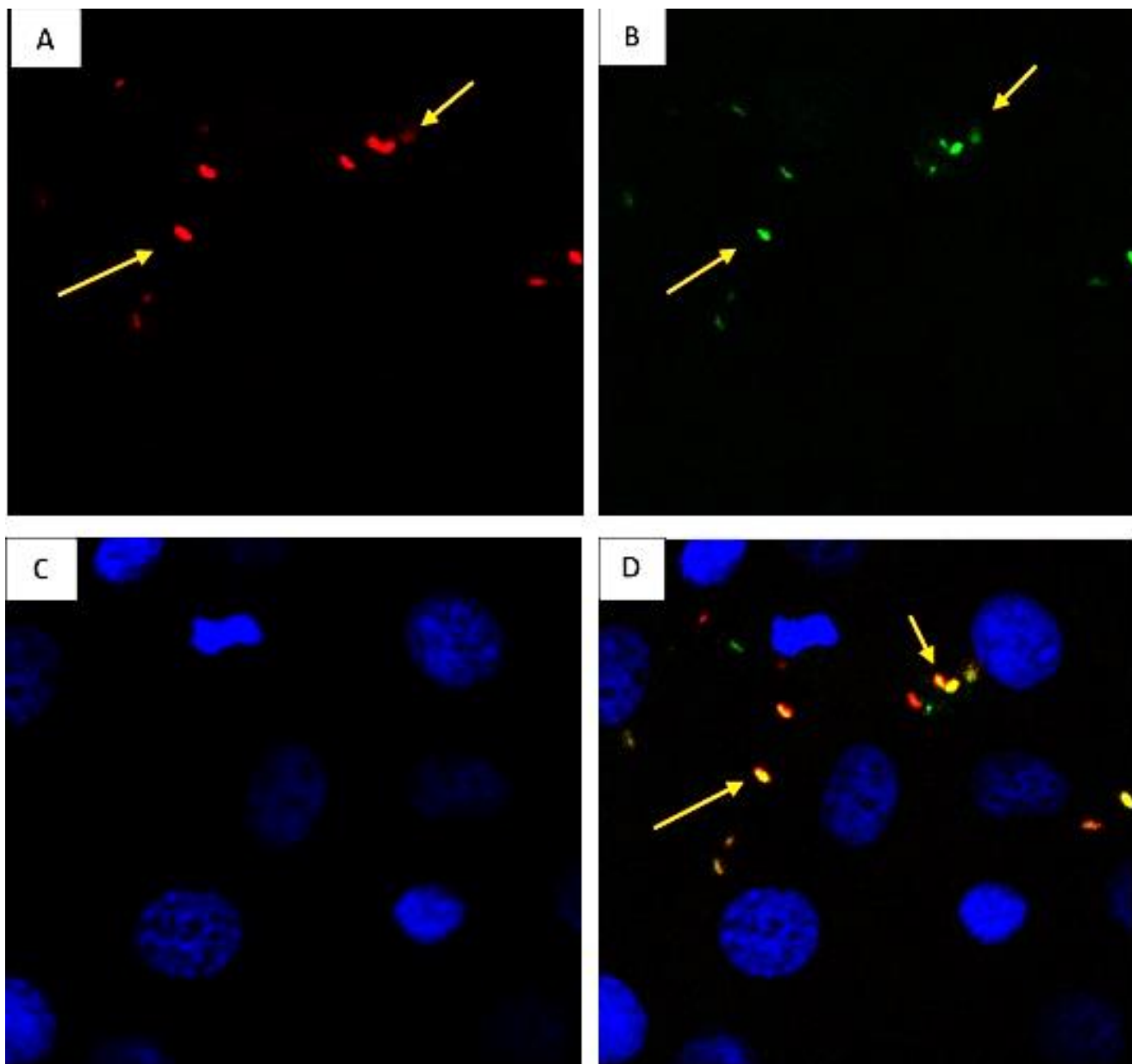
**Figura 3.7.** Microscopia confocal de células IEC-18 infectadas com *Lawsonia intracellularis*. Tempo 75 min. **A)** *L. intracellularis* (marcações em vermelho; **B)** **Rab 7** (marcações em verde), **C)** **Núcleo celular** (azul-DAPI), **D)** **Co-localização** *L. intracellularis* e Rab7 (marcações em amarelo). Microscópio confocal 880/ Zeiss. 40X



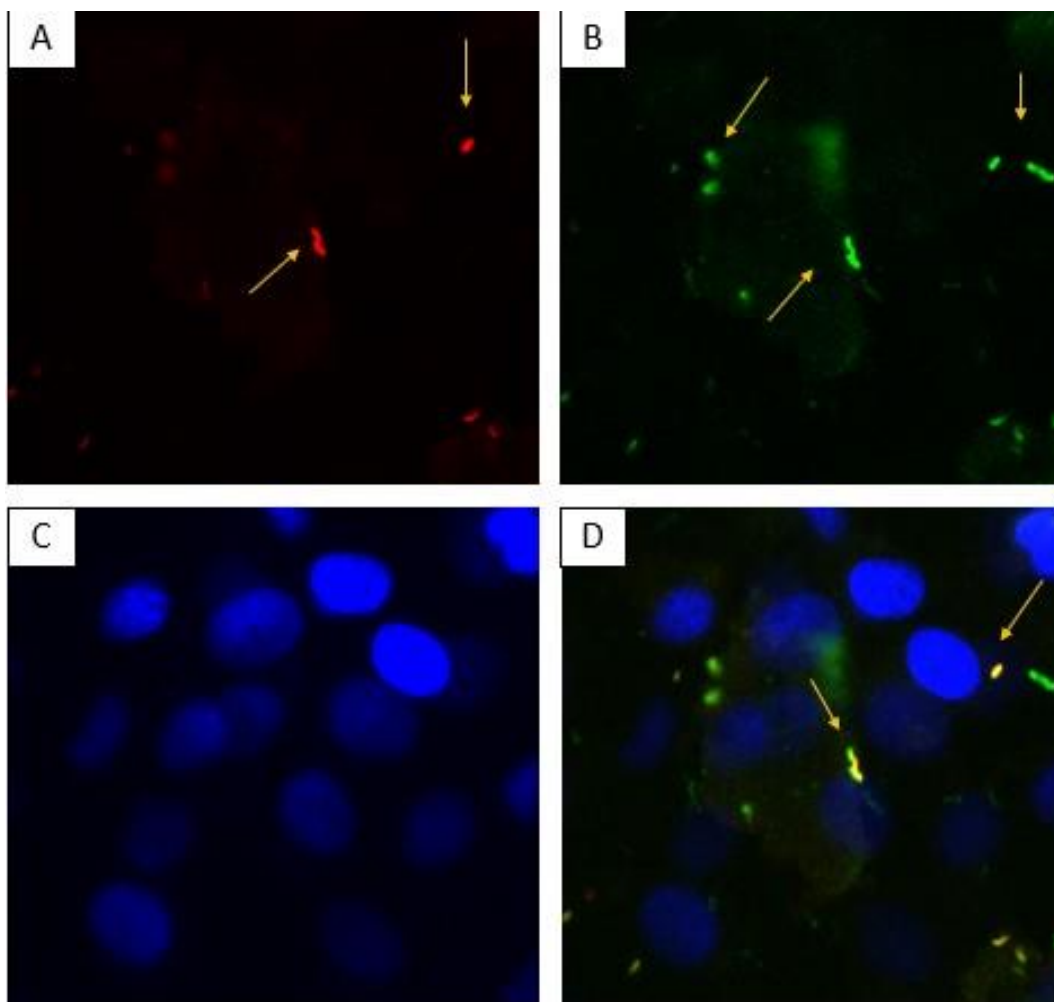
**Figura 3.8.** Quantificação de marcação de fluorescência da *L. intracellularis* (Laranja), Rab 7 (amarelo) e Colocalização (verde) em três diferentes tempo pós-infecção (45, 60 e 75 min). Controle Negativo (vermelho). Média de 2 campos de 40X. Microscópio confocal 880/ Zeiss. Não foi observada diferença estatística entre os tempos de infecção.



