

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Escola de Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Carlos Renato de Souza Guimarães Filho

Avaliação da Viabilidade de *Lawsonia intracellularis* em Lâmina Própria Intestinal, Placas de Peyer e Linfonodos Mesentéricos de Suínos: Implicações na Patogênese

Belo Horizonte

2025

Carlos Renato de Souza Guimarães Filho

Avaliação da Viabilidade de *Lawsonia intracellularis* em Lâmina Própria Intestinal, Placas de Peyer e Linfonodos Mesentéricos de Suínos: Implicações na Patogênese

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Patologia Animal

Orientador: Professor Roberto Maurício Carvalho Guedes

Belo Horizonte

2025

G963a Guimarães Filho, Carlos Renato de Souza, 1996 -
Avaliação da viabilidade de *Lawsonia intracellularis* em lâmina própria intestinal, placas de Peyer e linfonodos mesentéricos de suínos: implicações na patogênese/ Carlos Renato de Souza Guimarães Filho.- 2025.
47 f: il.

Orientador: Roberto Maurício Carvalho Guedes
Dissertação (Mestrado) apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Animal.

Área de Concentração: Patologia Animal.
Bibliografia: f. 40 a 45.

1. Suíno - Doenças - Teses - 2. Intestino delgado - Teses - 3. Intestinos - Infecções - Teses - I. Guedes, Roberto Maurício Carvalho - II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - III. Título.

CDD – 636.408 96

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



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

FOLHA DE APROVAÇÃO

CARLOS RENATO DE SOUZA GUIMARÃES FILHO

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós Graduação em **CIÊNCIA ANIMAL**, como requisito para obtenção do grau de **MESTRE** em **CIÊNCIA ANIMAL**, área de concentração **Patologia Animal**. Defesa da dissertação intitulada: "**Avaliação da viabilidade de Lawsonia intracellularis em lâmina própria intestinal, placas de Peyer e linfonodos mesentéricos de suínos: Implicações na Patogênese**"

Aprovado(a) em 13 de fevereiro de 2025, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Roberto Mauricio Carvalho Guedes - Orientador(a)
Dr.(a). Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes
Dr.(a). Carlos Eduardo Real Pereira



Documento assinado eletronicamente por **Roberto Mauricio Carvalho Guedes, Professor do Magistério Superior**, em 13/02/2025, às 17:37, 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 14/02/2025, às 09:06, 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 **Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes, Professora do Magistério Superior**, em 14/02/2025, às 10:16, 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, informando o código verificador **3962886** e o código CRC **47E8656C**.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por ter guiado meus passos até aqui e pelo cuidado constante com a minha alma.

À minha família, em especial à vovó, minha eterna gratidão. Tornar-me mestre na mesma instituição onde a senhora trabalhou como cozinheira do bandeirão por tantos anos é um marco significativo para nossa família.

Aos meus pais, obrigado pelo apoio incondicional. Agradeço por investirem nos meus estudos e por nunca duvidarem de que eu chegaria até aqui.

Aos meus irmãos, Reinaldo, Roberta e Gabriele, sou grato por estarem ao meu lado. Ao meu cunhado Renan e ao meu sobrinho Miguel, vocês tornaram esse caminho possível.

Ao “clã da 27”, vocês talvez não saibam, mas o incentivo de vocês foi essencial. Cada momento que passamos juntos me serviu como um fôlego para continuar a trilhar essa jornada. Ao meu bom amigo Gabriel, obrigado por acreditar em mim, eu também acredito em ti.

À Ananesca, obrigado por acreditar neste sonho e me lembrar que ele era possível.

Aos companheiros de laboratório da 213, meu muito obrigado pela parceria e pelo apoio nos momentos certos. Agradeço especialmente ao Dr. Matheus Araújo, que tantas vezes me prestou auxílios, seja na patologia ou na estatística. Aos alunos de iniciação científica, vocês não têm a mínima ideia do quão importantes foram nessa jornada; este laboratório não seria o mesmo sem vocês, todos vocês são meus favoritos.

À professora Paula Giaretta, minha primeira orientadora, graças à oportunidade que me destes, eu ainda estou aqui; isso não seria possível sem ti. Fui tão bem auxiliada pela senhora, que, seja qual for o progresso que eu tenha feito desde então, atribuo-lhe com satisfação. Ao professor Roberto Guedes, não há palavras suficientes para agradecer o favor imensurável que me fez há três anos, ao me aceitar como seu orientando de iniciação científica. Você me mostrou o que é a genialidade e a humildade, professor, muito obrigado por isso!

Finalmente, minha gratidão às técnicas de laboratório, Leimar e Valéria, e às funcionárias da limpeza, Vitalina e Cida, que, com suas próprias vidas, sempre me lembraram que a vida é muito maior do que qualquer título acadêmico.

“Nos, quasi nani super gigantum humeros sumus, quórum beneficio longius, quam ipsi, speculamur, dum antiquorum tractatibus inhaerentes elegantiores eorum sententias, quas vetustas aboleverat, hominumve neglectus, quae jam mortuas in quamdam novitatem essentiae suscitamos”

Pedro de Blois

RESUMO

Lawsonia intracellularis (*L. intracellularis*) é o agente etiológico da enteropatia proliferativa suína, caracterizada pela colonização das células epiteliais intestinais, particularmente nas criptas do íleo. Embora tenhamos alguns acréscimos no entendimento de sua patogênese nesta última década, a disseminação e os locais secundários de colonização ainda não são completamente compreendidos. Este estudo investigou a viabilidade de *L. intracellularis* na lâmina própria e nos linfonodos mesentéricos de suínos infectados. Por meio das técnicas de imuno-histoquímica (IHQ) e hibridização in situ fluorescente (FISH), observou-se marcação nas células epiteliais intestinais e na lâmina própria em todos os animais do grupo infectado. Esses animais, previamente desafiados experimentalmente com *L. intracellularis* em um estudo anterior, apresentavam lesões anatomopatológicas compatíveis com a infecção, e seus blocos de parafina foram utilizados para a presente análise. Houve variação na intensidade da marcação entre os indivíduos. A FISH revelou a presença de *L. intracellularis* predominantemente no epitélio intestinal, além de marcação intracitoplasmática em células intersticiais, sugerindo a liberação de células hospedeiras ou uma possível transição no estágio da infecção. Nos linfonodos mesentéricos, a IHQ detectou antígenos bacterianos, mas a FISH não revelou a presença de microrganismos viáveis. A ausência de marcação nos tecidos linfoides sugere que a bactéria não coloniza diretamente esses tecidos. A pesquisa também abordou a tentativa de utilização combinada das técnicas de IHQ e FISH para dupla marcação fenotípica. No entanto, não foi possível padronizar essa abordagem, uma vez que os anticorpos disponíveis não apresentaram marcação satisfatória, mesmo após múltiplas tentativas de otimização. O estudo contribui para a compreensão da disseminação de *L. intracellularis* e propõe novas abordagens para investigações futuras, como o uso de sondas específicas para a identificação das células hospedeiras.

Palavras-chave: Enteropatia Proliferativa Suína; FISH; rRNA; Imuno-histoquímica; Resposta Imune.

ABSTRACT

Lawsonia intracellularis (*L. intracellularis*) is the etiological agent of porcine proliferative enteropathy, characterized by the colonization of intestinal epithelial cells, particularly in the crypts of the ileum. Although there have been some advances in understanding its pathogenesis over the past decade, the dissemination and secondary sites of colonization remain incompletely understood. This study investigated the viability of *L. intracellularis* in the lamina propria and mesenteric lymph nodes of infected pigs. Using immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in situ hybridization (FISH), labeling was observed in intestinal epithelial cells and in the lamina propria in all animals from the infected group. These animals had been experimentally challenged with *L. intracellularis* in a previous study, presented anatomopathological lesions compatible with the infection, and their paraffin blocks were used for the present analysis. The intensity of labeling varied among individuals. FISH revealed the presence of *L. intracellularis* predominantly in the intestinal epithelium, along with cytoplasmic labeling in interstitial cells, suggesting the release of host cells or a possible transition in the stage of infection. In the mesenteric lymph nodes, IHC detected bacterial antigens, but FISH did not reveal viable microorganisms. The absence of labeling in lymphoid tissues suggests that the bacterium does not directly colonize these sites. The study also addressed the attempted use of combined IHC and FISH techniques for phenotypic double labeling. However, this approach could not be standardized, as the available antibodies did not yield satisfactory labeling, even after multiple optimization attempts. This study contributes to the understanding of *L. intracellularis* dissemination and proposes new approaches for future investigations, such as the use of specific probes to identify host cells.

Keywords: Porcine Proliferative Enteropathy; FISH; rRNA; Immunohistochemistry; Immune Response.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Imuno-histoquímica para *L. intracellularis* em seções de intestino delgado (íleo) e linfonodos mesentéricos de suínos. **(A, B)** Controle negativo, sem marcação detectável: **(A)** corte intestinal em objetiva de 20x e **(B)** detalhe da mesma região em 40x. **(C, D)** Marcação positiva para *L. intracellularis*, evidenciando antígenos do patógeno nas células epiteliais intestinais (setas vermelhas) e em lâmina própria (setas pretas): **(C)** objetiva de 20x e **(D)** 40x. **(E, F)** Linfonodos mesentéricos: **(E)** ausência de marcação no controle negativo e **(F)** marcação positiva em macrófagos no parênquima do linfonodo (setas pretas), indicando a presença de antígenos de *L. intracellularis*. 32
- Figura 2.** Fotomicrografias de tecido intestinal de suíno do grupo controle positivo. As setas amarelas indicam marcações positivas na lâmina própria. **(A)** Coloração com DAPI evidenciando núcleos de células epiteliais e intersticiais (40x). **(B)** Fluorescência vermelha detectada com filtro Cy3 (DsRed), indicando a presença de *L. intracellularis* viáveis em células epiteliais e no citoplasma de células mononucleares da lâmina própria. **(C)** Imagem composta com sobreposição de A e B (40x). **(D)** Ampliação da área destacada em C (63x)..... 33
- Figura 3.** Fotomicrografia de tecido intestinal de animal do grupo controle negativo. **(A)** Coloração DAPI destacando o núcleo de células intersticiais e epiteliais (40x). **(B)** Fluorescência vermelha (filtro Ds-RED), sem marcação positiva para *L. intracellularis*. **(C)** Sobreposição das imagens A e B (40x), confirmando a ausência de fluorescência específica..... 34
- Figura 4.** Fotomicrografia de tecido intestinal com marcação para *L. intracellularis*. **(A)** Coloração DAPI evidenciando células intersticiais e epiteliais (40x). **(B)** Fluorescência vermelha (filtro Ds-RED) indicando áreas positivas para *L. intracellularis*. **(C)** Sobreposição das imagens A e B (40x), com setas amarelas destacando áreas de marcação positiva. **(D)** Imagem em escala de cinza (filtro Ds-RED) auxiliando na visualização das regiões marcadas..... 35
- Figura 5.** Marcação por FISH em tecido de linfonodo mesentérico utilizando DAPI (A, B), sonda específica para *Lawsonia intracellularis* (C, D) e sobreposição de ambas as marcações (E, F). A série de imagens (A, C e E) representa o controle positivo, enquanto a série (B, D e F) corresponde ao controle negativo, sem diferença observável entre os padrões de fluorescência nas amostras analisadas..... 37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação da marcação imuno-histoquímica e fish em tecidos de animais infectados com *Lawsonia intracellularis* (*L. intracellularis*). Avaliação da marcação imuno-histoquímica (IHQ) e Hibridização *in situ* fluorescente (FISH) em lâmina própria e parênquima de linfonodos mesentéricos de animais infectados com *L. intracellularis*. A identificação corresponde ao número do animal, o tecido avaliado compreende íleo e linfonodo mesentérico, o grau de marcação IHQ é indicado em uma escala de 0 a 4, e as colunas de marcação FISH mostram a positividade ou negatividade para *L. intracellularis* em cada região analisada..... **46**

LISTA DE ABREVIATURAS

(qPCR) – real-time PCR

DNA – ácido desoxirribonucleico

EPS – Enteropatia Proliferativa Suína

FISH – Hibridização *in situ* fluorescente

IHQ – Imuno-histoquímica

ISH – Hibridização *in situ*

L. intracellularis – *Lawsonia intracellularis*

PCR – reação em cadeia da polimerase

RNA – ácido ribonucleico

rRNA – RNA ribossômico

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
CAPÍTULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1. Enteropatia Proliferativa Suína.....	15
a) Epidemiologia e Características Gerais	15
b) Ferramentas Diagnósticas: Da Histopatologia ao FISH	16
2. Hibridização <i>in situ</i> no diagnóstico em Medicina Veterinária	18
a. Bases Teóricas.....	19
b. Preparação do Tecido	21
c. Sondas	22
3. Resultados e interpretação da FISH	24
4. Lacunas na Patogênese da EPS	25
CAPÍTULO 2. Avaliação da Viabilidade de <i>Lawsonia intracellularis</i> em Lâmina Própria Intestinal, Placas de Peyer e Linfonodos Mesentéricos de Suínos: Implicações na Patogênese	27
1. Introdução	27
2. Objetivos	28
a. Objetivo Geral.....	28
b. Objetivos Específicos	28
3. Materiais e Métodos.....	29
a. Animais, Amostras e Delineamento Experimental	29
b. Análise Histopatológica e Imuno-Histoquímica	29
c. Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	30
4. Resultados.....	31
5. Discussão.....	34
6. Conclusão.....	38
7. Referências	40
6. Dados Suplementares.....	46

INTRODUÇÃO

As doenças entéricas representam um dos principais desafios sanitários da suinocultura contemporânea, afetando suínos em distintas fases do ciclo produtivo e apresentando variações clínicas conforme a idade dos animais. De etiologia geralmente multifatorial, essas enfermidades tendem a se disseminar rapidamente entre os lotes, frequentemente envolvendo patógenos com resistência a tratamentos convencionais, o que favorece o uso recorrente de antimicrobianos. Os prejuízos decorrentes não se limitam à performance zootécnica, comprometendo também o bem-estar dos animais, a sustentabilidade do sistema produtivo e os protocolos de biossegurança das granjas.

