

**Fábio Augusto Vannucci**

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL E HISTOMORFOMÉTRICA DO INTESTINO DE SYRIAN HAMSTERS (*MESOCRICETUS AURATUS*) EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *LAWSONIA INTRACELLULARIS***

Dissertação apresentada no curso de Mestrado em Medicina Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do certificado de mestre em Medicina Veterinária.

Área de Concentração: Patologia animal

Orientador: Prof. Roberto Maurício Carvalho Guedes

Co-orientadores: Ernane Fagundes Nascimento  
Elizabeth Lage Borges

Belo Horizonte  
Escola de Veterinária - UFMG  
2009

V271a Vannucci, Fábio Augusto, 1981 –  
Avaliação funcional e histomorfométrica do intestino de syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectados com *Lawsonia intracellularis* / Fábio Augusto Vannucci. – 2009.  
56 p. : il.

Orientador: Roberto Maurício Carvalho Guedes  
Co-orientadores: Ernane Fagundes Nascimento, Elizabeth Lage Borges  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária  
Inclui bibliografia  
1. Hamster como animal de laboratório – Teses. 2. Diarréia em animais – Teses. 3. Absorção intestinal – Teses. 4. Intestinos – Infecção – Teses. I. Guedes, Roberto Maurício Carvalho. II. Nascimento, Ernane Fagundes. III. Borges, Elizabeth Lage. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD – 636.088 5





Dedicada aos meus pais, Fátima e Rafael,  
a minha esposa, Aline e, ao meu filho, Pedro.

---

## AGRADECIMENTOS

---

Aos meus pais Fátima e Rafael e a minha irmã, Rafaela, pelo amor, carinho e apoio incondicional nas minhas escolhas pessoais e profissionais.

A minha esposa, Aline, pelo amor, incentivo e paciência. Ao meu filho, Pedro, pelos abraços, sorrisos e carinhos em todos os momentos.

Ao Prof. Roberto M. C. Guedes, meu orientador, pelo exemplo profissional, pela oportunidade, confiança, paciência, apoio, incentivo e, sobretudo, ensinamentos pessoais e profissionais.

A Prof<sup>a</sup>. Elizabeth L. Borges pela participação no desenvolvimento do projeto e pela concessão do Laboratório de Fisiologia da Nutrição do ICB/UFMG para realização das cirurgias e avaliações bioquímicas.

Ao Prof. Ernane F. Nascimento pela confiança e apoio na finalização deste projeto.

A Profa. Rilene F. D. Valadares pela participação na banca examinadora e contribuição para melhoria do presente trabalho. Ao Prof. Renato L. Santos pela participação na banca e fundamental contribuição na minha formação profissional.

Ao Prof. João Carlos P. Silva pelas oportunidades e incentivo quando iniciei na área de patologia.

Aos professores do setor de Patologia, Prof<sup>a</sup>. Roselene Ecco e Prof<sup>a</sup>. Rogéria Serakides pelos constantes ensinamentos durante esta etapa da minha formação.

As técnicas e amigas do Laboratório de Patologia, Mel e Marilene, pelo auxílio no processamento do material, pela convivência e companheirismo.

Aos amigos do setor de patologia: Aline Viott, Núbia, Cris, Mirella, Eduardo, Raquel, Cintia, Silvia França, Silvia Pacheco, Aliny, Ana Luiza, Natália, Jankerle, Juneo, Tatiane, Fabiana, Alcina, Mariana, Teane, Luciana, Érica, Kristel, Flávia, Marina, Mateus, Samanta, Paulo Ricardo, Vitor e Adão pela convivência harmoniosa. A Juliana, acadêmica bolsista de iniciação científica, pelo auxílio nas avaliações histomorfométricas.

Ao Carlos do biotério do setor de parasitologia do ICB/UFMG pela disposição em fornecer os animais utilizados neste projeto.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro no desenvolvimento do projeto e concessão da bolsa de estudos.

A todos que participaram, direta ou indiretamente, da realização deste projeto.

Meus sinceros agradecimentos. Muito obrigado!