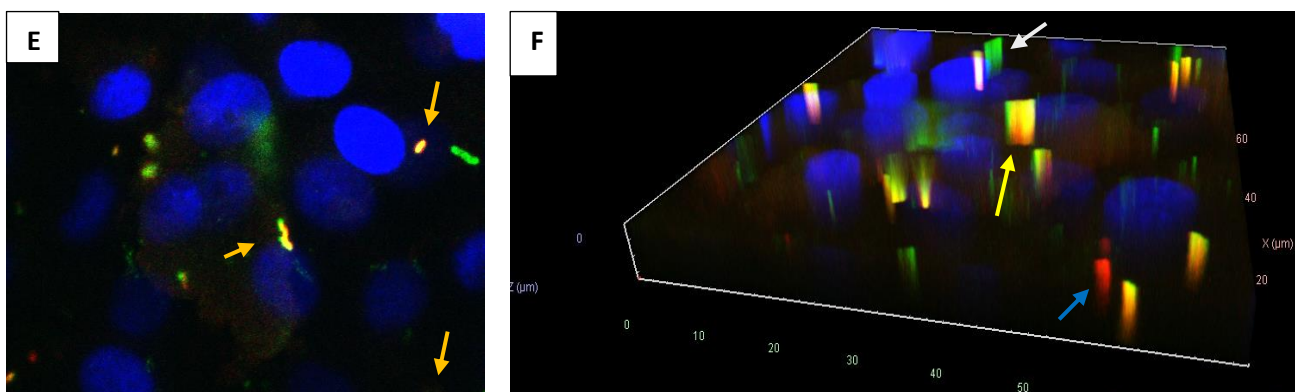
**Figura 3.9.** Microscopia confocal de células IEC-18 infectadas com *Lawsonia intracellularis*. Tempo 45 min. **A)** *L. intracellularis* (–marcações em vermelho) **B)** *Catepsina D* (marcações em verde), **C)** *Núcleo celular* (azul-DAPI), **D)** *Co-localização* de *L. intracellularis* e *Catepsina D* (marcações em amarelo) Microscópio confocal 880/ Zeiss. 40X



**Figura 3.10.** Microscopia confocal de células IEC-18 infectadas com *Lawsonia intracellularis*. Tempo 60 min. **A)** *L. intracellularis* (–marcações em vermelho) **B)** Catepsina D (marcações em verde), **C)** Núcleo celular (azul-DAPI), **D)** Co-localização *L. intracellularis* e Catepsina D (–marcações em amarelo), **E)** Controle negativo, apenas é visualizado o núcleo corado com Dapi. Microscópio confocal 880/ Zeiss. 40X

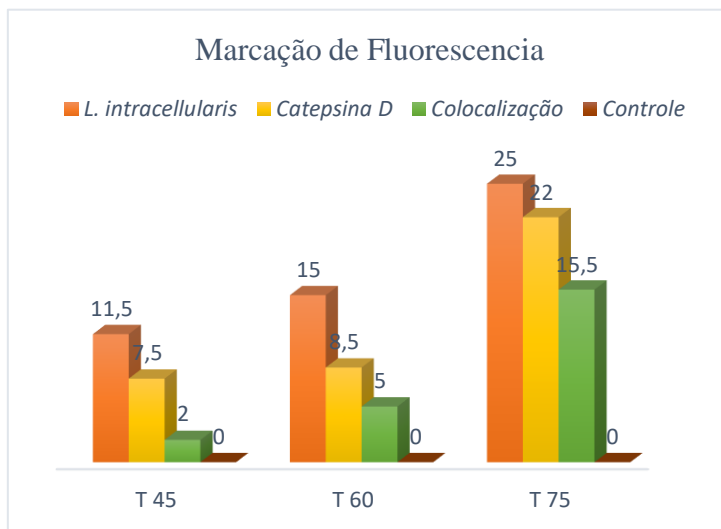


**Figura 3.11.** Microscopia confocal de células IEC-18 infectadas com *Lawsonia intracellularis*. Tempo 75 min. **A)** *L. intracellularis* (–marcações em vermelho) **B)** *Catepsina D* (marcações em verde), **C)** *Núcleo celular* (azul-DAPI), **D)** *Co-localização* de *L. intracellularis* e *Catepsina D* (–marcações em amarelo). A co-localização teve um aumento gradual nos três tempos. Microscópio confocal 880/ Zeiss. 40X