Dentre essas doenças, a enteropatia proliferativa suína (EPS), causada pela bactéria intracelular obrigatória *Lawsonia intracellularis*, se destaca por sua ampla distribuição e impacto econômico. Essa enfermidade manifesta-se por meio de diarreia, atraso no crescimento e, ocasionalmente, morte súbita, sendo reconhecida como uma das mais onerosas à indústria suinícola mundial (Lawson & Gebhart, 2000). Clinicamente, a EPS pode se apresentar de forma aguda, crônica ou subclínica — esta última sendo a mais frequentemente observada em rebanhos comerciais (Lawson & Gebhart, 2000; Kroll *et al.*, 2005; Collins & Barchia, 2014).

O sistema imunológico dos vertebrados é classificado em duas linhas principais de defesa: a imunidade inata e a imunidade adaptativa (Netea *et al.*, 2020). No contexto da infecção por *L. intracellularis*, os mecanismos celulares que compõem a resposta imune ainda não estão completamente esclarecidos (Campillo *et al.*, 2021). A imunidade inata representa a primeira linha de contenção frente ao patógeno, e nos suínos infectados, os sinais iniciais de resposta inflamatória inespecífica são identificados entre dois a três dias após o contato com o agente (Mair *et al.*, 2020). Em casos crônicos, observa-se uma ausência significativa de inflamação nas mucosas intestinais, bem como uma escassez de células imunocompetentes nas áreas acometidas — achado que sugere uma possível supressão da resposta inflamatória promovida pela própria bactéria (McOrist *et al.*, 1992; Riber *et al.*, 2015). Por outro lado, nos quadros agudos, há relatos de acúmulo de macrófagos na mucosa, indicando ativação da resposta imune local (Love *et al.*, 2003; MacIntyre *et al.*, 2003).

Apesar de os eventos iniciais da infecção, particularmente a colonização e interação com o epitélio intestinal, estarem bem documentados, ainda há incertezas quanto à possibilidade de a bactéria transpor essa barreira e atingir compartimentos mais profundos. Vannuci & Gebhart (2014) sustentam que as lesões típicas da EPS permanecem restritas ao epitélio intestinal, sem evidências

de infecção ativa em outros órgãos. No entanto, já foram descritas a presença de antígenos bacterianos em tecidos como os linfonodos mesentéricos e a lâmina própria (Gebhart & Guedes, 2010), o que levanta questionamentos sobre uma possível disseminação celular da bactéria.

A detecção desses antígenos em compartimentos extramucosos, como tecidos linfoides e regiões da lâmina própria, sugere que *L. intracellularis* possa alcançar tais locais possivelmente por meio de células fagocíticas. Essa hipótese tem relevância não apenas para a compreensão da patogênese, mas também para aprimoramentos nas estratégias diagnósticas. Com base nisso, esta dissertação propõe uma investigação da presença de *L. intracellularis* viável em diferentes compartimentos teciduais — como a lâmina própria, placas de Peyer e linfonodos mesentéricos — de suínos experimentalmente infectados, empregando técnicas complementares de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e imuno-histoquímica (IHQ). A FISH é capaz de identificar formas metabolicamente ativas do microrganismo, permitindo distinguir entre infecção ativa e simples presença de antígenos. A comparação com dados obtidos por IHQ também permitirá discutir as vantagens e limitações de ambas as metodologias, além de explorar a caracterização fenotípica das potenciais células hospedeiras.

CAPÍTULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Enteropatia Proliferativa Suína

a) Epidemiologia e Características Gerais

Doenças entéricas referem-se a condições que afetam o sistema gastrointestinal, causando distúrbios digestivos. Essas enfermidades podem acometer diversas espécies animais e geralmente são causadas por agentes infecciosos, como vírus, bactérias e protozoários, que infectam e lesionam o trato gastrointestinal. No contexto da suinocultura, especialmente durante as fases de crescimento e terminação, destacam-se a disenteria suína e a enteropatia proliferativa suína (EPS) como importantes causas de enteropatia em suínos (Zlotowski *et al.*, 2008).

A enteropatia proliferativa suína apresenta uma alta prevalência nos rebanhos suínos em diversos países. Nos Estados Unidos, estima-se uma prevalência em rebanho de aproximadamente 75% (Marsteller *et al.*, 2003), enquanto no Canadá algumas províncias apresentam uma taxa de positividade em rebanhos de até 100% (Paradis *et al.*, 2007). No Brasil, estudos soropidemiológicos indicam uma taxa de positividade superior a 94% nos rebanhos suínos, de acordo com levantamentos realizados por Guedes (2008). Mais especificamente em Minas Gerais, nosso grupo de pesquisa conduziu dois estudos sobre a soroprevalência desse agente. Resende *et al.* (2015) relataram uma prevalência ponderada geral em rebanho de 34,7% em granjas tecnificadas, enquanto Barbosa (2020) observou uma soroprevalência de 97,53% em criatórios suínos.

O agente etiológico da EPS é a *Lawsonia intracellularis*, uma espécie bacteriana Gram-negativa, desprovida de capacidade de formação de esporos. Trata-se de um bastonete curvo, com dimensões entre 1,25 e 1,75 μm de comprimento e 0,25 a 0,43 μm de largura, caracterizado por uma camada externa trilaminar. Sua morfologia pode assumir formas sigmóides, com extremidades nitidamente afiladas (McOrist *et al.*, 1995).

Embora a EPS seja amplamente conhecida como uma doença suína, também há relatos de infecções em outras espécies, como hamsters (Jonas *et al.*, 1965), ovelhas (Cross *et al.*, 1973), raposas (Landsverk, 1981), cobaios (Elwell *et al.*, 1981), equinos (Duhamel & Wheeldon, 1982), coelhos (Umemura *et al.*, 1982), ratos (Vandenbergh & Marsboom, 1982), cães (Collins *et al.*, 1983), furões (Fox *et al.*, 1994), veados (Drolet *et al.*, 1996) e primatas não humanos (Klein *et al.*, 1999).

A *L. intracellularis* afeta primariamente o intestino delgado aboral, especialmente o íleo, mas também pode comprometer o duodeno, jejuno, ceco e cólon. Macroscopicamente, a mucosa intestinal pode apresentar-se espessada e enrugada, acompanhada de áreas de necrose superficial. Microscopicamente, a doença é caracterizada pela proliferação adenomatosa de células epiteliais imaturas (McOrist *et al.*, 1995; Lawson & Gebhart, 2000; McOrist & Gebhart, 2006).

Um dos desafios relacionados às infecções por EPS é a mensuração do impacto econômico na suinocultura, considerando perdas associadas à mortalidade, custos com antibioticoterapia e redução no ganho de peso (McOrist, 2005). A literatura carece de dados sólidos e robustos, mas alguns estudos são amplamente referenciados nessa sub-área. Entre eles, McOrist *et al.* (1997) estimaram um prejuízo de 2 a 7 libras esterlinas por suíno de terminação afetado, enquanto Jensen (2006) relata perdas de 1 a 3 US\$ por animal. Além desses estudos, Holyoake *et al.* (2010) modelaram o impacto econômico da infecção em rebanhos suínos e demonstraram que a infecção subclínica por *L. intracellularis* reduz a receita líquida em 8,33 dólares australianos por suíno, enquanto a infecção clínica leva a uma perda de 13,00 dólares australianos em comparação com rebanhos não infectados. O custo estimado para o controle da enteropatia proliferativa foi de 2,70 dólares australianos por suíno, reforçando a importância do manejo adequado da doença para mitigar prejuízos econômicos.

b) Ferramentas Diagnósticas: Da Histopatologia ao FISH

Um diagnóstico presuntivo de EPS pode ser alcançado com base em achados macroscópicos observados à necropsia e no reconhecimento de lesões histopatológicas em cortes corados por hematoxilina e eosina. Contudo, essas análises não permitem a visualização do agente infeccioso.

Para aumentar a sensibilidade diagnóstica, utiliza-se a técnica desenvolvida por Warthin e Starry em 1920, conhecida como coloração pela prata. Essa técnica é útil na detecção de bactérias argirófilas, incluindo *L. intracellularis*, permitindo identificar enterócitos com bactérias vibrioides ou sigmóides no citoplasma apical (Lawson & Gebhart, 2000). Contudo, sua principal desvantagem é a incapacidade de distinguir infecções por EPS de outros bacilos curvos (Huerta *et al.*, 2003).

Métodos moleculares, como PCR e real-time PCR (qPCR), oferecem maior rapidez e sensibilidade, permitindo a detecção do ácido desoxirribonucleico (DNA) bacteriano em fezes, swabs retais ou segmentos intestinais (Campillo *et al.*, 2021). Entretanto, essas técnicas têm

limitações em estágios precoces da infecção, sendo geralmente eficazes a partir do sétimo dia pós-infecção (Guedes & Gebhart, 2003).

A IHQ é uma técnica amplamente utilizada para diagnóstico de uma gama de patógenos tanto em medicina humana quanto em medicina veterinária. Há ainda uma variação da IHQ que é a imunofluorescência, a diferença entre essas duas técnicas é o método de marcação e revelação, enquanto o primeiro é marcado com um cromógeno no epítipo do anticorpo, conseguimos visualizar a marcação do antígeno com o anticorpo através de cromógenos como o 1463-Amino-9-etilcarbazol (AEC) e o DAB. Na imunofluorescência, não se utilizam cromógenos para a revelação da ligação antígeno-anticorpo. Em vez disso, essa ligação é visualizada por meio de fluorocromos, que emitem fluorescência quando excitados por luz com comprimento de onda específico em microscópios de fluorescência.

Em 1987, McOrist e colaboradores mostraram pela primeira vez a utilização de IHQ para detecção de antígeno em fragmentos intestinais de suínos e hamsters. Desde essa ocasião, os avanços na técnica permitiram o desenvolvimento de métodos mais sensíveis e específicos. Como resultado, atualmente é possível encontrar kits comerciais de anticorpos capazes de detectar material bacteriano de *L. intracellularis*, como, por exemplo, o da Bio-X Diagnostics, Moab a *Lawsonia intracellularis*.

Por fim, tanto essas ferramentas moleculares quanto a imuno-histoquímica (IHQ) possuem sensibilidade maior que a histopatologia tradicional e suas colorações especiais (Jones *et al.*, 1993; Guedes *et al.*, 2002; Guedes *et al.*, 2003a, Huerta *et al.*, 2003), mesmo quando amostras intestinais estão autolisadas ou não exibem lesões macroscópicas típicas (Jensen *et al.*, 1997). Comparativamente, Guedes *et al.* (2002) reportaram as seguintes sensibilidades: 36,8% para histopatologia convencional, 50% para Warthin–Starry, 71,1% para PCR (14 dias após infecção) e 86,8% para IHQ, consolidando esta última como uma das mais confiáveis para diagnóstico pós-morte.

Outros métodos de detecção incluem Hibridização *in situ* (ISH) direcionada ao DNA (Gebhart *et al.*, 1994) e FISH com uma sonda de oligo nucleotídeo direcionada ao RNA ribossômico (rRNA) (Boye *et al.*, 1998). Essa é uma diferença crucial quando comparada as outras principais técnicas de diagnóstico descritas anteriormente, isto é, enquanto a IHQ é capaz de detectar tanto antígeno específico contra a membrana externa, quanto partes imunogênicas de material genético não viável, a ISH/FISH só revelará área que possuem o 16S rRNA, que é uma

molécula lábil, e por isso determina que o agente bacteriano estava vivo no momento da fixação dos tecidos em formalina. Assim sendo, associando a presença do agente viável a lesões.

A confirmação de um diagnóstico preciso de EP só é possível através de técnicas histoquímicas ou moleculares. Nesse caso, tanto a IHC, ISH/FISH são essenciais para confirmar infecções por *L. intracellularis*, porém requerem amostras de tecido na pós-morte, tempo prolongado para processamento e habilidade de um médico veterinário patologista para interpretação da lâmina (Campillo *et al.*, 2021).

2. Hibridização *in situ* no diagnóstico em Medicina Veterinária

O diagnóstico preciso é a pedra angular para o tratamento, prevenção e identificação de diversas patologias em medicina veterinária. As técnicas de diagnóstico nessa área são diversas e abrangem diferentes áreas de conhecimento. Geralmente, o processo se inicia com o exame clínico, que pode ser complementado por outras áreas, como análises laboratoriais, exames de imagem, microbiologia, biologia molecular e histopatologia e suas derivações. Cada uma dessas áreas de diagnóstico possui suas próprias limitações e vantagens. A ISH é uma técnica utilizada na área de biologia molecular para detecção de ácidos nucleicos específicos em células e tecidos, e permite que sejam relacionados com os achados histológicos do tecido. Embora a ISH seja uma técnica amplamente utilizada em medicina veterinária para a detecção de patologias virais, bacterianas, fúngicas e neoplásicas, bem como para o estudo da genética e biologia molecular de diversas espécies animais, ainda existem lacunas no conhecimento sobre as suas limitações e vantagens em diferentes aplicações clínicas. Diante disso, a seguir abordaremos aspectos gerais as aplicações dessa técnica e direcionamento da sua utilização para uma melhor abordagem diagnóstica e terapêutica das enfermidades em animais.