## SUMÁRIO

	Página
<b>RESUMO.....</b>	15
<b>ABSTRACT.....</b>	16
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	17
<b>1. ENTEROPATIA PROLIFERATIVA (EP) - REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	18
1.1 ETIOLOGIA.....	18
1.2 ISOLAMENTO E CULTIVO.....	18
1.3 EPIDEMIOLOGIA.....	19
1.4 REPRODUÇÃO EXPERIMENTAL .....	20
1.5 PATOGÊNESE.....	21
1.6 SINAIS CLÍNICOS.....	23
1.7 LESÕES.....	24
1.8 DIAGNÓSTICO.....	24
1.9 CONTROLE.....	26
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	27
2.1 ANIMAIS.....	27
2.2 PREPARAÇÃO DO INÓCULO.....	27
2.3 INOCULAÇÃO.....	28
2.4 AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO INTESTINAL.....	29
2.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	30
2.6 AVALIAÇÕES ANATOMO-HISTOPATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA.....	30
2.7 AVALIAÇÕES HISTOMORFOMÉTRICAS.....	31
2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32

<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
3.1 INFECCÃO EXPERIMENTAL.....	32
3.2 ABSORÇÃO INTESTINAL.....	37
3.3 HISTOMORFOMETRIA.....	43
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>48</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>48</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Técnicas de diagnóstico disponíveis para EP em suínos com detecção direta ou indireta de <i>L. intracelullaris</i> (modificado: Kroll et al., 2005).	25
Tabela 3.1	Peso médio, em gramas (média $\pm$ desvio padrão), dos grupos controle e infectado durante a reprodução experimental da EP em hamsters.	32
Tabela 3.2	Intensidade da infecção por <i>L. intracelullaris</i> , baseado na marcação por IHQ, em fragmentos de intestino delgado de syrian hamsters inoculados com homogeneizado de mucosa de suínos.	36

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Quantificação da concentração de <i>L. intracelullaris</i> no inóculo utilizado para reprodução experimental da enteropatia proliferativa em hamsters. (A) Lâmina contendo poços usados na diluição do homogeneizado de mucosa, sendo: 7 – controle positivo e 8 – controle negativo. (B) Detecção de anticorpos contra <i>L. intracelullaris</i> por imunoperoxidase (seta). Aumento 400x.	28
Figura 2.2	Inoculação experimental com agulha de “gavage” em hamsters. (A) Inoculação de homogeneizado de mucosa de suínos contendo <i>L. intracelullaris</i> (Grupo Infectado). (B) Inoculação de solução SPG (Grupo Controle).	29
Figura 2.3	Procedimento cirúrgico para avaliação da absorção intestinal em hamsters experimentalmente infectados com <i>L. intracelullaris</i> . (A) Cânulas fixadas por ligadura caudal à flexura duodeno-jejunal e cranial à válvula ileocecal. (B) Infusão intestinal da solução Tyrode a velocidade de 0,25 mL/min.	30

- Figura 2.4 Intestino delgado de syrian hamsters. Avaliação histomorfométrica: altura de vilosidade – linha reta do centro da porção basal até o ápice da vilosidade (linha azul) e profundidade de cripta – linha reta da lâmina própria do epitélio mais profundo da cripta até a junção vilosidade/cripta (linha vermelha). Aumento 200x. 31
- Figura 3.1 Intestino delgado de hamsters infectados com *L. intracellularis*. (A) Espessamento difuso da parede do intestino delgado. (B) Espessamento da parede intestinal na região do íleo (seta). 33
- Figura 3.2 Intestino delgado de syrian hamster (26 dias pós-inoculação). (A) Animal inoculado com SPG (grupo controle). Aumento 100x. (B) Animal inoculado com homogeneizado de mucosa intestinal contendo *L. intracellularis* (grupo infectado) apresentando hiperplasia de células das criptas e alongamento das vilosidades. Aumento 100x. 34
- Figura 3.3 Intestino delgado de syrian hamster experimentalmente infectado com homogeneizado de mucosa intestinal de suínos contendo *L. intracellularis*. (26 dias pós-inoculação). (A) Proliferação das criptas intestinais. Hiperplasia do tecido linfóide associado ao intestino. Aumento 40x. (B) Submucosa apresentando infiltração inflamatória linfo-histiocitária e neutrofílica. Aumento 400x. (C) Cripta hiperplásica caracterizada pela redução no número de células caliciformes e elevado índice mitótico. Aumento 400x. 35
- Figura 3.4 Intestino delgado de syrian hamsters experimentalmente infectados com *L. intracellularis* corado pela técnica de IHQ utilizando anticorpo policlonal (diluição 1:30.000). Diferentes graus de marcação: (A) Grau um, até 25% da mucosa infectada pela bactéria (200x); (B) Grau dois, 25 a 50% da mucosa infectada (100x); (C) Grau três, 50 a 75% da mucosa infectada (100x) e (d) Grau quatro, acima de 75% da mucosa infectada (40x). 37