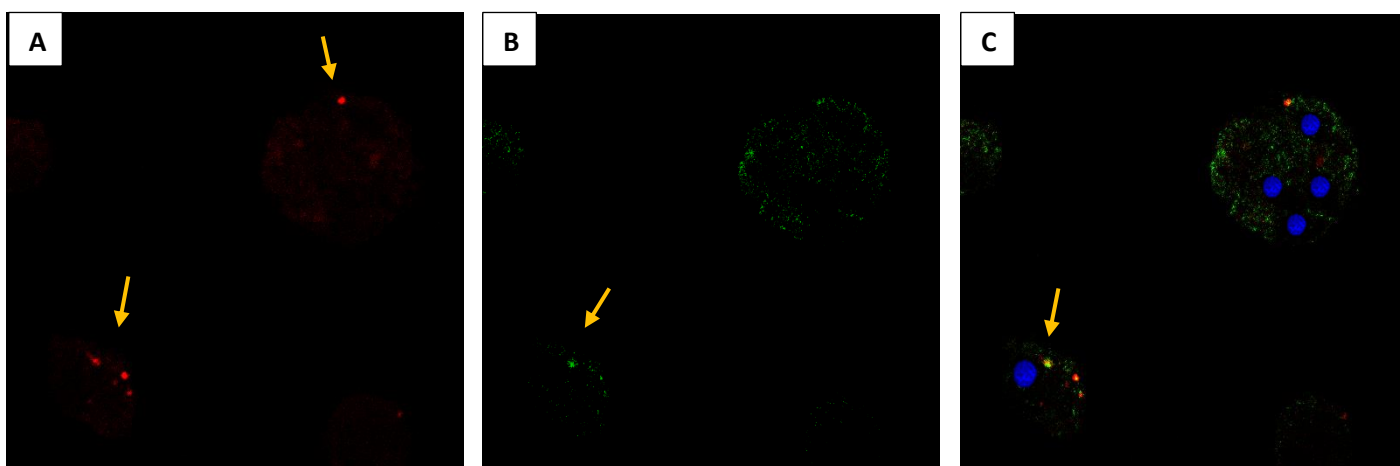


**Figura 3.12.** Microscopia confocal de células IEC-18 infectadas com *L. intracellularis*. Tempo 75 min. **A)** Zoom de células IEC-18 com *L. intracellularis* *co-localizada* com *Catepsina D* (marcações em amarelo), além disso, podem ser observadas marcações de *L. intracellularis* (em vermelho) e *catepsina D* (em verde) isoladamente e não co-localizadas **B)** A mesma imagem, com projeção em 3 D com software Z-Stack, onde é observada claramente as áreas onde *L. intracellularis* encontram-se co-localizadas com *catepsina D*, onde a cor vermelha da bactéria é sobreposta com a cor verde a *catepsina D*, produzindo a cor amarela. Também podem ser observadas áreas marcação isolada de *L. intracellularis* (em vermelho - seta azul) e áreas onde só há marcação de *catepsina D* (em verde - seta cinza). Microscópio confocal 880/ Zeiss. 40X

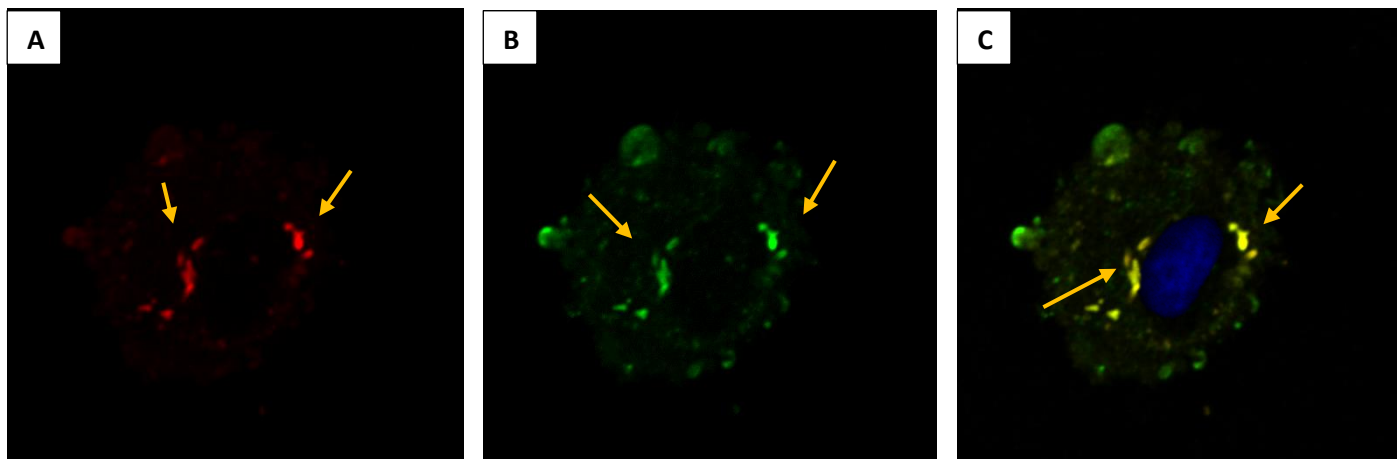




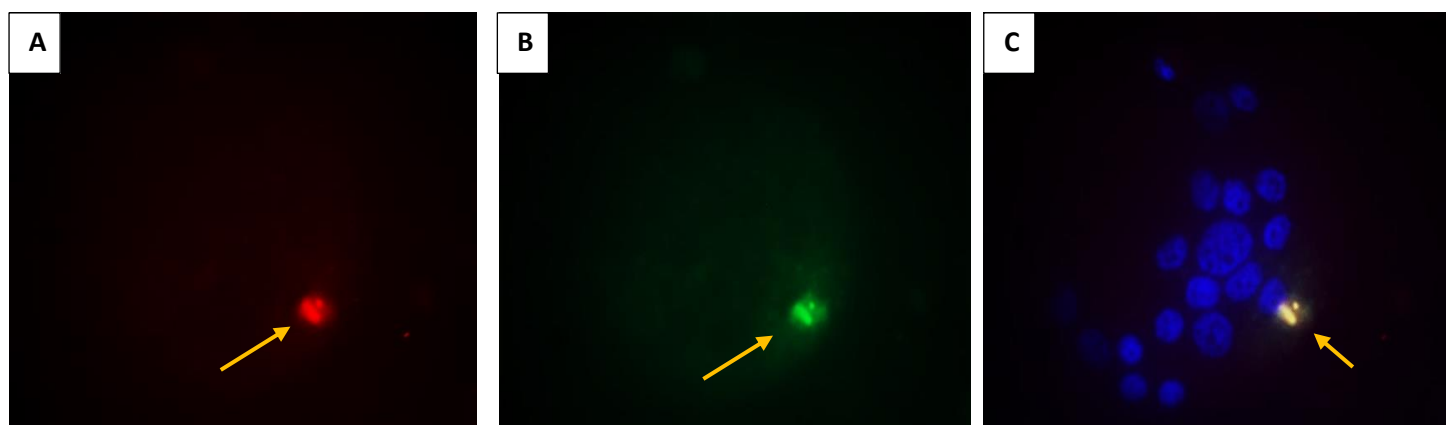
**Figura 3.13:** Quantificação de marcação de fluorescência da *L. intracellularis* (Laranja), Catepsina D (amarelo) e Colocalização (verde) em três diferentes tempo pós-infecção (45, 60 e 75 min). Controle Negativo (vermelho). Média de 2 campos de 40X. Microscópio confocal 880/ Zeiss. Não foi observada diferença estatística entre os tempos de infecção.