A investigação de ácidos nucleicos por ISH foi relatada pela primeira vez em 1969 (Gall & Pardue, 1969), e desde então tem sido amplamente utilizada tanto na medicina humana quanto na veterinária para o diagnóstico de diversas doenças. O objetivo da técnica é determinar a presença ou ausência de sequências de DNA ou ácido ribonucleico (RNA) de interesse, bem como localizar essas sequências em células específicas ou sítios cromossômicos (Rautenstraub & Liehr, 2002). Sua principal vantagem em relação as técnicas de diagnósticos convencionais, tais como reação em cadeia da polimerase (PCR), cultivo, sorologia, e outras, é que ela revela de que maneira a

distribuição de ácidos nucléicos específicos está relacionada aos produtos proteicos do gene alvo e sua relação com as estruturas celulares (Coulton & de Belleruche, 1992).

De maneira prática, a ISH é utilizada na detecção de agentes infecciosos, como vírus e bactérias, em amostras de tecidos de animais com doenças respiratórias, digestivas, reprodutivas e outras. Além disso, em processos neoplásicos há relatos do seu uso para confirmação de carcinoma de células escamosas, melanoma, linfoma (Fan & Rizkalla, 2003; Ferrara & De Vanna, 2016; Hirobe *et al.* 2016).

Em suínos, essa técnica tem sido usada para diagnóstico de doenças entéricas, tais como *Escherichia coli* e *Brachyspira hyodysenteriae* e *Brachyspira pilosicoli* (Jonach *et al.* 2014; Neves, Gabardo, Guedes, 2017). Dentre as inúmeras doenças que acometem o sistema digestivo dessa espécie, podemos citar a *Lawsonia intracellularis*. Boye *et al.* (1998) mostraram que a ISH permitiu a detecção de *L. intracellularis* em tecidos de suínos com enteropatia proliferativa, possibilitando a identificação direta do patógeno em cortes histológicos.

Uma variação da ISH é a adição de fluorocromo na sonda utilizada, tornando-se assim uma técnica fluorescente denominada Hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Essa técnica tem sido aplicada com sucesso para a rápida identificação de *Leishmania* sp. em amostras de tecidos fixadas em formalina e incluídas em parafina, como demonstrado por Frickmann *et al.* (2013). Este estudo ressaltou a eficácia da FISH como uma alternativa valiosa aos métodos convencionais de diagnóstico, permitindo a identificação precisa de espécies de *Leishmania* em amostras de tecidos. Outra aplicação bem-sucedida da FISH é a detecção e diferenciação rápida de complexo *Mycobacterium tuberculosis* e micobactérias não tuberculosas em amostras de escarro, como demonstrado por Baliga *et al.* (2018).

A seguir, será apresentada uma visão geral da ISH e da FISH em diagnósticos de doenças em animais. Teremos como foco principal o detalhamento da técnica, a preparação do tecido, as variedades de sondas e vantagens e desvantagens do uso dela.

a. Bases Teóricas

A ISH é uma técnica que permite a detecção de sequências específicas de DNA ou RNA em amostras de tecido. Para que a ISH atinja o seu propósito, é necessário que ela possa identificar sequências particulares dentro das células, como descreve Jensen (2014), utilizando-se sondas marcadas que se hibridizam especificamente com sequências complementares de DNA ou RNA naturais e artificiais. Com o desenvolvimento de moléculas repórteres não isotópicas, a ISH tornou-

se uma técnica mais amplamente disponível e acessível, permitindo o uso de sondas oligodesoxinucleotídicas curtas de fita simples para a detecção de sequências específicas (McNicol & Maura, 1997). O uso dessas sondas foi demonstrado em estudos que utilizaram técnicas padrão de histoquímica e imuno-histoquímica (IHC) para a detecção de sequências de DNA ou RNA em amostras de tecido. Portanto, a ISH apresenta-se como uma técnica promissora em diversas áreas da biologia molecular e médica, permitindo a detecção de alterações genéticas em células e tecidos, além de possibilitar a identificação e quantificação de microrganismos viáveis específicos em amostras biológicas.

A FISH é considerada o método citogenético padrão-ouro no diagnóstico de células doentes ou malignas que contêm rearranjos cromossômicos (Carter *et.al*, 1992) ou aberração gênica (Weimer; Kiechle; Arnold 2000). É um método histoquímico que permite a visualização, identificação, enumeração e localização simultânea de microrganismos *in situ*, sem a necessidade de cultivos celulares. O método consiste na visualização direta de marcações fluorescentes em cortes histológicos utilizando microscópios óticos epifluorescentes (Guedes & Neves, 2012). O método FISH se baseia na hibridização de sondas complementares (geralmente sequências de DNA) específicas para uma determinada sequência, que se ligam ao seu alvo dentro da célula (Huber *et al.*, 2018).

Esta técnica consiste num aperfeiçoamento da ISH, que marcaram sondas de rRNA com H3 para visualizar autoradiograficamente genes que codificam rRNA em preparações citológicas de oócitos de *Xenopus laevis* (Gall & Pardue, 1969). Paralelamente a descobertas desses pesquisadores, outros trabalhos foram realizados, como John *et. al* (1969) e Buongiorno-Nardelli e Amaldi (1970) que desenvolveram, independentemente, técnicas de hibridização *in situ* para a detecção de rDNA em *Xenopus* e tecidos embebidos em parafina. Muitos outros trabalhos foram realizados para o aperfeiçoamento desse método de diagnóstico, a fim de que as primeiras limitações da ISH, isto é, a baixa sensibilidade e a disponibilidade limitada de sondas específicas, pudessem ser superadas (Huber *et al.*, 2018).

Na pesquisa de agentes infecciosos, as técnicas de ISH e FISH se destacam em relação à imuno-histoquímica (IHQ), pois permitem a localização espacial do agente, o que sustenta o diagnóstico de lesões causadas por microrganismos comensais de determinados tecidos. Um exemplo disso é *Mycoplasma hyorhinis*, um comensal do trato respiratório de suínos. De acordo com Pereira *et al.* (2017), a detecção desse agente pela PCR nem sempre justifica a causalidade do

evento. Por outro lado, quando detectado por meio de ISH/FISH, pode-se obter um diagnóstico mais sensível e específico devido à visualização dos agentes viáveis intralasionais.

Sendo assim, não é impreciso dizer que a FISH se tornou um dos métodos mais promissores para a citogenética nos últimos anos. Com os avanços tecnológicos ela se estabilizou como metodologia sensível e específica, sendo aplicada em diversas áreas, com uma grande variedade de amostras biológicas, incluindo suspensões de células, tecidos sólidos desagregados, fluidos corporais externos, bem como preparações histológicas (Hackel & Varella-Garcia, 1997; Guerra, 2004).

b. Preparação do Tecido

A técnica de FISH envolve quatro procedimentos básicos, a fixação dos tecidos, a permeabilização de membranas celulares, a hibridização e a lavagem, sendo a hibridização o mais importante deles. Antes de realizar a hibridização, a amostra é fixada e permeabilizada para proteger o RNA da degradação de DNAses e RNAses endógenas e permitir a penetração das sondas na célula, respectivamente. Após a hibridização, as sondas em excesso são removidas por meio de lavagem e a detecção é realizada por microscopia fluorescente (Guedes & Neves, 2012).

De acordo com Chu *et al.* (2019), é importante que a fixação utilizada na ISH preserve tanto a morfologia do tecido quanto a integridade do ácido nucleico. Embora a fixação em formalina seguida de inclusão em parafina possa levar a maior ligação cruzada dos ácidos nucleicos e à diminuição da reatividade, a preservação dos detalhes morfológicos obtidos com esse método pode compensar a perda de sensibilidade em relação aos tecidos frescos congelados, que geralmente apresentam preservação morfológica subótima.

Como dito anteriormente, a ISH baseia-se nas propriedades moleculares do RNA de fita simples, que consiste em duas fitas complementares unidas por pares de bases específicos, que são essenciais para a utilização das sondas. A separação dessas duas fitas complementares é feita geralmente por aquecimento, entretanto alguns autores utilizando a alcalinização. É nesse momento em que as sondas complementares ao DNA alvo ficam disponíveis para realizar a ligação química. Assim que ocorre o resfriamento, ou a acidificação nos casos em que se usa a alcalinização, as fitas voltam a formar a dupla hélice do DNA através do pareamento de bases. Dessa forma, durante a renaturação, as sondas podem competir com as fitas de DNA pela ligação, e assim temos a hibridização que permitirá a localização espacial e visualização do agente (Guerra, 2004).

De acordo com Amann & Fuchs (2008), a etapa de pré-tratamento antes da hibridização é fundamental para um ensaio FISH quantitativo. É necessário preservar a integridade e forma das células, evitando a perda celular por lise, e permitir a permeabilização do maior número possível de células para que os oligonucleotídeos marcados possam se difundir até suas moléculas-alvo de rRNA intracelular. No entanto, a composição da parede celular de bactérias e archaea é diversa, o que torna difícil a definição de um protocolo padrão de permeabilização. Assim, otimizações empíricas levam em consideração a composição específica da parede celular e podem incluir modificações como digestão enzimática de camadas espessas de peptidoglicano por lisozima, digestão de paredes celulares proteicas por proteases, remoção de cera por solventes, uso de detergentes e até incubações em ácido clorídrico. O formaldeído ainda é o principal fixador utilizado.

c. Sondas

Existem diferentes fontes para aquisição de sondas para hibridização, que podem ser obtidas a partir de fragmentos de DNA ou RNA isolados, purificados e amplificados. Essas sondas podem ser projetadas para serem complementares a sequências únicas ou repetitivas do material genético em estudo (Sumner, 2003). Apesar dos avanços significativos na FISH, ainda existem fatores econômicos limitadores que afetam sua adesão generalizada como uma ferramenta de diagnóstico. Um desses fatores é o seu custo elevado em comparação com outras opções disponíveis. Além disso, são necessários equipamentos modernos e caros, como microscópios com filtros epifluorescentes. Outra desvantagem é que as preparações não são permanentes, o que exige o uso de outras ferramentas para complementar a análise. De acordo com Sui e colaboradores (2009), esses desafios são obstáculos significativos para o uso generalizado da FISH, ainda mais quando comparados a ISH.

As sondas utilizadas na ISH podem ser de diferentes tipos, tais como de DNA repetitivo, locus-específicas, de genoma inteiro e pintura cromossômica (Liehr, 2017; Bhat & Wani, 2017). Inicialmente, as sondas eram marcadas radiotivamente, mas atualmente, a marcação não isotópica é mais comum. As sondas não isotópicas utilizam principalmente as moléculas digoxigenina e a biotina, que são hibridizadas aos cromossomos espalhados na lâmina e detectadas com a utilização de anticorpos contra a digoxigenina ou a biotina, ou outros reagentes com afinidade aos haptenos, conjugados com fluorocromos (Trask, 1991).

Outro fator importante na escolha da sonda é o seu tamanho. Os tamanhos de sonda usuais que funcionam para tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina variam de 20 a 500 pares de bases. As sondas desta faixa de tamanho permitem a penetração ideal nas seções de tecido (Chu *et. al*, 2019).

A utilização dos fluorocromos permitiu a evolução da técnica de ISH para a FISH. Nesse caso, a digoxigenina ou biotina são substituídas por fluorocromos, como o Cy3. Nessa técnica, utilizam-se sondas marcadas com fluorocromos. O uso de fluorocromos, além de proporcionar maior segurança, possibilita uma reação mais rápida e a avaliação simultânea de diversas sondas pela utilização de diferentes fluorocromos, de cores diferentes, simultaneamente (Sponchiado *et al.*, 2005). A técnica de FISH é amplamente utilizada em genética clínica, diagnóstico de doenças genéticas, identificação de anomalias cromossômicas e análises de microdeleções, microduplicações e rearranjos cromossômicos em diferentes tipos de amostras biológicas, como sangue, tecidos e líquidos corporais (Liehr, 2017; Bhat e Wani, 2017). Em resumo, a ISH e suas evoluções permitiram avanços significativos na compreensão da organização do material genético e sua relação com diferentes doenças e síndromes genéticas.

Com o progresso do Projeto Genoma Humano e o avanço das ferramentas de bioinformática e síntese de oligonucleotídeos, as sondas FISH sintéticas têm se tornado cada vez mais populares devido à facilidade de projeto e síntese. Esses avanços significativos na marcação de sondas e no desenvolvimento de softwares específicos para a FISH têm impulsionado significativamente a sensibilidade e especificidade da técnica (Huber *et al.*, 2018).

As sondas utilizadas na técnica de FISH para detecção de bactérias tem frequentemente como alvo o 16S rRNA, que é uma região conservada do genoma bacteriano, possuindo uma estrutura bidimensional com regiões mais ou menos acessíveis, que devem ser consideradas no desenho das sondas (Guedes & Neves, 2012). Este gene codifica a subunidade ribossômica menor que é parte do sítio de ocorrência da síntese proteica, por esse motivo foi transmitido ao longo da evolução (Silveira, 2004). O sequenciamento desse gene é uma técnica amplamente utilizada para estudar a diversidade microbiana em diferentes ambientes. A técnica consiste em extrair o DNA das amostras e amplificar a região do gene 16S rRNA, que é altamente conservada e abundante em todas as bactérias, mas não somente nesses organismos. Boye *et al.* (2001) discutem sobre a abundância também em todas as células metabolicamente ativas. Por fim, é importante mencionar

que a diferenciação potencial da técnica depende do grau de condensação do alvo, isto é, da disponibilidade de exposição espacial do alvo (Lakatošová & Holečková, 2007).