- Figura 3.5 Diferença (média  $\pm$  erro padrão) entre a quantidade de glicose (mg) por minuto infundida e coletada no intestino delgado de hamsters experimentalmente infectados com *L. intracellularis* (Grupo Lawsonia+) e inoculados com solução SPG (Grupo Controle) em diferentes tempos. Diferença estatística entre os grupos: \*  $p < 0,05$ . 38
- Figura 3.6 Diferença (média  $\pm$  erro padrão) entre a quantidade de glicose (mg) por minuto infundida e coletada no intestino delgado de hamsters experimentalmente infectados com *L. intracellularis* (Grupo Lawsonia+), de acordo com a intensidade de marcação por IHQ, e inoculados com solução SPG (Grupo Controle) em diferentes tempos. Diferenças estatísticas entre o grupo de animais com marcação por IHQ grau 2+ e o grupo controle: \*  $p < 0,05$ . Diferença estatística entre os grupos com marcação grau 1+ e 2+: #  $p < 0,05$ . 39
- Figura 3.7 Diferença (média  $\pm$  erro padrão) entre a quantidade de íons sódio (mMol) por minuto infundida e coletada no intestino delgado de hamsters experimentalmente infectados com *L. intracellularis* (Grupo Lawsonia+) e inoculados com solução SPG (Grupo Controle) em diferentes tempos. 40
- Figura 3.8 Diferença (média  $\pm$  erro padrão) entre a quantidade de íons potássio (mMol) por minuto infundida e coletada no intestino delgado de hamsters experimentalmente infectados com *L. intracellularis* (Grupo Lawsonia+) e inoculados com solução SPG (Grupo Controle) em diferentes tempos. Diferenças estatísticas entre os grupos: \*  $p < 0,05$ . 41
- Figura 3.9 Diferença (média  $\pm$  erro padrão) entre a quantidade de íons potássio (mMol) por minuto infundida e coletada no intestino delgado de hamsters experimentalmente infectados com *L. intracellularis* (Grupo Lawsonia+), de acordo com a intensidade de marcação por IHQ, e inoculados com solução SPG (Grupo Controle) em diferentes tempos. Diferenças estatísticas entre os grupos: \*  $p < 0,05$ . 41
- Figura 3.10 Diferença (média  $\pm$  erro padrão) entre a quantidade de íons cloreto (mMol) por minuto infundida e coletada no intestino delgado de hamsters experimentalmente infectados com *L. intracellularis* (Grupo Lawsonia+) e inoculados com solução SPG (Grupo Controle) em diferentes tempos. Diferença estatística entre os grupos: \*  $p < 0,05$ . 42

- Figura 3.11 Diferença (média  $\pm$  erro padrão) entre a quantidade de íons cloreto (mMol) por minuto infundida e coletada no intestino delgado de hamsters experimentalmente infectados com *L. intracellularis* com intensidade de marcação por IHQ grau 1+ (Grupo Lawsonia+1) e inoculados com solução SPG (Grupo Controle) em diferentes tempos. Diferenças estatísticas entre os grupos: \*  $p < 0,05$ . 43
- Figura 3.12 Altura das vilosidades e profundidade das criptas em micrômetros (média  $\pm$  erro padrão) de hamsters inoculados com SPG (grupo controle) e infectados experimentalmente com homogeneizado de mucosa contendo *L. intracellularis* de acordo com intensidade de marcação por IHQ. 44

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

AEC	3-amino-9-etil-carbazol
AMPc	Mono fosfato de adenosina cíclico
CaCC	Canal de cloreto dependente de cálcio.
CFTR	Regulador Transmembrana da Fibrose Cística.
dL	Decilitro
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	Teste imuno-enzimático de absorvância
EP	Enteropatia proliferativa
EUA	Estados Unidos da América
FISH	<i>Fluorescent in situ hybridization</i>
GALT	<i>Gut-associated lymphoid tissue</i>
GMPc	Mono fosfato de guanosina cíclico.
IEC-18	Linhagem de células intestinais de rato
IgG	Imunoglobulina G
Int 407	Linhagem de células intestinais de feto humano.
IPEC-J2	Linhagem de células do epitélio intestinal de leitões.