**Figura 3.14.** Microscopia confocal de macrófagos suínos infectadas com *Lawsonia intracellularis*. Tempo 75 min. A) *L. intracellularis* (marcações em vermelho) B) Rab 5 (marcações em verde); C) Co-localização *L. intracellularis* e Rab5 (marcação em amarelo). São observadas poucas bactérias e apenas uma área de co-localização neste tempo. Microscópio confocal 880/ Zeiss. 40X.



**Figura 3.15.** Microscopia confocal de macrófagos suínos infectadas com *Lawsonia intracellularis*. Tempo 75 min. A) *L. intracellularis* (seta -vermelha) B) **Rab 7** (seta- verde), C) **Co-localização** *L. intracellularis* e Rab7 (seta - amarelo). São observadas maior quantidade de bactérias e várias áreas de co-localização neste tempo. Microscópio confocal 880/ Zeiss. 40X

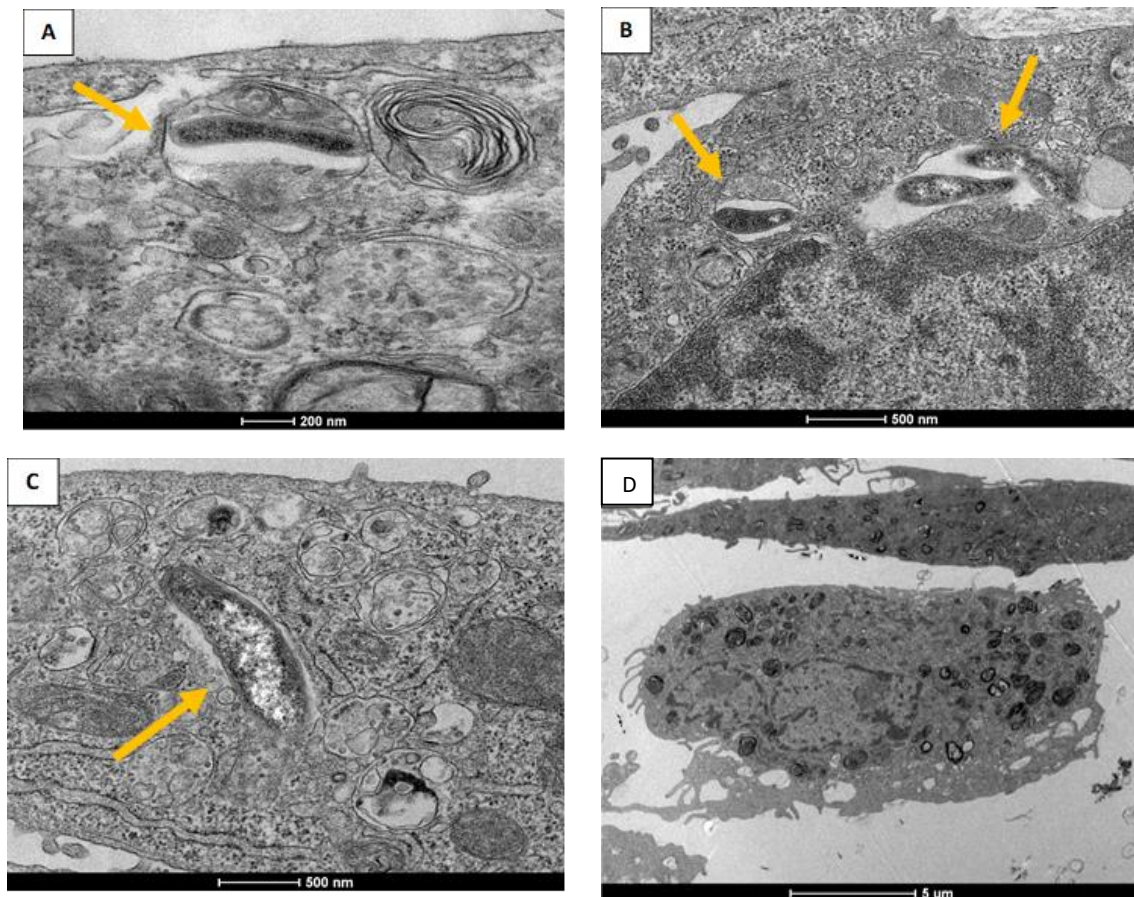


**Figura 3.16.** Microscopia de fluorescência de macrófagos suínos infectadas com *Lawsonia intracellularis*. Tempo 75 min. A) *L. intracellularis* (seta -vermelha) B) **Catepsina D** (seta- verde), C) **Co-localização** *L. intracellularis* e Catepsina D (seta - amarelo).

### Microscopia eletrônica de transmissão

Por microscopia eletrônica de transmissão, foi observada *L. intracellularis* nos diferentes estágios de interação com células IEC-18 e com macrófagos nos tempos 45, 60 e 75 min após infecção. Foi possível observar a bactéria dentro dos fagolisossomos com a parede celular intacta nos três tempos (45, 60 e 75 min) indicando a sobrevivência da

bactéria neste ambiente, tanto nas células IEC-18, quanto em macrófagos (**Figuras 3.17 e 3.18**).