3. Resultados e interpretação da FISH

De acordo com Moter & Gobel (2000), embora a técnica de FISH apresente alta sensibilidade e especificidade, é importante destacar que há possibilidade de ocorrência de resultados falsos negativos ou positivos, o que pode levar a resultados equivocados. Como recomendado em todo método de diagnóstico, é essencial que o executante da técnica tenha em mãos grupos de controles positivos e negativos.

Resultados falsos negativos podem ocorrer em ensaios de ISH devido à presença de alvos pouco abundantes nos tecidos, sobreexposição dos tecidos, superpermeabilização dos tecidos antes da hibridização e baixa qualidade do DNA ou degradação do RNA durante o ensaio. Para aumentar a sensibilidade do ensaio e ajudar a detectar números baixos de cópias de alvos específicos, é recomendado o uso de técnicas de ensaio muito sensíveis, incluindo sondas de RNA ou vários coquetéis de sondas de oligonucleotídeos, além da exposição das lâminas a soluções salinas tamponadas em alta temperatura ou vapor. Além disso, é importante desenvolver um protocolo específico de fixação e permeabilização dos tecidos e utilizar luvas e trajes de laboratório adequados para diminuir os efeitos da ribonuclease (Chu *et al.*, 2019).

Por outro lado, a técnica também pode apresentar resultados falsos positivos, que podem ocorrer por diversas razões. Algumas delas incluem a presença de coloração de fundo inespecífica, produtos de reação inespecíficos, artefatos como efeitos de borda, ligação da sonda às moléculas precursoras em vez dos produtos finais, e presença de biotina endógena não extinta. Entretanto, o uso de sondas marcadas com digoxigenina pode ser benéfico para contornar a presença de biotina endógena (Bishop *et al.*, 2002; Kerr *et al.*, 2015; Urbanek *et al.*, 2015; Chu *et al.*, 2019).

Tanto a ISH quanto a FISH têm se mostrado como ferramentas valiosas na pesquisa de agentes infecciosos e na detecção de alterações genômicas em diversas doenças. Em comparação com outras técnicas de diagnóstico molecular, observa-se vantagens significativas, permitindo a localização espacial precisa do alvo, além de sua identificação, sem a necessidade de amplificação prévia do material genético. Por isso, ambas têm sido amplamente utilizadas em diversas áreas, incluindo microbiologia, oncologia, genética e patologia. As pesquisas na área de FISH continuam avançando, com o desenvolvimento de novos protocolos e sondas, permitindo a detecção de alvos

cada vez mais específicos e com maior sensibilidade. A aplicação da FISH na detecção de microrganismos em tecidos infectados tem sido um grande avanço para o diagnóstico de doenças infecciosas, permitindo a identificação de patógenos em amostras clínicas e auxiliando na conduta terapêutica. Portanto, a FISH é uma técnica promissora que tem o potencial de expandir novos horizontes no diagnóstico de doenças.

4. Lacunas na Patogênese da EPS

Diversos estudos empregaram FISH/ISH na tentativa de elucidar a patogênese de *L. intracellularis*. Recentemente, o deslocamento desse patógeno para a lâmina própria tem suscitado debates sobre uma possível rota alternativa de disseminação no trato intestinal. Boutrup *et al.* (2010), por meio de FISH, identificaram a presença do agente nos estágios iniciais da infecção em cortes intestinais. A detecção ocorreu em enterócitos maduros no ápice das vilosidades em dois momentos distintos—12 horas e 5 dias após o desafio oral em suínos, sugerindo a viabilidade da bactéria nesses sítios.

A presença de antígenos bacterianos em linfonodos mesentéricos e células de criptas tonsilares foi previamente documentada por Gebhart & Guedes (2010). No entanto, essa observação foi atribuída ao transporte de antígenos de *L. intracellularis* por macrófagos envolvidos na inativação e degradação do microrganismo. Esse ponto levanta uma questão crítica: sem o uso de ISH/FISH direcionado ao 16S rRNA, não é possível determinar se a bactéria está presente de forma íntegra e viável ou se há apenas vestígios antigênicos. Técnicas convencionais como histopatologia, coloração por prata ou imuno-histoquímica (IHQ) não oferecem essa resposta com a mesma confiabilidade. Dentre essas técnicas apenas ISH/FISH permite detectar a bactéria viável com precisão absoluta, eliminando qualquer dúvida sobre a sua real presença nos linfonodos mesentéricos.

Até o momento, nenhum estudo investigou diretamente *L. intracellularis* íntegra e viável nesses linfonodos, evidenciando uma lacuna fundamental no entendimento da disseminação do patógeno. Os eventos iniciais da interação entre *L. intracellularis* e o hospedeiro ainda não estão completamente esclarecidos. Recentemente, Pereira *et al.* (2018) demonstraram que o patógeno não apenas persiste no citoplasma de macrófagos suínos, mas também se replica intracelularmente. Esse achado reforça a hipótese de que *L. intracellularis* possui mecanismos para evadir as defesas imunológicas inatas, garantindo sua sobrevivência e proliferação no interior dos macrófagos.

Dado o impacto de *L. intracellularis* na sanidade suinícola global e a necessidade de aprofundar o conhecimento sobre sua patogênese, torna-se essencial investigar a viabilidade desse enteropatógeno na cadeia de linfonodos mesentéricos de animais sabidamente infectados.

CAPÍTULO 2. Avaliação da Viabilidade de *Lawsonia intracellularis* em Lâmina Própria Intestinal, Placas de Peyer e Linfonodos Mesentéricos de Suínos: Implicações na Patogênese

1. Introdução

Lawsonia intracellularis é o agente causador da enteropatia proliferativa (EP), uma das principais doenças suínas com grande impacto na suinocultura mundial. Esta enfermidade compromete o desempenho zootécnico dos animais, gerando prejuízos significativos para a produção global. A trajetória de descoberta e classificação de *L. intracellularis* é emblemática. Em 1931, a doença foi inicialmente descrita como um adenoma, sendo associada a sintomas clínicos como diarreia, perda de peso e, ocasionalmente, morte súbita (Biester & Schwarte, 1931). Em 1953, passou-se a adotar o termo “enteropatia proliferativa” para descrever a doença, com base em achados histopatológicos que revelavam proliferação de criptas intestinais (Field; Buntain; Jennings, 1953). Na década de 1970, o grupo liderado pelo Dr. Lawson, no Reino Unido, investigou um surto de EP em suínos e relatou a presença de bactérias intraluminais em animais afetados (Rowland; Lawson; Maxwell, 1973). Esse marco abriu caminho para a caracterização do patógeno. Anos depois, com o sucesso do cultivo e sua manutenção *in vitro*, foi proposto um novo gênero e espécie, *L. intracellularis*, em homenagem ao Dr. Gordon Lawson (McOrist *et al.*, 1995).

Apesar dos avanços, aspectos importantes da biologia e da patogênese de *L. intracellularis* permanecem incompletamente compreendidos. Um dos marcos metodológicos nesse processo foi o trabalho de Boutrup *et al.* (2010), que empregou a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) para detectar a bactéria em tecidos intestinais de suínos experimentalmente infectados, inclusive na lâmina própria. Contribuindo não apenas com a demonstração do agente em diferentes compartimentos intestinais durante os estágios iniciais da infecção, como também para a hipótese de uma rota de disseminação além do epitélio.

Desde os anos 2000, nosso grupo de pesquisa, tem contribuído para o entendimento desse patógeno. Trabalhos como o de Gebhart & Guedes (2010) destacaram a detecção de antígenos bacterianos em linfonodos mesentéricos e células de criptas tonsilares, enquanto Pereira (2018) demonstraram a persistência de *L. intracellularis* no citoplasma de macrófagos suínos. Mais recentemente, Suarez-Duarte (2023) avançaram no entendimento dos mecanismos de infecção intracelular desse microrganismo.

Considerando a relevância de *L. intracellularis* para a sanidade suinícola e as lacunas existentes sobre sua patogênese, este estudo visa investigar se o patógeno está ainda viável no interior de células fagocíticas da lâmina própria intestinal, linfonodos mesentéricos e placa de Peyer. A hipótese é que, após a infecção inicial no epitélio intestinal, *L. intracellularis* utilize os macrófagos como veículo para disseminação, atingindo tecidos linfáticos regionais. Com isso, pretende-se elucidar os mecanismos que sustentam sua persistência do patógeno em diferentes compartimentos, contribuindo para o entendimento da dinâmica infecciosa e para o desenvolvimento de estratégias de controle mais eficazes.

2. Objetivos

a. Objetivo Geral

Investigar a viabilidade de *L. intracellularis* em diferentes compartimentos teciduais de suínos infectados experimentalmente, com foco na lâmina própria, placa de Peyer e nos linfonodos mesentéricos, e explorar estratégias para identificação fenotípica das possíveis células hospedeiras.

b. Objetivos Específicos

- Detectar *L. intracellularis* viável em fragmentos de íleo, placa de Peyer e linfonodos mesentéricos de suínos sabidamente infectados experimentalmente, utilizando a técnica de FISH para evidenciar formas bacterianas metabolicamente ativas no momento da fixação.
- Avaliar a presença de formas viáveis de *L. intracellularis* na lâmina própria, considerando sua possível liberação de células hospedeiras infectadas ou movimentação entre compartimentos teciduais.
- Comparar a positividade obtida pela FISH com dados prévios de IHQ, destacando as diferenças entre detecção de antígenos e de RNA ribossomal, com implicações na avaliação da viabilidade bacteriana.
- Caracterizar o fenótipo das células hospedeiras infectadas, por meio de protocolo combinado de FISH e IHQ.

3. Materiais e Métodos

a. Animais, Amostras e Delineamento Experimental

A pesquisa foi realizada de forma retrospectiva, utilizando amostras de biópsia de linfonodo mesentérico adjacentes a junção ileocecal e mucosa intestinal de suínos diagnosticados com EP, as quais foram obtidas de um experimento anterior realizado na Universidade Federal de Minas Gerais, no Grupo de Patologia Suína. No experimento anterior, um dos grupos de suínos foi desafiado com *L. intracellularis* e diagnosticado com EPS, e outro grupo foi constituído de suínos não desafiados (controle). Para o presente estudo, foram selecionadas 20 amostras de suínos positivos (infectados) e 7 amostras de suínos negativos (controle), cujas amostras de intestino delgado foram fixadas em formalina e incluída em parafina (Luna, 1968). A presença de *L. intracellularis* nas amostras do grupo EPS foi confirmada por imuno-histoquímica (IHQ) tanto nas seções de intestino quanto de linfonodo mesentéricos nos animais positivos e refutada no grupo negativo.

b. Análise Histopatológica e Imuno-Histoquímica

Amostras de linfonodo mesentérico e mucosa intestinal foram processadas histologicamente e incluídas em uma mesma lâmina. Em seguida, seções de 2µm foram preparadas para a realização da análise histopatológica e IHQ.

As lâminas foram analisadas em microscopia óptica. Os achados histológicos intestinais foram categorizados em uma escala de graus de 0 a 3, da seguinte forma: grau 0, histologia normal; grau 1, áreas localizadas de hiperplasia de criptas intestinais; grau 2 áreas multifocais de hiperplasia de criptas; e grau 3 com hiperplasia quase que generalizada das criptas intestinais.

A localização intralésional de *L. intracellularis* em lesões intestinais foi demonstrada por imuno-histoquímica. Resumidamente, os cortes foram desparafinizados, hidratados e incubados com peróxido de hidrogênio a 6% em PBS por 30 minutos, seguidos de incubação a 37 °C com leite desnatado (diluição 1:40) como solução bloqueadora por 45 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo primário policlonal anti-*L. intracellularis* (1:2500 em PBS) em câmara umidificada, à temperatura ambiente, por 45 minutos. Após lavagens em PBS, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado por 30 minutos à temperatura ambiente, lavados novamente e submetidos à revelação com DAB (3,3'-diaminobenzidina) ou AEC (3-amino-9-etilcarbazol), por 30 segundos. Os cortes revelados com DAB foram contracolorados com

hematoxilina de Mayer, desidratados, diafanizados em xilol e montados com resina sintética. Já os cortes revelados com AEC foram contracorados com hematoxilina de Mayer e montados com meio aquoso.

A marcação pela IHQ foi avaliada em uma escala de 0 a 4, onde grau 0 denota a ausência de qualquer marcação para *L. intracellularis*; grau 1 indica a presença de um único foco de marcação antigênica; grau 2 quando há existência de vários focos de marcação antigênica, abrangendo cerca de 25% das criptas; grau 3 é atribuído quando a maioria da mucosa apresentar marcação antigênica, cobrindo de 26 a 80% das criptas; e grau 4 representará a quase totalidade da mucosa intestinal com marcação antigênica, cobrindo mais de 80% das criptas (Guedes & Gebhart, 2003b).

c. Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

Amostras de linfonodo mesentérico e mucosa intestinal foram processadas histologicamente e seccionadas em cortes de 2 μ m, que foram posicionadas juntos em uma mesma lâmina para a realização da técnica de FISH.

Para a detecção de *L. intracellularis* foi selecionada uma sonda específica de RNA. Utilizou-se uma sonda de oligonucleotídeos disponível comercialmente, selecionando uma sonda específica com base na sequência de 16S do rRNA (3'-GATCTCTCTGACGAGGCCAA-5'), conforme previamente descrito por Boye *et al.* (1998), marcadas com o fluorocromo de cianina (Cy3).