HE	Hematoxilina e eosina
IFA	Imunofluorescência Indireta
IHQ	Imunoistoquímica
IPMA	Imunoperoxidase em monocamadas de células
L	Unidade litros
mL	Unidade mililitros
mg	Unidade miligramas
mMol	Unidade milimolar
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase	Bomba de sódio e potássio
NHE	Transportador iônico de sódio/H <sup>+</sup>
PBS	Solução salina fosfatada tamponada
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PK-15	Linhagem de células de rim de suínos
SPG	Solução de sacarose, fosfato e glutamato
VNTR	<i>Variable number of tandem repeats</i>

## RESUMO

A partir da reprodução experimental da EP (enteropatia proliferativa) em syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*), avaliou-se a intensidade da infecção por *Lawsonia intracellularis*, por meio de exames macroscópicos, histológicos e imunoistoquímicos, e sua correlação com absorção e histomorfometria intestinal. Foram utilizados 60 hamsters entre duas e três semanas de idade provenientes de biotério sem histórico de EP. O grupo infectado (n=30) recebeu, por via intragástrica, 1 mL de homogeneizado de mucosa intestinal de suínos naturalmente infectados, contendo aproximadamente  $7,5 \times 10^9$  organismos de *L. intracellularis*. O grupo controle (n=30) recebeu, pela mesma via, um mL de SPG (solução de sacarose, fosfato e glutamato). Os animais foram pesados em intervalos regulares de nove dias para avaliação do ganho de peso. Vinte seis dias após a inoculação avaliou-se a absorção intestinal de glicose, sódio, potássio e cloro durante 40 minutos, em intervalos de 10 minutos. Neste procedimento foi infundida solução com concentração conhecida no jejuno cranial e coletada no íleo terminal. A infecção experimental foi confirmada por avaliações anátomo-histopatológicas e marcação positiva para *L. intracellularis* por IHQ (imunoistoquímica). A histomorfometria demonstrou alongamento das vilosidades e aprofundamento das criptas intestinais nos hamsters que apresentaram maior grau de infecção, avaliada por IHQ. Estes animais apresentaram menor absorção intestinal de glicose, potássio e cloreto ( $p < 0,05$ ), quando comparados ao grupo controle, em pelo menos uma tomada de tempo. Os resultados indicam menor absorção intestinal como importante mecanismo diarreico em hamsters experimentalmente infectados com *L. intracellularis*. Portanto, a diarreia por má absorção deve ser considerada como principal mecanismo envolvido na fisiopatologia da diarreia na EP.

Palavras-chave: hamster; enteropatia proliferativa; *Lawsonia intracellularis*; reprodução experimental; absorção intestinal; histomorfometria; diarreia.

## ABSTRACT

Severity of infection based on gross and microscopic lesions and immunohistochemistry was correlated with intestinal absorption and histomorphometry in syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentally inoculated with *Lawsonia intracellularis*. Sixty hamsters between two and three weeks of age from a colony with no history of EP were used. The infected group (n=30) received, by gavage, 1 mL of intestinal mucosa homogenate from PE naturally infected pigs containing approximately  $7,5 \times 10^9$  *L. intracellularis* organisms. The control group (n=30) received one mL of SPG by the same route. Animals were weighed at regular intervals of nine days to assess the weight gain. Twenty six days after inoculation, the intestinal absorption of glucose, sodium, potassium and chloride was evaluated for 40 minutes, in intervals of 10 minutes. In this procedure, a standard solution was infused in the cranial jejunum and collected in terminal ileum. The experimental infection was confirmed by gross and histopathological examination and *L. intracellularis* antigen labelling by IHC. Histomorphometry showed elongation of villous and deepening of intestinal crypts in hamsters that had high infection level as demonstrated by IHC. These animals had significant lower intestinal absorption of glucose, potassium and chloride ( $p < 0,05$ ), when compared to uninfected controls. These results indicate a lower intestinal absorption as being an important mechanism of diarrhea in *L. intracellularis* experimentally infected hamsters. Therefore, the diarrhea for malabsorption should be considered as the main mechanism involved in the pathophysiology of diarrhea in the EP.