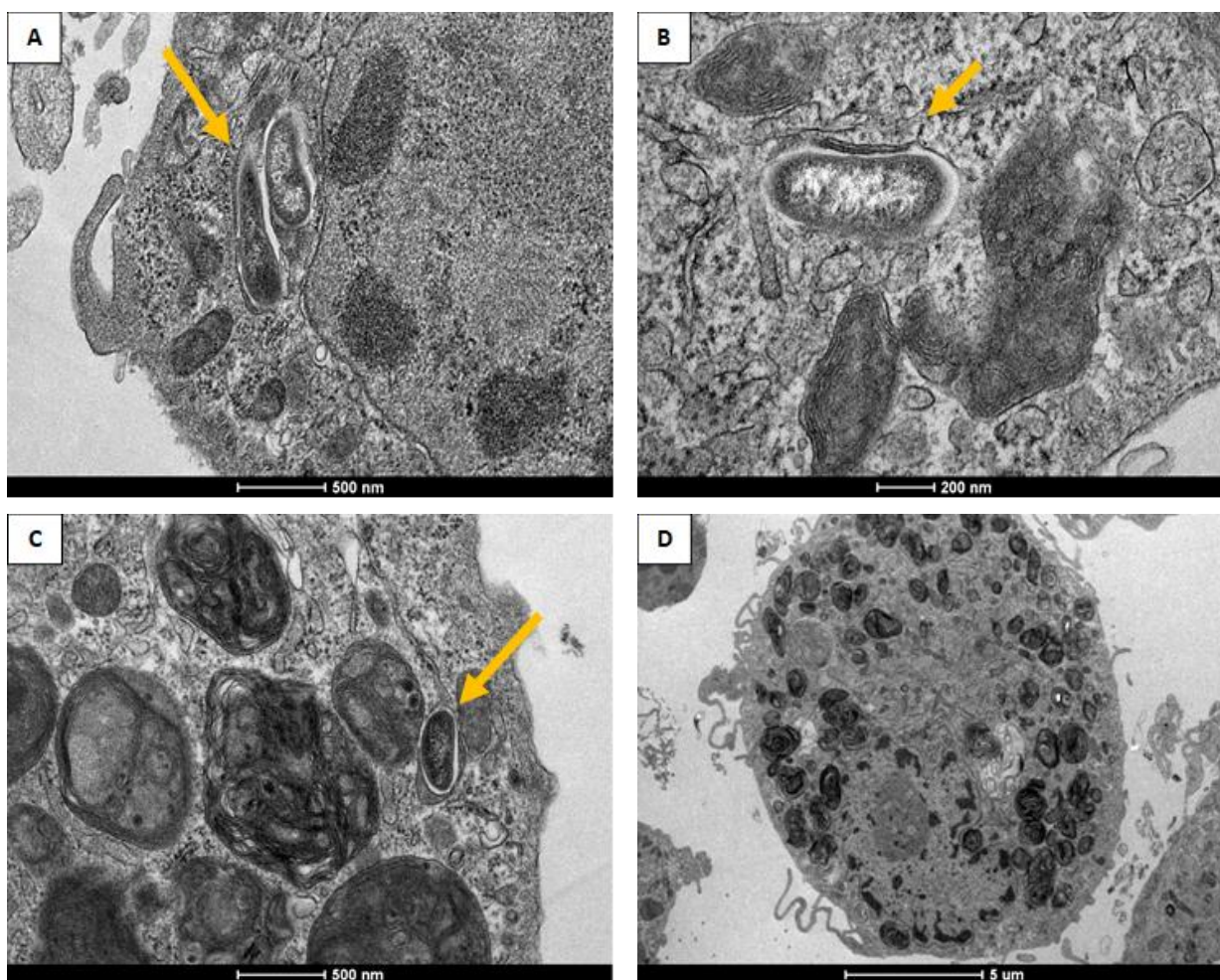
**Figura 3.17.** Células IEC-18 infetadas com *Lawsonia intracellularis* demonstradas por microscopia eletrônica de transmissão. (A): *L. intracellularis* (seta) já internalizada no citoplasma da célula dentro do fagossoma, 45 min pós-infecção. (B) Presença de *L. intracellularis* (seta) no citoplasma. Pode ser observado até duas bactérias dentro de um mesmo fagossoma, aos 60 min pós-infecção. (C) Presença de *L. intracellularis* (seta) no citoplasma, no interior de um fagossoma, 75 minutos pós-infecção e (D) Controle negativo. Em todos os tempos de infecção foi observada a presença de *L. intracellularis* no interior de fagossomos, com envelope bacteriano trilamelar intacto, indicando bactéria íntegra neste ambiente.

### Discussão

Este é o primeiro estudo a investigar de maneira aprofundada o tráfego intracelular de *L. intracellularis*. Reconhecida como uma espécie bacteriana somente em 1993 (LAWSON et al., 1993) *L. intracellularis* infecta células epiteliais do intestino de várias espécies animais, por mecanismos ainda pouco elucidados. No presente estudo de tráfego intracelular de *L. intracellularis* em células epiteliais intestinais e macrófagos suínos, utilizando marcação de co-localização de *L. intracellularis* com as GTPases marcadoras de endossomo precoce, tardio e marcadores de fagolisossomo, foi possível demonstrar o trajeto (tanto no processo de endocitose como fagocitose) que a bactéria realiza após invasão celular. Foi confirmado o envolvimento da Rab 5, como já observado anteriormente (PEREIRA et al., 2019), e determinamos o envolvimento da Rab 7 e Catepsina D no tráfego intracelular dessa bactéria tanto em células epiteliais de intestino como em macrófagos de sangue periférico suíno.

A endocitose é um processo biológico dependente de energia, vital para células eucarióticas, e altamente conservado entre diferentes tipos celulares provenientes de diferentes espécies. Ela acontece com o dinâmico rearranjo da membrana celular, mediado por microtúbulos, filamentos de actina e filamentos intermediários, que são componentes do citoesqueleto da maioria das células eucarióticas (DOHERTY e McMAHON, 2009).

Durante a endocitose, uma porção da membrana plasmática sofre invaginação e forma uma vesícula lipoproteica na porção interior da célula, que é então liberada no citoplasma. Portanto, essa vesícula é constituída de uma porção da membrana plasmática, bem como constituintes do meio externo confinados em uma vesícula intracelular (DOHERTY e McMAHON, 2009). As proteínas Rab, pertencentes à maior família da superfamília Ras, são pequenas proteínas ligadas ao difosfato de guanosina (GTP), e as encarregadas de regular as vias de tráfego intracelular (STENMARK, 2009). Assim o



**Figura 3.18.** Macrófagos suínos infetados com *Lawsonia intracellularis* demonstrados por TEM. (A): *L. intracellularis* (seta) já internalizada no citoplasma da célula dentro do fagossoma. Podem ser observadas até duas bactérias dentro de um mesmo fagossoma aos 45 min pós-infecção. (B) Presença de *L. intracellularis* (seta) no citoplasma, no interior de um fagossoma, 60 min pós-infecção. (C) Presença de *L. intracellularis* (seta) no citoplasma, no interior de um fagossoma, 75 minutos pós-infecção e (D) Controle negativo. Como observado nas células IEC-18, também nos macrófagos, em todos os tempos de infecção, foi observada a presença de *L. intracellularis* dentro de fagossomos, com envelope trilamellar intacto, indicando sobrevivência bacteriana neste ambiente.

processo de endocitose foi demonstrado neste trabalho, onde foi observada a ativação dos endossomos Rab 5 e Rab 7 na internalização da *L. intracellularis*.

A Rab5 ativada interage com seus efetores e envolve o transporte vesicular, tráfego de membrana e vias de sinalização, regula a endocitose precoce, recrutando seus efetores para endossomos iniciais. No presente estudo, observamos a participação da Rab 5 na internalização da *L. intracellularis*, através da observação da co-localização da bactéria com esta GTPase. Assim, confirmamos o envolvimento desde endossomo precoce na infecção por *L. intracellularis*, como já demonstrado anteriormente por Pereira et al. (2018).