Após a desparafinização em estufa a 65 °C, as lâminas foram submetidas à hidratação em séries decrescentes de álcool (álcool absoluto, 90%, 80% e 70%), finalizando-se em água destilada. Em seguida, foram secas à temperatura ambiente, e 80 μ L do tampão de hibridização foram aplicados no centro da lâmina. Esse tampão era composto por SDS a 10%, NaCl 5 M e Tris 1 M (pH 7,2), diluídos em água destilada, armazenado a 4 °C, e porcionado e aquecido a 45 °C em estufa na véspera do uso.

Posteriormente, cada lâmina foi acoplada a um *Disposable Cover Plate*TM limpo e seco, o qual foi inserido em um *Cover Plate*TM *Slide Rack* com tampa turva e fundo contendo água destilada. A sonda de oligonucleotídeo foi previamente diluída na proporção de 1:100 ng/mL em tampão de hibridização e mantida protegida da luz. Foram aplicados 100 μ L da sonda diluída sobre a superfície superior do conjunto *cover plate-lâmina*, que foi então incubado a 45 °C por 16 horas.

Após a etapa de hibridização, realizou-se a lavagem do tecido com uma aplicação de tampão de hibridização seguida de três aplicações consecutivas de tampão de lavagem (composto por NaCl 5 M e Tris 1 M, pH 7,2, diluídos em água destilada), com aproximadamente 1mL por lavagem, previamente aquecido a 45 °C, seguidas de uma lavagem final com água destilada. Ao término, as lâminas foram secas à temperatura ambiente, montadas com solução antifade contendo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e cobertas com lamínula.

Para a análise microscópica dos fragmentos, foi utilizado um microscópio de fluorescência Zeiss Apotome 2.0 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), com o auxílio de óleo de imersão (Immersion Oil Type-F for Fluorescence/Ordinary Microscopy, Olympus®, modelo IMMOIL-F30CC). As fotografias foram processadas no software de código aberto QuPath e, posteriormente, exportadas para o ImageJ.

4. Resultados

A detecção de antígenos de *L. intracellularis* foi observada tanto na lâmina própria e no epitélio intestinal quanto no parênquima dos linfonodos mesentéricos na coloração de IHQ. Todos os animais do grupo positivo apresentaram áreas de marcação em ambos os tecidos na IHQ, enquanto nos animais do grupo controle não foram observadas marcações (Figura 1).

A técnica de FISH revelou que todos os animais do grupo positivo apresentaram marcação epitelial consistente, indicando a presença de *L. intracellularis* no epitélio intestinal. Esse achado está alinhado com a afinidade já descrita da bactéria por células epiteliais, onde ocorre sua principal replicação e estabelecimento da infecção (Figura 2). A intensidade e distribuição da marcação variaram entre os animais, e nem sempre se restringiram ao epitélio.

Em contrapartida, nos animais do grupo negativo não foram detectadas marcações com morfologia compatível em nenhuma das amostras analisadas, observando-se apenas marcações inespecíficas (Figura 3). Em todas as lâminas avaliadas, a FISH não revelou marcações da bactéria, evidenciando a ausência de *L. intracellularis* nesse grupo.

Além das marcações observadas em células epiteliais (Figura 2D), também foram identificadas sinalizações em regiões não epiteliais, especialmente no interior da lâmina própria (Figura 4C).

Nas análises detalhadas da lâmina própria, observou-se que as sinalizações da bactéria ocorriam predominantemente em um padrão compatível com localização intracelular, em

consonância com o comportamento típico de *L. intracellularis* como patógeno intracelular. Em determinados campos, essas sinalizações foram visualizadas fora do epitélio, na região da lâmina própria, no interior de células morfológicamente compatíveis com macrófagos. Embora a

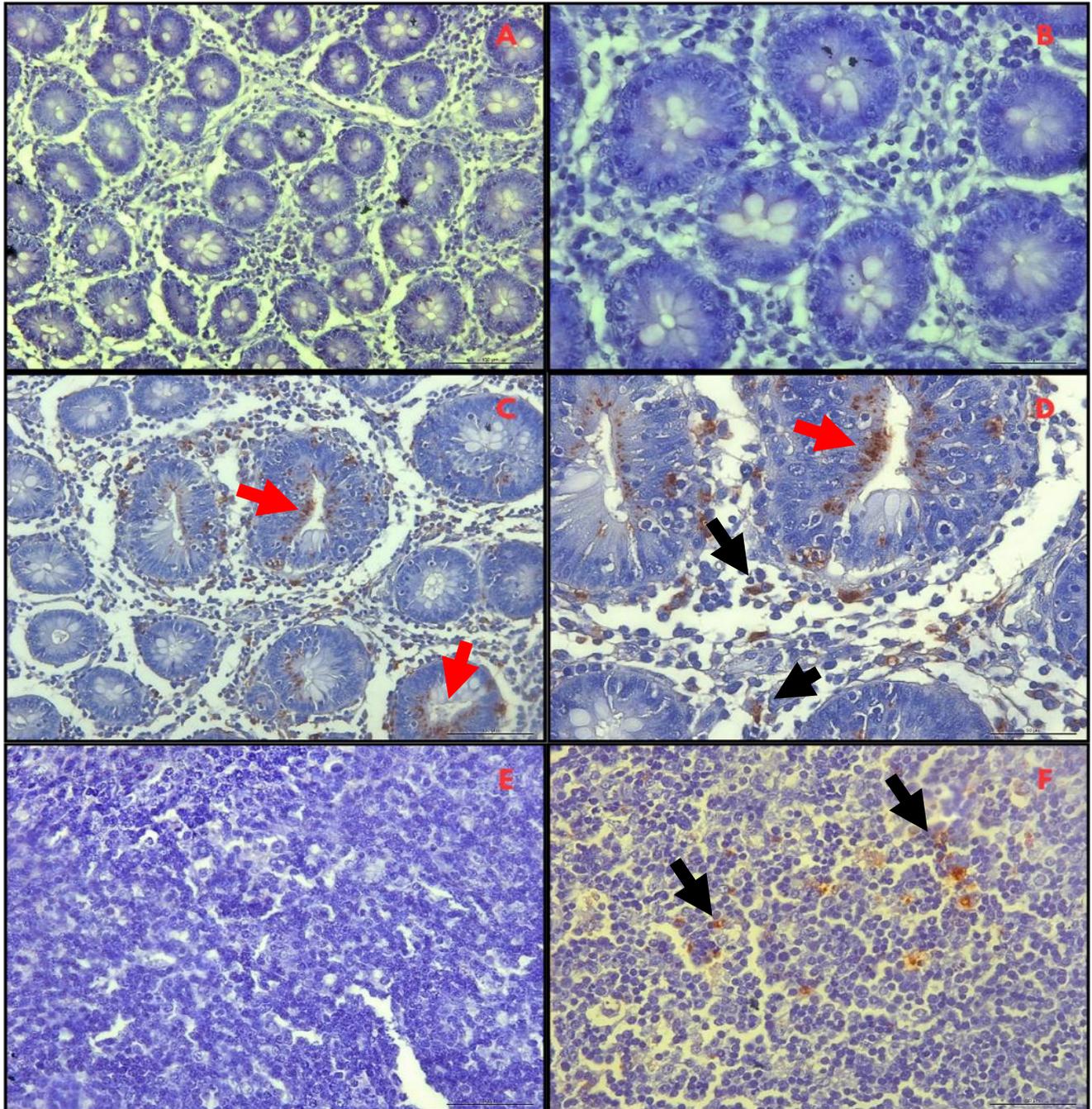


Figura 1. Imuno-histoquímica para *L. intracellularis* em seções de intestino delgado (íleo) e linfonodos mesentéricos de suínos. (A, B) Controle negativo, sem marcação detectável: (A) corte intestinal em objetiva de 20x e (B) detalhe da mesma região em 40x. (C, D) Marcação positiva para *L. intracellularis*, evidenciando antígenos do patógeno nas células epiteliais intestinais (setas vermelhas) e em lâmina própria (setas pretas): (C) objetiva de 20x e (D) 40x. (E, F) Linfonodos mesentéricos: (E) ausência de marcação no controle negativo e (F) marcação positiva em macrófagos no parênquima do linfonodo (setas pretas), indicando a presença de antígenos de *L. intracellularis*.

imunofenotipagem não tenha sido realizada para confirmação, a morfologia celular observada sustenta essa interpretação. Assim, não se pode afirmar que há presença extracelular da bactéria, mas os achados sugerem sua presença em células não epiteliais da mucosa intestinal.

Nas secções de íleo avaliadas, não foi detectado um padrão consistente ou uma preferência clara de marcação associada a áreas específicas da lâmina própria. As regiões marcadas variaram entre áreas adjacentes às criptas intestinais e porções mais apicais da lâmina própria.

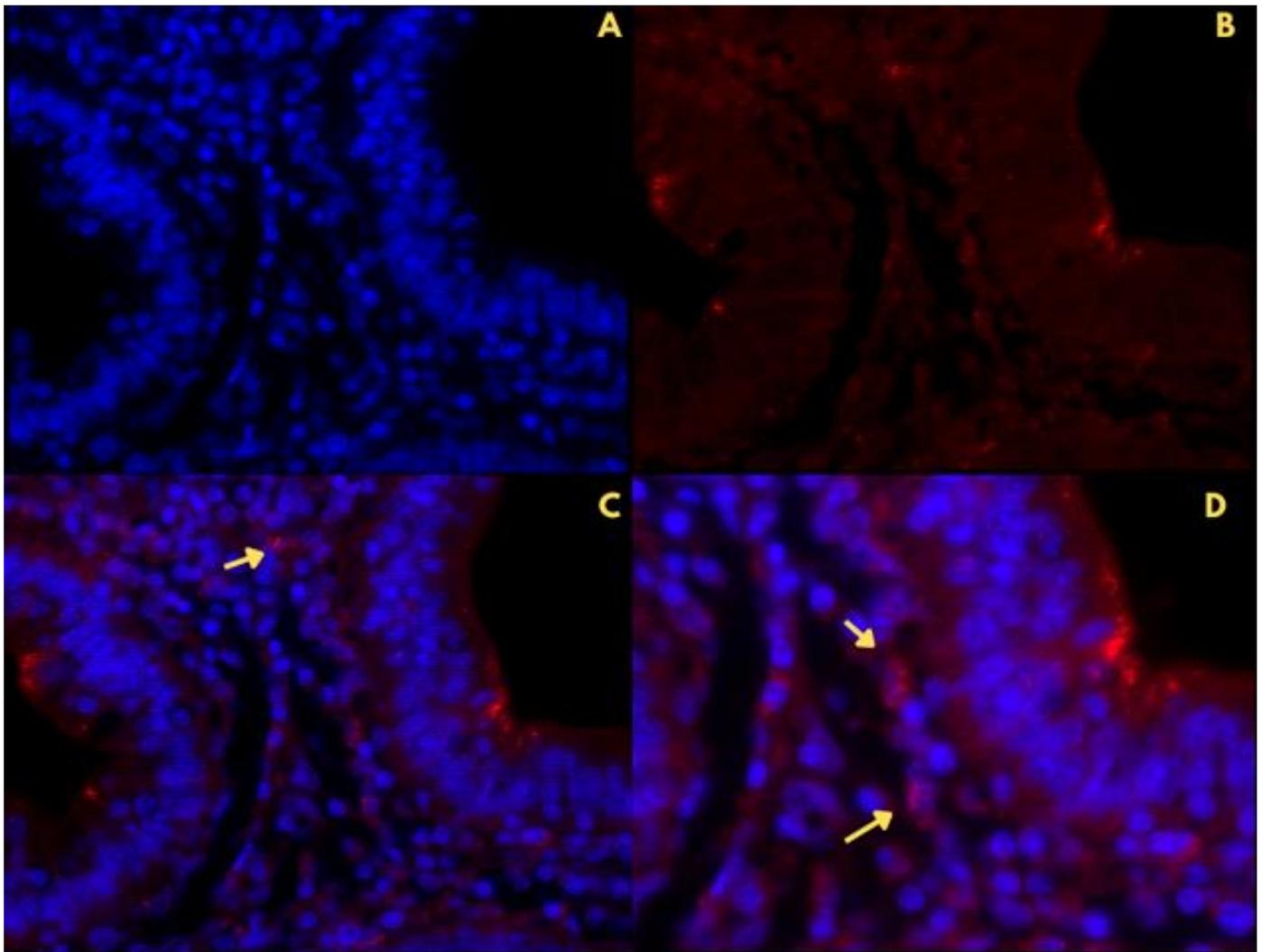


Figura 2. Fotomicrografias de tecido intestinal de suíno do grupo controle positivo. As setas amarelas indicam marcações positivas na lâmina própria. **(A)** Coloração com DAPI evidenciando núcleos de células epiteliais e intersticiais (40x). **(B)** Fluorescência vermelha detectada com filtro Cy3 (DsRed), indicando a presença de *L. intracellularis* viáveis em células epiteliais e no citoplasma de células mononucleares da lâmina própria. **(C)** Imagem composta com sobreposição de A e B (40x). **(D)** Ampliação da área destacada em C (63x).

Por fim, na avaliação dos linfonodos mesentéricos, que anteriormente apresentaram marcação na IHQ, não foram observados focos positivos na FISH (Figura 5), sugerindo que a

detecção pela técnica esteja restrita ao epitélio intestinal e à lâmina própria. Além disso, o tecido linfoide intestinal, representado pelas placas de Peyer, também não exibiu qualquer marcação fluorescente nos animais positivos ou negativos.