Keywords: hamster; proliferative enteropathy; *Lawsonia intracellularis*; experimental reproduction; intestinal absorption; histomorphometry; diarrhea.

## INTRODUÇÃO

A enteropatia proliferativa (EP) é uma doença entérica causada por uma bactéria intracelular obrigatória, *Lawsonia intracellularis* (McOrist e Gebhart, 1999; Guedes, 2007). A enfermidade tem sido descrita em vários mamíferos e aves, incluindo espécies silvestres, no entanto, ocorre com maior frequência em suínos, hamsters e equinos (Jasni et al., 1994; Cooper et al., 1997a; Lawson e Gebhart, 2000; Pusterla, 2008). A EP caracteriza-se por espessamento da parede do intestino associado à proliferação das criptas intestinais e redução no número de células caliciformes.

A avaliação sorológica de granjas norte americanas revelou suínos soropositivos, a partir de nove semanas de idade, com aumento progressivo da soro-prevalência chegando a 90,9% nos animais com 27 semanas (Armbruster et al., 2007). Apesar da prevalência também elevada em rebanhos brasileiros, não existem estimativas do impacto econômico dessa enfermidade no país (Ristow et al., 2000). Nos EUA, os prejuízos equivalem a aproximadamente 20 milhões de dólares anuais (Winkelman e Dee, 1996), enquanto na Austrália foi estimado um custo anual de 20 dólares por matriz suína (Lawson e McOrist, 1993). Os prejuízos resultam da redução do ganho de peso, diarreia e mortalidades em suínos de terminação e reposição (Lawson e Gebhart, 2000).

A reprodução experimental da EP através da inoculação de cultura pura de *L. intracellularis* ou de homogeneizado de mucosa intestinal de suínos naturalmente infectados demonstrou grande similaridade no desenvolvimento das lesões em hamsters

e suínos (McOrist e Lawson, 1987; McOrist et al., 1989; Yhe et al., 2006). Neste contexto, syrian hamsters foram utilizados como modelo experimental em estudos ultra-estruturais e na investigação de mecanismos de interação da *L. intracellularis* com o epitélio intestinal (Frisk e Wagner, 1977; McOrist et al., 1989; Jasni et al., 1994). Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos celulares envolvidos na patogênese da enteropatia proliferativa (McOrist et al., 1997; McCluskey et al., 2002; Guedes, 2007).

A primeira alteração observada na infecção pela *L. intracellularis* é a hiperplasia da mucosa intestinal com progressiva substituição de enterócitos maduros e colunares das vilosidades, por células pouco diferenciadas, semelhantes às células do epitélio das criptas intestinais (McOrist et al., 1996; Smith e McOrist, 1997). Acredita-se que a diarreia observada em casos de EP seja por má absorção, consequência da hipotrofia de vilosidades e/ou da presença de células imaturas hiperplásicas com reduzida expressão de proteínas e transportadores de membrana. Apesar de serem estas as teorias mais aceitas para justificar a redução do ganho de peso e atraso no crescimento dos animais infectados, ainda não são conhecidos os mecanismos fisiopatológicos causadores da diarreia e diminuição de desempenho (Moeser e Blikslager, 2007).

Os objetivos desta dissertação foram reproduzir experimentalmente a EP em syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) e associar a infecção por *L. intracellularis* confirmada por exames macroscópicos, histológicos e imunoistoquímicos com a absorção e histomorfometria intestinais.

## 1. REVISÃO DE LITERATURA – ENTEROPATIA PROLIFERATIVA

### 1.1 ETIOLOGIA

A EP foi descrita pela primeira vez em suínos em 1931 como uma alteração proliferativa transmissível (Biester e Schwarte, 1931). Somente em 1973, Rowland et al. associaram as lesões proliferativas à presença de um microorganismo intracelular na porção apical de células das criptas intestinais.