Também foi avaliado o envolvimento da Rab 7, mediante sua co-localização *L. intracellularis*. A Rab7 é uma pequena GTPase localizada no compartimento endossomal tardio que se acopla aos lisossomos, desempenhando um papel fundamental na etapa do tráfego vesicular. Assim, a Rab7 funciona em uma etapa posterior em relação a Rab5, sendo uma GTPase muito importante na organização endossomal tardia, controlando a fusão com os lisossomos (VITELLI et al., 1997). Nossos achados também demonstram a co-localização de Rab 7 e *L. intracellularis*, descartando a utilização da via extralisossomal como tráfego intracelular.

Seguindo o processo do tráfego intracelular, foi constatada co-localização de *L. intracellularis* com a cathepsina D, confirmando assim que essa bactéria segue o caminho do fagolisossomo, persistindo e sobrevivendo no interior dessa estrutura. A cathepsina D é uma endopeptidase aspártica lisossômica solúvel, sintetizada no retículo endoplasmático rugoso como pré-procathepsina D. Ela tem uma localização lisossômica, e apresenta a capacidade de clivar proteínas e peptídeos estruturais e funcionais. Esta GTPase tem o papel crucial na autofagia e no sistema endolisossomal, mediando a degradação de agregados proteicos não dobrados (BENES et al., 2008).

Muitas bactérias intracelulares desenvolvem diferentes mecanismos para evasão do sistema de digestão lisossomal e escape para o citosol de células eucariotas. Bactérias como *Salmonella* sp., após serem internalizadas, formam o vacúolo contendo organismos de *Salmonella* (SCV) (GORVEL e MÉRESSE, 2001). Em sequência, o SCV começa a amadurecer como um fagossomo típico, mas a maturação é interrompida antes de atingir o estágio fagolisossomal. Logo após a formação, o SCV se assemelha a um fagossomo inicial, e tanto a Rab5 quanto o efector Rab5 EEA1 estão presentes (GORVEL e BIOGENESIS, 1999).

*Salmonella* permanece dentro deste compartimento com maturação alterada, sendo capaz de fixar residência e, eventualmente, escapar da célula hospedeira para infectar células vizinhas. Neste período, também marcadores tardios presentes no fagolisossomo, como LAMP-1, Rab7, LBPA e cathepsina D, associam-se ao SCV tardio (BRUMELL et al., 2001; MÉRESSE et al., 1999).

Opostamente à *Salmonella*, *L. monocytogenes* utiliza um mecanismo de fuga distinto, já que, uma vez dentro da célula eucariota, tem a capacidade de induzir a ruptura rápida e escape do vacúolo (GAILLARD et al., 1987). Inicialmente, um estudo mostrou que as GTPases Rab5 e Rab7 se localizam nas membranas fagossômicas, indicando que a Rab5 regula eventos iniciais de fusão fagossomo-endossomo e que a Rab7, embora presente, parecia não desempenhar um papel nesses eventos (ALVAREZ-DOMINGUEZ et al., 1996). Porém, em um estudo mais recente (CAIN et al., 2022), foi observado que *L. monocytogenes*, via InlB, promove o recrutamento de Vps34 e induz a geração de PI3P no vacúolo contendo *Listeria* (LVC), aumentando a formação de um fagossomo tardio

Rab7 favorável ao escape. Não está claro se a Rab5 é estritamente necessária para o processo, sugerindo que esta tenha um papel marginal ou acessório no processo.

Espécies patogênicas de *Mycobacterium* internalizadas por macrófagos alteram o programa de maturação intrínseca do fagossomo. Há a hipótese de que isto aconteça mediante a alteração da acidificação fagossômica, o que contribui para a sobrevivência intracelular. Assim, essas bactérias não são mortas e permanecem protegidas do resto do sistema imunológico, gerando uma infecção latente. Em um estudo de macrófagos infectados com *Mycobacterium*, foi descrita que o endossomo inicial Rab5 foi rapidamente adquirido contendo micobactérias patogênicas, porém não foi observada a aquisição do Rab7 no processo (VIA et al., 1997). Por outro lado, em outro estudo, foi observado, através de microscopia imunoeletrônica, que células HeLa infectadas com *M. tuberculosis* recrutaram Rab7. Ou seja, Rab7 foi de fato adquirida pelos vacúolos, embora a associação com LAMP-1 tenha sido defeituosa, revelando que outras etapas, além da aquisição de Rab7, são afetadas por micobactérias e podem levar à interrupção da maturação do fagossomo (CLEMENS et al., 2002).

Não menos importantes, em base a estudos de imunofluorescência, vacúolos contendo *Brucella* (BCVs) recém-formados interagem com compartimentos iniciais da via endocítica, com a participação da Rab5 (LEE et al., 2013). Também foi mostrada sua capacidade de adquirir e reter a glicoproteína endossomal/lisossomal tardia (LAMP-1) e recrutar Rab7 para os BCVs (STARR et al., 2008). Porém, não foi observado nenhum acúmulo significativo de enzimas lisossômicas, como a catepsina D, tanto para células epiteliais como para macrófagos ou células epiteliais nos BCVs. Assim, não sendo observado recrutamento da catepsina D, apenas da Rab5 e Rab7 (PIZARRO-CERDA, et al., 1998).

Os patógenos intracelulares criam várias táticas de sobrevivência, tanto evadindo o sistema imune do hospedeiro, como criando estratégias para evitar a degradação ao longo da via endocítica (HENLEY et al., 1998; METTLEN et al., 2009). Como descrito, existem bactérias que evadem a via endocítica inicial como a *Listeria*, outras que escapam a maturação do fagossomo em vários estágios como *Mycobacterium*. Existem as que evitam a fusão com os lisossomos, como a *Brucella*, e outras, como a *Salmonella*, que tem a capacidade de permanecer dentro do vacúolo, alterar a sua maturação, e fixar sua residência e logo escapar do vacúolo para infectar outras células.

No caso de *L. intracellularis*, há a participação da Rab5 no tráfego intracelular de células epiteliais intestinais, como inicialmente demonstrado (PEREIRA et al., 2018) e confirmado com maior acurácia no presente trabalho. Além da participação da Rab5 no tráfego intracelular de *L. intracellularis*, tanto em células epiteliais intestinais quanto em macrófagos de sangue periférico suíno, também foi observada a participação de marcador tardio (Rab 7) e marcador de fagolisossomo (catepsina D). Estes achados indicam que *L. intracellularis* teria a competência de permanecer dentro do vacúolo, alterar sua maturação, rompê-lo, se multiplicar e invadir as células vizinhas.