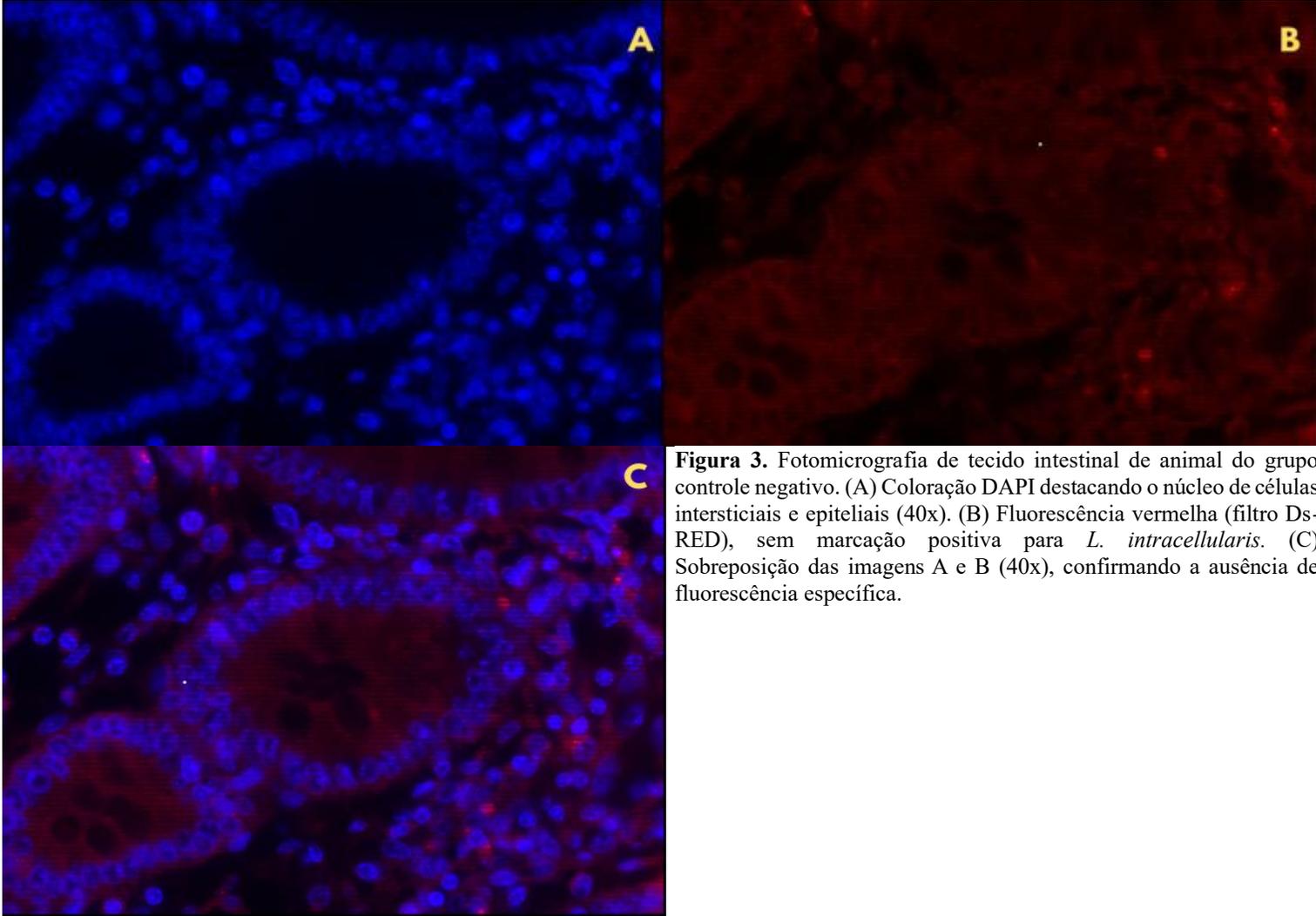


Figura 3. Fotomicrografia de tecido intestinal de animal do grupo controle negativo. (A) Coloração DAPI destacando o núcleo de células intersticiais e epiteliais (40x). (B) Fluorescência vermelha (filtro Ds-RED), sem marcação positiva para *L. intracellularis*. (C) Sobreposição das imagens A e B (40x), confirmando a ausência de fluorescência específica.

5. Discussão

A infecção por *L. intracellularis* é amplamente reconhecida por sua capacidade de causar enteropatia proliferativa em diversas espécies, caracterizada pela colonização predominantemente as células epiteliais das criptas intestinais. Entre essas espécies, os suínos se destacam por serem os mais afetados. No entanto, os mecanismos de disseminação e os locais secundários de colonização durante a infecção ainda não são totalmente compreendidos.

Está é a primeira descrição de *L. intracellularis* viável em lâmina própria de fragmentos de íleo em animais com 21 dias de infecção. Anteriormente, dois outros estudos contribuíram para o entendimento dessa dinâmica, o primeiro conduzido por McOrist *et al.* (1995) com a primeira descrição da invasão de *L. intracellularis* em cultura de células, com um tempo de invasão celular entre 1 e 3 dias pós infecção. Por outro lado, o estudo conduzido por Boutrup *et al.* (2010) trouxe a inovação da exibição de marcação positiva em fragmentos intestinais de animais sabidamente infectados, o que permitiu a ampliação do conhecimento sobre a infecção *in vivo*. Tanto a pesquisa conduzida por Boutrup quanto nosso trabalho não conseguiram responder qual é o perfil fenotípico da célula infectada na lâmina própria.

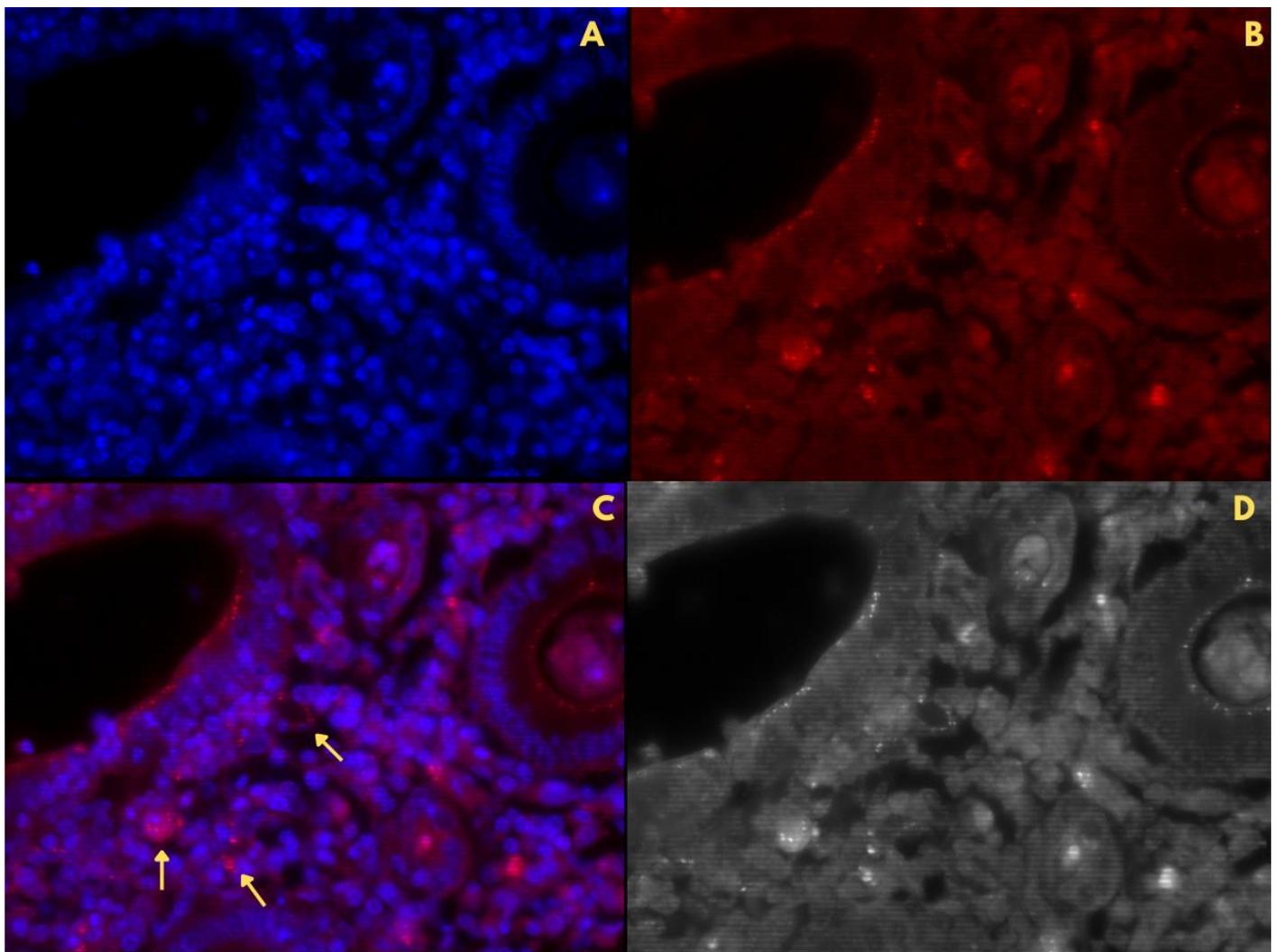


Figura 4. Fotomicrografia de tecido intestinal com marcação para *L. intracellularis*. **(A)** Coloração DAPI evidenciando células intersticiais e epiteliais (40x). **(B)** Fluorescência vermelha (filtro Ds-RED) indicando áreas positivas para *L.intracellularis*. **(C)** Sobreposição das imagens A e B (40x), com setas amarelas destacando áreas de marcação positiva. **(D)** Imagem em escala de cinza (filtro Ds-RED) auxiliando na visualização das regiões marcadas.

Gebhart & Guedes (2010) sugerem que a positividade de linfonodos mesentéricos para *L. intracellularis*, detectada por IHQ, seria resultado do transporte de antígenos bacterianos por células mononucleares, e não da presença de microrganismos viáveis no local. Nossos resultados corroboram essa hipótese, pois não detectamos *L. intracellularis* viáveis no parênquima dos linfonodos mesentéricos através da FISH. Essa diferença entre os métodos não representa uma limitação da IHQ, mas sim uma característica inerente à sua finalidade: a IHQ detecta antígenos bacterianos, independentemente da viabilidade do patógeno, o que a torna uma ferramenta sensível para fins diagnósticos. Por outro lado, a FISH, ao evidenciar RNA ribossomal, é mais adequada para inferir viabilidade e avaliar aspectos funcionais do microambiente infeccioso.

Bactérias intracelulares dependem de diversos mecanismos para evitar a degradação pelo sistema de digestão lisossomal e para escapar para o citosol de células eucarióticas (Suarez-Duarte, 2023). Esses mecanismos têm sido amplamente estudados em bactérias como *Salmonella* e *Listeria*, que apresentam estratégias distintas de evasão do sistema imunológico. Estudos recentes realizados pelo nosso grupo (Suarez-Duarte, 2023) demonstraram que *L. intracellularis* possui a capacidade de permanecer viável dentro de vacúolos citoplasmáticos. Em um momento oportuno, os microrganismos rompem a membrana vacuolar e invadem células adjacentes, garantindo a perpetuação de seu ciclo infeccioso. Nossos achados corroboram essa hipótese, uma vez que detectamos *L. intracellularis* viáveis na lâmina própria, dentro de células hospedeiras, o que pode indicar liberação celular ou uma fase transitória da infecção. Essa observação sugere que o microrganismo é capaz de transitar entre diferentes compartimentos celulares e teciduais, contribuindo para sua capacidade de persistência no hospedeiro e para a progressão da infecção.

Além disso, visualizou-se também estruturas bacterianas semelhantes às descritas por Boutrup *et al.* (2010) em algumas amostras, as quais foram interpretadas como colônias bacterianas. No entanto, como *L. intracellularis* é uma bactéria intracelular obrigatória, essas colônias provavelmente representam agrupamentos de *L. intracellularis* dentro das células hospedeiras, em vacúolos ou outras estruturas subcelulares, e não colônias extracelulares típicas. Ademais, não devemos confundir essas marcações com resíduos de lise celular, uma vez que a FISH detecta apenas os microrganismos viáveis. Investigações adicionais serão necessárias para elucidar os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo e sua relação com a patogênese de *L. intracellularis*.