Em estudo *in vitro* anterior (McORIST et al, 1995) usando microscopia eletrônica, 10 minutos após incubação de células epiteliais intestinais de rato (IEC-18) com *L. intracellularis*, foi observado o contato íntimo da bactéria com a membrana celular eucariota e internalização bacteriana dentro de vacúolos endocíticos ligados à membrana. Após este tempo (três horas a 24 hs pós infecção), as bactérias foram observadas livres no citoplasma. Para um melhor entendimento do tráfego intracelular, e entendimento do recrutamento de endossomos, no presente estudo, foi escolhido avaliar a entrada da bactéria 45, 60 e 75 min pós-infecção. Nos estudos de tráfego, diferentes tempos de

infecção são importantes de serem avaliados considerando que, dependendo da bactéria em estudo, o recrutamento tanto de endossomos precoces como tardios pode variar devido a essencial aquisição destes marcadores endossomais (CAIN et al., 2022; CLEMENS et al., 2002; PIZARRO-CERDÁ et al., 2000).

Para *L. intracellularis*, observamos um recrutamento do endossomo inicial Rab 5 no tempo 60 (com uma média de 5,5 marcações de colocalização por campo de 40 células cada), marcação nos tempos 45 (3,5 co-localizações) e 75 min (3 co-localizações), porém sem diferença estatística entre os tempos. Já para o recrutamento do endossomo tardio, apenas foram observados achados importantes de co-localização no tempo 75 min (2 marcações de co-localização por campo de 40 células). Isto pode nos levar a pensar que a participação da Rab7 é fugaz ou acessória no tráfego, passando rapidamente a se associar ao retículo endoplasmático e se unir aos fagolisossomos.

Quanto à marcação de co-localização de *L. intracelularis* com o marcador de fagolisossomo, a catepsina D, foi observada marcação de co-localização em todos os tempos, 45 (2 co-localizações), 60 (5,5 co-localizações) e 75 min (15,5 co-localizações). Portanto, logo após internalização de *L. intracellularis*, inicialmente observamos que a bactéria está presente em vacúolos relacionados a via endocítica, segundo o observado por sua co-localização com Rab5, já no primeiro tempo pós-infecção (45 min), sendo observado também a mesma marcação deste endossomo nos tempos posteriores do teste (60 e 75 min). A presença e ou recrutamento da Rab5 co-localizando com a *L. intracellularis*, mostra o envolvimento do endossomo inicial no tráfego de *L. intracellularis*, assemelhando ao observado em *Salmonella* (STEELE-MORTIMER et al., 1999).

Contudo, *L. intracellularis* não permanece apenas neste endossomo inicial, como demonstrado pela aquisição transitória da Rab7, observado apenas 75 min pós-infecção. Isso leva a crer que possa existir uma rápida reciclagem deste endossomo, como observada em *Brucella* (STARR et al., 2008). Porém, para suportar esta hipótese seria importante avaliar a marcação concomitante de LAMP-1 em estudos futuros, considerando que este marcador também possa ser visto em endossomos tardios e na membrana plasmática. Assim, estudos futuros poderiam indicar que o vacúolos contendo *L. intracellularis* estão envolvidos na interação com vesículas contendo glicoproteínas Rab7 e estruturas lisossomais, que são componentes intermediários da via endocítica tardia (MÉRESSE et al., 1999).

Observamos a associação do fagolisossomo ao vacúolo contendo *L. intracelullaris* pela marcação de catepsina D. A co-localização da bactéria com a catepsina D foi observada em todos os tempos, como acontece com a *Salmonella*, que também apresenta uma co-localização linear entre catepsina D e Sifs que aumenta com o tempo de infecção (BRUMELL et al., 2001). Alguns patógenos intracelulares desenvolveram estratégias para evitar essa transformação progressiva de seu vacúolo, pelo recrutamento da capticina D.

Podemos hipotetizar que *L. intracellularis* permanece dentro deste compartimento e que para sua sobrevivência poderia usar os mesmos mecanismos utilizados pela *Salmonella*, que acidifica seu ambiente vacuolar, criando um ambiente de pH ácido para poder sobreviver temporariamente até fugir do vacúolo (COOMBES et al., 2004). Além disso, podemos supor que após a acidificação do vacúolo, uma vez que há aquisição de marcadores lisossomais, a *L. intracellularis* sente a alteração no ambiente e expressa genes necessários para a fuga do vacúolo e localização citoplasmática. Assim, este estudo

é importante para definir os eventos iniciais do tráfego intracelular de *L. intracellularis*, até então desconhecidos.

As observações por microscopia eletrônica de transmissão fortalecem a hipótese de que *L. intracellularis* teria a capacidade de se manter viva dentro do vacúolo fagossômico nos períodos iniciais de infecção. Essa hipótese se baseia no fato de que já que tanto nas células IEC-18 como nos macrófagos *L. intracellularis* foi observada em todos os tempos (45, 60 e 75 min) sempre dentro de um vacúolo com as membranas intactas e não livres no citoplasma.

## Conclusão

Foi demonstrada pela primeira vez o mecanismo do tráfego intracelular precoce de *L. intracellularis*, mostrando o envolvimento das GTPases Rab5, Rab7 e da catepsina D no processo de endocitose bacteriana. Podemos, portanto, deduzir que *L. intracellularis* tem capacidade de sobreviver dentro do vacúolo, antes de se propagar livremente no seu citoplasma e poder invadir células vizinhas.

## Agradecimentos

Ao Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do ICB/UFMG) – UFMG. Ao Biólogo Samuel Tadeu Rocha, Servidor Técnico Administrativo do ICB, pela ajuda no processamento das imagens. Este trabalho foi financiado pela FAPEMIG. RMCG e RLS são beneficiários de bolsas de pesquisa do CNPq, Brasil. MESD contou com o apoio da Fundação CAPES, Ministério da Educação de Brasil.

## Conflito de interesses

Não existe conflito de interesse na condução deste estudo.

## Referencias

ALVAREZ-DOMINGUEZ, C. et al. Phagocytosed Live *Listeria monocytogenes* Influences Rab5-regulated in Vitro Phagosome-Endosome Fusion \*. v. 271, n. 23, p. 13834–13843, 1996.

BENES, P.; VETVICKA, V.; FUSEK, M. Cathepsin D — Many functions of one aspartic protease. v. 68, p. 12–28, 2008.

BRUMELL, J. H. et al. Characterization of *Salmonella* -Induced Filaments ( Sifs ) Reveals a Delayed Interaction Between *Salmonella* -Containing Vacuoles and Late Endocytic Compartments. n. 16, p. 643–653, 2001.

CAIN, R. J.; SCORTTI, M.; MONZÓ, H. J. *Listeria* InlB Expedites Vacuole Escape and Intracellular Proliferation by Promoting Rab7 Recruitment via Vps34. 2022.

CARLOS REAL PEREIRA, T. P. R. et al. ***Lawsonia intracellularis*: Macrophages permissibility, mechanism of cell entry and antimicrobial susceptibility.** [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2018.



- CLEMENS, D. L.; LEE, B.-Y.; HORWITZ, M. A. The Mycobacterium tuberculosis phagosome in human macrophages is isolated from the host cell cytoplasm. **Infection and immunity**, v. 70, n. 10, p. 5800–5807, 2002.
- FRAZER, M. L. Lawsonia intracellularis Infection in Horses: 2005-2007. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 5, p. 1243–1248, 2008.
- GAILLARD, J.-L. et al. In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. **Infection and immunity**, v. 55, n. 11, p. 2822–2829, 1987.
- GORVEL, J. P.; MÉRESSE, S. Maturation steps of the *Salmonella*-containing vacuole. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 14–15, p. 1299–1303, 2001.
- GORVEL, S.-M. O. M. S.; BIOGENESIS, J. P. T. B. H. F. B. B. of *Salmonella typhimurium* containing vacuoles in epithelial cells involves interactions with the early endocytic pathway. **Cell. Microbiol**, v. 1, p. 33–49, 1999.
- GUEDES, R. M. C.; GEBHART, C. J. Preparation and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies against *Lawsonia intracellularis*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, n. 5, p. 438–446, 2003.
- HENLEY, J. R. et al. Dynamin-mediated Internalization of Caveolae. v. 141, n. 1, p. 85–99, 1998.
- JOHNSON, E. A.; JACOBY, R. O. Transmissible ileal hyperplasia of hamsters. II. Ultrastructure. **American Journal of Pathology**, v. 91, n. 3, p. 451–468, 1978.
- LAWSON, G. H.; GEBHART, C. J. Proliferative enteropathy. **Journal of comparative pathology**, v. 122, n. 2–3, p. 77–100, 2000.
- LAWSON, G. H. K. et al. Infection of cultured rat enterocytes by Ileal symbiont intracellularis depends on host cell function and actin polymerisation. **Veterinary Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 339–350, 1995.
- LAWSON, G. H. K. et al. Intracellular bacteria of porcine proliferative enteropathy: Cultivation and maintenance in vitro. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 5, p. 1136–1142, 1993.
- LEE, J. J. et al. Interplay between Clathrin and Rab5 Controls the Early Phagocytic Trafficking and Intracellular Survival of *Brucella abortus* within HeLa cells \*. v. 288, n. 39, p. 28049–28057, 2013.
- McORIST, S. et al. Entry of the bacterium ileal symbiont intracellularis into cultured enterocytes and its subsequent release. **Research in Veterinary Science**, v. 59, n. 3, p. 255–260, 1995.
- MÉRESSE, S. et al. The rab7 GTPase controls the maturation of *Salmonella typhimurium*-containing vacuoles in HeLa cells. **EMBO Journal**, v. 18, n. 16, p. 4394–4403, 1999.
- METTLEN, M. et al. NIH Public Access. v. 37, n. Pt 5, p. 1022–1026, 2009.
- PEREIRA, C. E. R. *Lawsonia intracellularis*: Macrophages permissibility, mechanism of cell entry and antimicrobial susceptibility. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2018.

- PEREIRA, C. E. R. et al. Phenotypic characterization of swine peripheral blood monocyte-derived macrophages and ex vivo infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1–8, 2019.
- PEREIRA, C. E. R. et al. Survival of *Lawsonia intracellularis* in porcine peripheral blood monocyte-derived macrophages. **PLoS one**, v. 15, n. 7, p. e0236887, 2020.
- PIZARRO-CERDA', J. et al. Brucella abortus Transits through the Autophagic Pathway and Replicates in the Endoplasmic Reticulum of Nonprofessional Phagocytes. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 12, p. 5711–5724, 1998.
- PIZARRO-CERDA', J.; MORENO, E.; GORVEL, J. P. Invasion and intracellular trafficking of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 7, p. 829–835, 2000.
- RESENDE, T. P. et al. Effects of *Lawsonia intracellularis* infection in the proliferation of different mammalian cell lines. **Veterinary microbiology**, v. 228, p. 157–164, jan. 2019.
- SCOTT, C. C.; BOTELHO, R. J.; GRINSTEIN, S. Phagosome maturation: A few bugs in the system. **Journal of Membrane Biology**, v. 193, n. 3, p. 137–152, 2003.
- STARR, T. et al. *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. **Traffic**, v. 9, n. 5, p. 678–694, 2008.
- STEELE-MORTIMER, O. et al. Biogenesis of *Salmonella* typhimurium-containing vacuoles in epithelial cells involves interactions with the early endocytic pathway. **Cellular Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 33–49, 1999.
- STENMARK, H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. v. 10, n. AuGuST, 2009.
- VANNUCCI, F. A.; WATTANAPHANSAK, S.; GEBHART, C. J. An alternative method for cultivation of *Lawsonia intracellularis*. **Journal of Clinical Microbiology**, 2011.
- VIA, L. E. et al. Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 20, p. 13326–13331, maio 1997.
- VITELLI, R. et al. Role of the Small GTPase RAB7 in the Late Endocytic Pathway \*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 7, p. 4391–4397, 1997.

## Conclusões gerais

- No Capítulo 1, foi desenvolvido um novo método de quantificação para *L. intracellularis* através da utilização da espectrometria por densidade óptica. Esta nova técnica permitirá o desenvolvimento de experimentos *in vitro* com alta acurácia e precisão, além de obter um resultado rápido e fácil para avaliar e quantificar bactérias em cultivo *in vitro*.
- No Capítulo 2, foram originadas informações relevantes por avaliação *in silico* de genes compartilhados de *L. intracellularis* com um ancestral comum a outras bactérias enteroinvasivas, através do estudo de genes ortólogos. Foi observada ortologia de genes de *L. intracellularis* com várias bactérias intracelulares, principalmente compatíveis com aquelas que apresentam a capacidade de manipular o vacúolo e evadir o sistema de digestão lisossomal.
- No Capítulo 3, foi estudado o tráfego intracelular de *L. intracellularis* no processo de endocitose nas células epiteliais intestinais e em macrófagos. Demonstramos o recrutamento dos endossomos precoces e tardios através da co-localização de Rab5 e Rab7 com *L. intracellularis*, além da participação dos fagolisossomos no processo pelo recrutamento da catepsina D, também co-localizada com *L. intracellularis*.