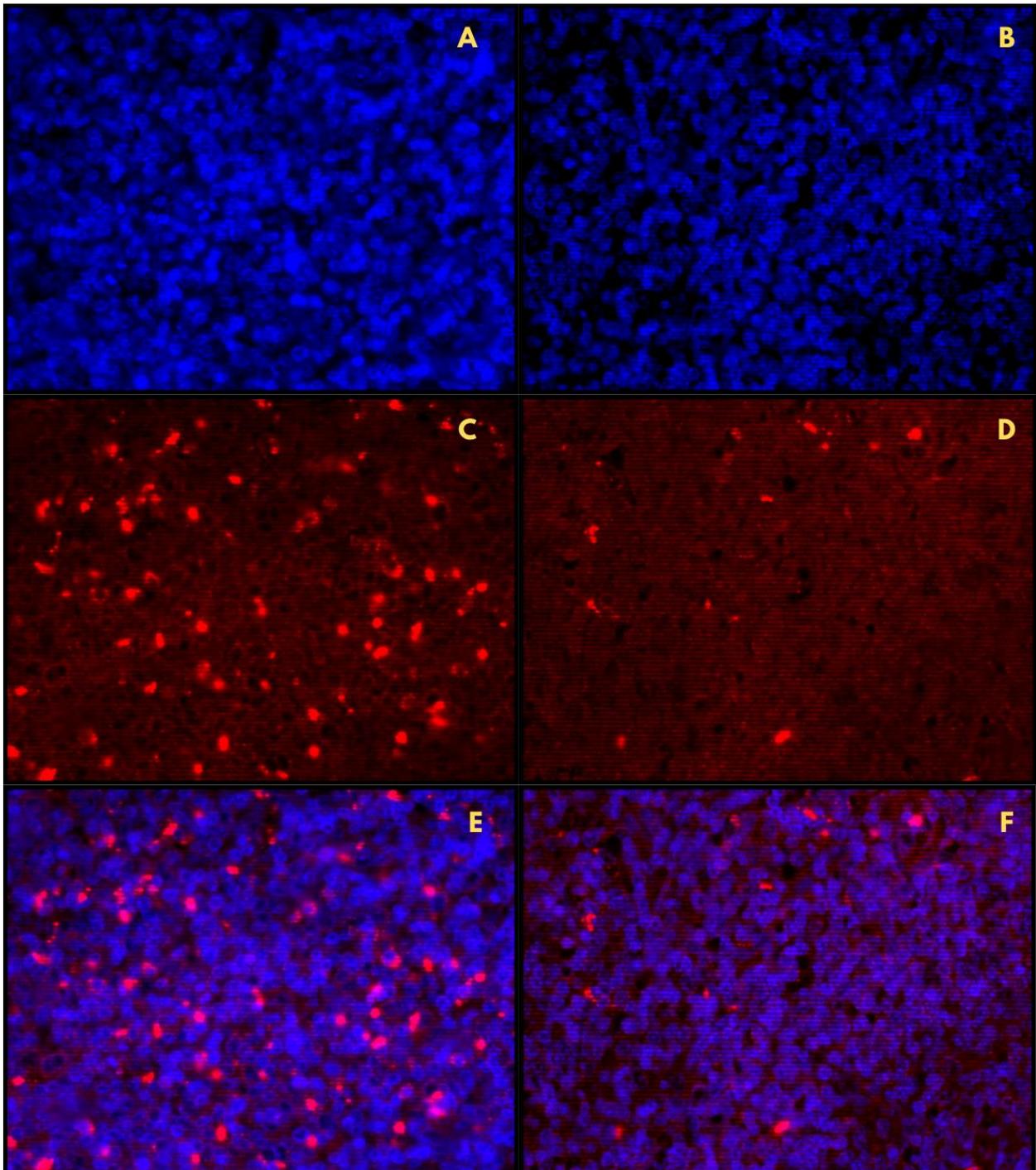


Figura 5. Marcação por FISH em tecido de linfonodo mesentérico utilizando DAPI (A, B), sonda específica para *Lawsonia intracellularis* (C, D) e sobreposição de ambas as marcações (E, F). A série de imagens (A, C e E) representa o controle positivo, enquanto a série (B, D e F) corresponde ao controle negativo, sem diferença observável entre os padrões de fluorescência nas amostras analisadas.

As marcações observadas por FISH na lâmina própria não foram uniformes entre os animais, sendo que alguns indivíduos não apresentaram positividade nessa região. Isso sugere

variações individuais no padrão de disseminação ou colonização bacteriana. No entanto, é importante considerar que a análise foi realizada com base em uma única seção histológica de 2 μm de espessura, representando uma área muito limitada de um segmento intestinal que pode atingir até 18 metros de comprimento.

A ausência de marcação nos tecidos linfoides, tanto nos linfonodos mesentéricos quanto no linfóide intestinal, sugere que, mesmo em casos de infecção ativa, *L. intracellularis* não coloniza diretamente esses tecidos. Esse achado reforça a hipótese de que a bactéria permanece restrita ao epitélio intestinal e à lâmina própria.

Neste estudo, tentamos padronizar um protocolo que combinasse a IHQ com a FISH para obter uma dupla marcação, com o objetivo de classificar fenotipicamente o perfil das células hospedeiras infectadas por *L. intracellularis*. Para isso, foram gentilmente cedidos oito anticorpos monoclonais, produzidos por hibridomas e comumente utilizados em citometria de fluxo. Foram testados nas lâminas histológicas: 74-12-4 (anti-CD4), para marcação de subpopulações de células T; 2A10 (anti-CD163), para monócitos e macrófagos; 1F12 (anti-SLA-II/DR), para células apresentadoras de antígenos, linfócitos B e subpopulações T; e FcG7 (anti-CD16), voltado para células NK, monócitos e macrófagos. Os testes foram realizados em diluições de 1:10, 1:20, 1:40, 1:60 e 1:100, com e sem recuperação antigênica por calor (panela de pressão a 94 °C por 30 segundos, com lâminas imersas em tampão citrato). A incubação variou de 1 a 4 horas à temperatura ambiente e até 16 horas a 4 °C (overnight). Mesmo a literatura descrevendo boa eficácia desses anticorpos em tecidos de suínos, não obtivemos sucesso na padronização do protocolo para os tecidos testados. Diante dessas dificuldades, sugerimos que estudos futuros considerem o uso de sondas específicas para a identificação de células hospedeiras, como as mononucleares. Embora mais onerosas do que os anticorpos convencionais utilizados na IHQ, essas sondas oferecem vantagens importantes, como maior precisão e menor complexidade na rotina de bancada.

6. Conclusão

Em conclusão, observamos a presença de *L. intracellularis* viáveis na lâmina própria aos 21 dias de infecção, um achado que, até o momento, não havia sido previamente demonstrado. No entanto, ainda não se sabe se essa localização faz parte de uma rota natural de infecção utilizada pelo microrganismo ou se ocorre de forma ocasional. Além disso, permanecem incertas as vias de migração da bactéria, ou seja, não está claro se as bactérias se deslocam diretamente das criptas

para o interstício, se migram da cripta para o interstício por outra rota ou se ambas as possibilidades coexistem.

Esse achado levanta importantes questões sobre a patogênese de *L. intracellularis* e ressalta a necessidade de novas investigações. Estudos futuros devem focar na identificação fenotípica das células infectadas, particularmente aquelas presentes no interstício, para compreender melhor os mecanismos de interação entre a bactéria e o tecido hospedeiro. A realização de marcações específicas para caracterizar os tipos celulares envolvidos pode fornecer insights essenciais sobre os eventos celulares e moleculares que ocorrem durante a infecção.

7. Referências

- Baliga, S., Murphy, C., Sharon, L., *et al.* (2018). Rapid method for detecting and differentiating *Mycobacterium tuberculosis* complex and non-tuberculous mycobacteria in sputum by fluorescence in situ hybridization with DNA probes. *International Journal of Infectious Diseases*, 75, 1–7.
- Barbosa, J. C. R. (2020). *Soroprevalência entre as Mesorregiões: Análise das soro positivities dos animais amostrados de criatórios nas mesorregiões de Minas Gerais-MG, 2016*. Dissertação de Mestrado, 61 p. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Bhat, T. A., & Wani, A. A. (Eds.). (2017). *Chromosome structure and aberrations*. Springer.
- Biester, H. E., & Schwarte, L. H. (1931). Intestinal adenoma in swine. *The American journal of pathology*, 7(2), 175.
- Bishop, J. A., Lewis, J., Rocco, J. W., & Faquin, W. (2015). HPV-related squamous cell carcinoma of the head and neck: An update on testing in routine pathology practice. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 344–351.
- Boutrup, T. S., Boesen, H. T., Boye, M., Agerholm, J. S., & Jensen, T. K. (2010). Early pathogenesis in porcine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. *Journal of Comparative Pathology*, 143(2-3), 101-109.
- Boye, M., Jensen, T. K., Ahrens, P., Hagedorn-Olsen, T., & Friis, N. F. (2001). In situ hybridisation for identification and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyosynoviae* and *Mycoplasma hyorhinis* in formalin-fixed porcine tissue sections. Note. *Apmis*, 109(10), 656-664.
- Boye, M., Jensen, T. K., Møller, K., Leser, T. D., & Jorsal, S. E. (1998). Specific detection of *Lawsonia intracellularis* in porcine proliferative enteropathy inferred from fluorescent rRNA *in situ* hybridization. *Veterinary pathology*, 35(2), 153-156.
- Buongiorno-Nardelli, M., & Amaldi, F. (1970). Autoradiographic detection of molecular hybrids between rRNA and DNA in tissue sections. *Nature*, 225, 946–948.
- Campillo, M., Smith, S. H., Gally, D. L., & Opriessnig, T. (2021). Review of methods for the detection of *Lawsonia intracellularis* infection in pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 33(4), 621-631.
- Carter, N. P., Ferguson-Smith, M. A., Perryman, M. T., Telenius, H., Pelmeur, A. H., Leversha, M. A., ... & Dyson, H. M. (1992). Reverse chromosome painting: a method for the rapid analysis of aberrant chromosomes in clinical cytogenetics. *Journal of medical genetics*, 29(5), 299-307.
- Chu, Y. H., Hardin, H., Zhang, R., Guo, Z., & Lloyd, R. V. (2019, September). In situ hybridization: Introduction to techniques, applications and pitfalls in the performance and interpretation of assays. In *Seminars in diagnostic pathology*(Vol. 36, No. 5, pp. 336-341). WB Saunders.
- Collins, A. M., & Barchia, I. M. (2014). The critical threshold of *Lawsonia intracellularis* in pig faeces that causes reduced average daily weight gains in experimentally challenged pigs. *Veterinary Microbiology*, 168(2-4), 455-458.

Collins, J. E., Libal, M. C., & Brost, D. (1983). Proliferative enteritis in two ups. *JAVMA*, 183(8), 886-889.

Coulton, G. R. (Gary R.), & De Bellerocche, J. (1992). *In situ hybridization : medical applications*. Kluwer Academic Publishers.

Cross, R. F., Smith, C. K., & Parker, C. F. (1973). Terminal ileitis in lambs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 162(7), 564-566.

DUARTE, Mirtha Elizabet Suarez. *Lawsonia intracellularis: tráfego intracelular precoce e fatores de virulência*. 2023. Tese Doutorado em Ciência Animal – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2023.

Duhamel, G. E., & Wheeldon, E. B. (1982). Intestinal adenomatosis in a foal. *Veterinary Pathology*, 19(4), 447-450.

Elwell, M. R., Chapman, A. L., & Frenkel, J. K. (1981). Duodenal hyperplasia in a guinea pig. *Veterinary pathology*, 18(1), 136-139.

Fan, Y. S., & Rizkalla, K. (2003). Comprehensive cytogenetic analysis including multicolor spectral karyotyping and interphase fluorescence in situ hybridization in lymphoma diagnosis: A summary of 154 cases. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 143(1), 73–79.

Ferrara, G., & De Vanna, A. C. (2016). Fluorescence in situ hybridization for melanoma diagnosis: A review and a reappraisal. *The American Journal of Dermatopathology*, 38(4), 253–269.

Field, H. I., Buntain, D., & Jennings, A. R. (1953). Terminal or regional ileitis in pigs. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, 63, 153-IN12.

Fox, J. G., Dewhirst, F. E., Fraser, G. J., Paster, B. J., Shames, B., & Murphy, J. C. (1994). Intracellular Campylobacter-like organism from ferrets and hamsters with proliferative bowel disease is a *Desulfovibrio* sp. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(5), 1229-1237.

Frickmann, H., Alnamar, Y., Essig, A., Clos, J., Racz, P., Barth, T. F., ... & Poppert, S. (2012). Rapid identification of *Leishmania* spp. in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples by fluorescence in situ hybridization. *Tropical Medicine & International Health*, 17(9), 1117-1126.

Gall, J. G., & Pardue, M. L. (1969). Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 63(2), 378–383.

Gebhart, C. J., McOrist, S., Lawson, G. H. K., Collins, J. E., & Ward, G. E. (1994). Specific in situ hybridization of the intracellular organism of porcine proliferative enteropathy. *Vet pathol*, 31(4), 462-467.

Gebhart, C. J., & Guedes, R. M. C. (2010). *Lawsonia intracellularis*. In K. L. Gyles, J. F. Prescott, J. G. Songer, & C. O. Thoen (Eds.), *Pathogenesis of bacterial infections in animals* (4th ed., pp. 503–512). Wiley-Blackwell.

Guedes, R. M. C. (2002). *Porcine proliferative enteropathy: diagnosis, immune response and pathogenesis*. University of Minnesota.

- Guedes, R. M. C. (2008). Infecção por *Lawsonia intracellularis*: um problema recorrente nasuicultura do Brasil. *Acta Scientiae Veterinariae*, 36(1), s77-s80.
- Guedes, R. M., & Gebhart, C. J. (2003a). Comparison of intestinal mucosa homogenate and pure culture of the homologous *Lawsonia intracellularis* isolate in reproducing proliferative enteropathy in swine. *Vet microbiol*, 93(2), 159-166.
- Guedes, R. M., & Gebhart, C. J. (2003b). Preparation and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies against *Lawsonia intracellularis*. *JVDI*, 15(5), 438-446.
- Guedes, R. M., Gebhart, C. J., Winkelman, N. L., Mackie-Nuss, R. A., Marsteller, T. A., & Deen, J. (2002). Comparison of different methods for diagnosis of porcine proliferative enteropathy. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 66(2), 99.
- Guerra, M. (2004). Citogenética vegetal: Algumas considerações metodológicas. In M. Guerra (Ed.), *FISH: Princípios, técnicas e aplicações* (pp. 13–20). Editora Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Hackel, C., & Varella-Garcia, M. (1997). Interphase cytogenetics using fluorescence in situ hybridization: An overview of its application to diffuse and solid tissue. *Brazilian Journal of Genetics*, 20, 97–106.
- Hirobe, M., Masumori, N., Tanaka, T., Kitamura, H., Tonooka, A., Hasegawa, T., & Tsukamoto, T. (2016). Clinicopathological characteristics of Xp11. 2 translocation renal cell carcinoma in adolescents and adults: Diagnosis using immunostaining of transcription factor E3 and fluorescence in situ hybridization analysis. *International Journal of Urology*, 23(2), 140-145.
- Holyoake, P. K., Collins, A., & Mullan, B. P. (2010). Simulation of the economic impact of *Lawsonia intracellularis* infection.
- Huber, D., Von Voithenberg, L. V., & Kaigala, G. V. (2018). Fluorescence in situ hybridization (FISH): History, limitations and what to expect from micro-scale FISH?. *Micro and Nano Engineering*, 1, 15–24.
- Huerta, B., Arenas, A., Carrasco, L., Maldonado, A., Tarradas, C., Carbonero, A., & Perea, A. (2003). Comparison of diagnostic techniques for porcine proliferative enteropathy (*Lawsonia intracellularis* infection). *Journal of Comparative Pathology*, 129(2-3), 179-185.
- Jensen, E. (2014). Technical review: In situ hybridization. *The Anatomical Record*, 297(8), 1349–1353.
- Jensen, H. M. L. (2006). Health management with reduced antibiotic use—experiences of a Danish pig vet. *Animal biotechnology*, 17(2), 189-194.
- Jensen, T. K., Møller, K., Leser, T. D., & Jorsal, S. E. (1997). Comparison of histology, immunohistochemistry and polymerase. *European Journal of Veterinary Pathology*, 3(3).
- John, H. A., Birnstiel, M. L., & Jones, K. W. (1969). RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature*, 223, 582–587.
- Jonach, B., Boye, M., Stockmarr, A., & Jensen, T. K. (2014). Fluorescence in situ hybridization investigation of potentially pathogenic bacteria involved in neonatal porcine diarrhea. *BMC Veterinary Research*, 10, 1-8.

Jonas, A. M., Tomita, Y., & Wyand, D. S. (1965). Enzootic intestinal adenocarcinoma in hamsters. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 147(10), 1102-1108.

Jones, G. F., Davies, P. R., Rose, R., Ward, G. E., & Murtaugh, M. P. (1993). Comparison of techniques for diagnosis of proliferative enteritis of swine. *American journal of veterinary research*, 54(12), 1980-1985.

Kerr, D. A., Arora, K. S., Mahadevan, K. K., Hornick, J. L., Krane, J. F., Rivera, M. N., ... & Faquin, W. C. (2015). Performance of a branch chain RNA in situ hybridization assay for the detection of high-risk human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma. *The American journal of surgical pathology*, 39(12), 1643-1652.

Klein, E. C., Gebhart, C. J., & Duhamel, G. E. (1999). Fatal outbreaks of proliferative enteritis caused by *Lawsonia intracellularis* in young colony-raised rhesus macaques. *Journal of medical primatology*, 28(1), 11-18.

Kroll, J. J., Roof, M. B., Hoffman, L. J., Dickson, J. S., & Harris, D. H. (2005). Proliferative enteropathy: a global enteric disease of pigs caused by *Lawsonia intracellularis*. *Animal Health Research Reviews*, 6(2), 173-197.

Lakatošová, M., & Holečková, B. (2007). Fluorescence in situ hybridisation. *Biologia*, 62, 243–250.

Landsverk, T. (1981). Intestinal adenomatosis in a blue fox (*Alopex lagopus*). *Veterinary pathology*, 18(2), 275-278.

Lawson, G. H. K., & Gebhart, C. J. (2000). Proliferative enteropathy. *Journal of comparative pathology*, 122(2-3), 77-100.

Liehr, T. (2017). *Fluorescence in situ hybridization (FISH)*. Springer Berlin Heidelberg.

Love, D. N., & Love, R. J. (1979). Pathology of proliferative haemorrhagic enteropathy in pigs. *Veterinary Pathology*, 16(1), 41-48.

Luna, L. G. (1968). Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. In *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology* (pp. xii-258).

Macintyre, N., Smith, D. G. E., Shaw, D. J., Thomson, J. R., & Rhind, S. M. (2003). Immunopathogenesis of experimentally induced proliferative enteropathy in pigs. *Veterinary Pathology*, 40(4), 421-432.

Marsteller, T. A. (2003). Monitoring the prevalence of *Lawsonia intracellularis* IgG antibodies using serial sampling in growing and breeding swine herds. *JSHP*, 11(3), 127-130.

McNicol, A. M., & Farquharson, M. A. (1997). In situ hybridization and its diagnostic applications in pathology. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 182(3), 250–261.

McOrist, S. (2005). Defining the full costs of endemic porcine proliferative enteropathy. *The Veterinary Journal*, 1(170), 8-9.

- McOrist, S., Boid, R., Lawson, G. H. K., & McConnell, I. (1987). Monoclonal antibodies to intracellular campylobacter-like organisms of the porcine proliferative enteropathies.
- McOrist, S., Gebhart, C. J., Boid, R., & Barns, S. M. (1995). *Characterization of Lawsonia intracellularis* gen. nov., sp. nov., the obligately intracellular bacterium of porcine proliferative enteropathy. *IJSEM*, 45(4), 820-825.
- McOrist, S., MacIntyre, N., Stokes, C. R., & Lawson, G. H. (1992). Immunocytological responses in porcine proliferative enteropathies. *Infection and immunity*, 60(10), 4184-4191.
- McOrist, S., Smith, S. H., & Green, L. E. (1997). Estimate of direct financial losses due to porcine proliferative enteropathy. *The Veterinary Record*, 140(22), 579-581.
- Moter, A., & Göbel, U. B. (2000). Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of microbiological methods*, 41(2), 85-112.
- Netea, M. G., Domínguez-Andrés, J., Barreiro, L. B., Chavakis, T., Divangahi, M., Fuchs, E., ... & Latz, E. (2020). Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 20(6), 375-388.
- Neves, S. M. N., & Guedes, R. M. C. (2012). Hibridização *in situ* fluorescente: princípios básicos e perspectivas para o diagnóstico de doenças infecciosas em medicina veterinária. *Arquivos do Instituto Biológico*, 79, 627-632.
- Neves, S., Gabardo, M. D. P., & Guedes, R. (2017). Hibridização *in situ* fluorescente para diagnóstico de *Brachyspira hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* em suínos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37, 1101-1107.
- Paradis, M. A., Gottschalk, M., Rajic, A., Ravel, A., Wilson, J. B., Aramini, J., ... & Dick, C. P. (2007). Seroprevalence of *Lawsonia intracellularis* in different swine populations in 3 provinces in Canada. *The Canadian Veterinary Journal*, 48(1), 57.
- Pereira, C. E., Vannucci, F. A., Gabardo, M. D. P., Santos, L. F. D., Mores, N., & Guedes, R. M. (2017). *Mycoplasma hyorhinis* infection in early cases of mycoplasmal pneumonia in swine and evaluation of diagnostic assays. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37(10), 1057-1063.
- Pereira, R.E. C. *Lawsonia intracellularis*: macrophage permissibility, mechanism of cell entry and antimicrobial susceptibility. 2018. 82 f. Tese (Doutrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/SMOC-B7TGF7>. Acesso em: 24 jan. 2025.
- Rautenstraub BW, Liehr T. 2002. *FISH Technology*. Berlin: Springer-Verlag.
- Resende, T. P., Pereira, C. E. R., Gabardo, M. D. P., Haddad, J. P. A., Lobato, Z. I. P., & Guedes, R. M. C. (2015). Serological profile, seroprevalence and risk factors related to *Lawsonia intracellularis* infection in swine herds from Minas Gerais State, Brazil. *BMC veterinary research*, 11, 1-6.
- Riber, U., Heegaard, P. M., Cordes, H., Ståhl, M., Jensen, T. K., & Jungersen, G. (2015). Vaccination of pigs with attenuated *Lawsonia intracellularis* induced acute phase protein responses and primed cell-mediated immunity without reduction in bacterial shedding after challenge. *Vaccine*, 33(1), 156-162.

Rowland, A. C., Lawson, G. H. K., & Maxwell, A. (1973). Intestinal adenomatosis in the pig: occurrence of a bacterium in affected cells. *Nature*, 243(5407), 417-417.

Silveira, É. L. D. (2004). Identificação de comunidades bacterianas de solo por sequenciamento do gene 16S rRNA (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticaba, São Paulo.

Sponchiado, G., Alcobas, J. P., Requião, L., Morales, S. M., Junior, Z. C., & Adam, M. L. A EVOLUÇÃO DO DIAGNÓSTICO CITOGÉNÉTICO EM HUMANOS EVOLUTION OF THE CYTOGENETIC DIAGNOSTIC IN HUMAN.

Sui, W., Ou, M., Chen, J., Wan, Y., Peng, H., Qi, M., ... & Dai, Y. (2009). Comparison of immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in situ hybridization (FISH) assessment for Her-2 status in breast cancer. *World journal of surgical oncology*, 7, 1-6.

Sumner, A. T. (2008). *Chromosomes: organization and function*. John Wiley & Sons.

Trask, B. J. (1991). Fluorescence in situ hybridization: Applications in cytogenetics and gene mapping. *Trends in Genetics*, 7(5), 149–154.

Umemura, T., Tsuchitani, M., Totsuka, M., Narama, I., & Yamashiro, S. (1982). Histiocytic enteritis of rabbits. *Veterinary pathology*, 19(3), 326-329.

Urbanek, M. O., Nawrocka, A. U., & Krzyzosiak, W. J. (2015). Small RNA detection by in situ hybridization methods. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(6), 13259–13286.

Vandenberghe, J., & Marsboom, R. (1982). Campylobacter-like bacteria in adenocarcinomas of the colon in two Wistar rats. *The Veterinary record*, 111(18), 416-417.

Warthin, A. S., & Starry, A. C. (1920). A more rapid and improved method of demonstrating spirochetes in tissues. *American Journal of Syphilis*, 4, 97–103.

Weimer, J., Kiechle, M., & Arnold, N. (2000). FISH-microdissection (FISH-MD) analysis of complex chromosome rearrangements. *Cytogenetic and Genome Research*, 88(1–2), 114–118.

Zlotowski, P., Driemeier, D., & Santos Neves de Barcellos, D. E. (2008). Pathogenesis of diarrhoea in pigs: models and examples. *Acta Scientiae Veterinariae*, 36, S81-S86.

6. Dados Suplementares

Tabela 1. Avaliação da marcação imuno-histoquímica e FISH em tecidos de animais infectados com *Lawsonia intracellularis* (*L. intracellularis*). Avaliação da marcação imuno-histoquímica (IHQ) e hibridização *in situ* fluorescente (FISH) em lâmina própria e parênquima de linfonodos mesentéricos de animais infectados com *L. intracellularis*. A identificação corresponde ao número do animal, o tecido avaliado compreende íleo e linfonodo mesentérico, o grau de marcação IHQ é indicado em uma escala de 0 a 4, e as colunas de marcação FISH mostram a positividade ou negatividade para *L. intracellularis* em cada região analisada.

Identificação	Tecido avaliado	Grau marcação IHQ	Marcação FISH		
			Lâmina Própria	Parênquima Linfonodo	Placa de Peyer
3	Linfonodo mesentérico e íleo	3	Positiva	Negativa	Negativa
7	Linfonodo mesentérico e íleo	3	Positiva	Negativa	Negativa
8	Linfonodo mesentérico e íleo	4	Negativa	Negativa	Negativa
10	Linfonodo mesentérico e íleo	3	Negativa	Negativa	Negativa
11	Linfonodo mesentérico e íleo	4	Positiva	Negativa	Negativa
23	Linfonodo mesentérico e íleo	4	Negativa	Negativa	Negativa
24	Linfonodo mesentérico e íleo	3	Negativa	Negativa	Negativa
26	Linfonodo mesentérico e íleo	4	Positiva	Negativa	Negativa
26	Linfonodo mesentérico e íleo	4	Positiva	Negativa	Negativa
29	Linfonodo mesentérico e íleo	4	Negativa	Negativa	Negativa
35	Linfonodo mesentérico e íleo	4	Positiva	Negativa	Negativa
39	Linfonodo mesentérico e íleo	4	Positiva	Negativa	Negativa
40	Linfonodo mesentérico e íleo	4	Positiva	Negativa	Negativa
41	Linfonodo mesentérico e íleo	4	Positiva	Negativa	Negativa
42	Linfonodo mesentérico e íleo	4	Positiva	Negativa	Negativa
42	Linfonodo mesentérico e íleo	3	Positiva	Negativa	Negativa
44	Linfonodo mesentérico e íleo	3	Positiva	Negativa	Negativa
45	Íleo	4	Positiva	Negativa	Negativa
46	Linfonodo mesentérico e íleo	3	Positiva	Negativa	Negativa
48	Linfonodo mesentérico e íleo	4	Positiva	Negativa	Negativa
51	Linfonodo mesentérico e íleo	0	Negativa	Negativa	Negativa
55	Linfonodo mesentérico e íleo	0	Negativa	Negativa	Negativa

57	Linfonodo mesentérico e íleo	0	Negativa	Negativa	Negativa
64	Linfonodo mesentérico e íleo	0	Negativa	Negativa	Negativa
67	Linfonodo mesentérico e íleo	0	Negativa	Negativa	Negativa
68	Linfonodo mesentérico e íleo	0	Negativa	Negativa	Negativa
69	Linfonodo mesentérico e íleo	0	Negativa	Negativa	Negativa