Em hamsters, o primeiro relato ocorreu em 1965 (Jonas et al., 1965) e, a partir da década de 1970, também passou ser importante nessa espécie. Naquela época, a EP foi considerada a enfermidade de maior ocorrência e principal causa de mortalidade em animais entre três e oito semanas de idade, sendo também chamada de adenocarcinoma intestinal enzoótico, ileite proliferativa, enterite regional e “wet tail disease” (doença da cauda molhada) (Amend et al., 1976; Frisk e Wagner, 1977; Jacoby, 1978). Atualmente, ainda é descrita como importante enfermidade em colônias de hamsters (Pereira, 2006). Várias espécies do gênero *Campylobacter* foram isoladas de animais com EP, como o *C. mucosalis* (Rowland e Lawson, 1974; Love et al., 1977), *C. hyointestinalis* (Gebhart et al., 1983), *C. jejuni* e *C. coli* (Erickson et al., 1990). Entretanto, nenhum microorganismo do gênero *Campylobacter* foi capaz de causar a doença (McCartney et al., 1984; Boosinger et al., 1985 e Alderton et al., 1992).

O isolamento e manutenção *in vitro* da bactéria foi realizado pela primeira vez por Lawson et al. (1993). No mesmo ano, a doença foi reproduzida e a bactéria reisolada, cumprindo os requisitos do postulado de Koch (McOrist et al., 1993). O microorganismo foi classificado dentro da subdivisão delta de Proteobacteria (Gebhart et al., 1993) com taxonomia distinta de

outras bactérias intracelulares. Baseado no sequenciamento do DNA ribossômico 16S, a bactéria, previamente descrita como organismo *Campylobacter-like*, *Ileal symbiont intracellularis* e *Ileobacter intracellularis*, foi classificada como sendo de novo gênero e nova espécie dentro da família das Desulfovibrionaceas, e chamada de *Lawsonia intracellularis* (McOrist et al., 1995a) em homenagem ao pesquisador escocês, Dr. Gordon H. K. Lawson.

A *L. intracellularis* é uma bactéria pequena (cerca de 1,25-1,75µm de comprimento e 0,25-0,43µm de largura), curva, gram negativa, microaerófila e não formadora de esporos (Lawson et al., 1993). Foi observado um flagelo longo e unipolar por microscopia eletrônica. Contudo, esse flagelo não foi identificado quando a bactéria encontrava-se presente no citoplasma de enterócitos (Lawson e Gebhart, 2000). Em 2002 foi finalizado o sequenciamento completo do genoma da bactéria sendo constituído por um cromossomo circular e três plasmídeos totalizando 1344 genes (Gebhart e Kapur, 2002).

### 1.2 ISOLAMENTO E CULTIVO

Por se tratar de um microorganismo intracelular obrigatório extraído de células presentes em meio altamente contaminado, o isolamento e cultivo da *L. intracellularis* ainda é um desafio para os bacteriologistas. Somente aproximadamente 70 anos após a primeira descrição da EP, foi possível isolamento e propagação da bactéria *in vitro* a partir da infecção em hamsters (Stills, 1991) e suínos (Lawson et al., 1993).

O isolamento é feito a partir de homogeneizado de mucosa intestinal de animais infectados e tratamento com tripsina a 1% em solução PBS (solução salina fosfatada tamponada) (a 0,1M e pH 7,4). O homogeneizado é submetido a sucessivas filtrações e centrifugações com o objetivo de

eliminar o maior número de bactérias contaminantes possíveis. Em seguida, o material filtrado é inoculado em cultura de células com antimicrobianos específicos que não atuem sobre a *L. intracellularis* (Lawson et al., 1993).

Até o momento, não foi possível o isolamento em meios de cultivo bacteriológicos convencionais sendo necessárias culturas de células em multiplicação (Guedes, 2007). As linhagens celulares utilizadas para a manutenção da *L. intracellularis in vitro* são células intestinais de rato (IEC-18) (Lawson et al., 1995; Guedes, 2002), células derivadas de intestino de fetos humanos (Int 407) (Lawson et al., 1993; Guedes, 2002), células derivadas de adenocarcinoma de cólon de ratos (Lawson et al., 1993), células de rim de suínos (PK-15) (Lawson et al., 1993), enterócitos de suínos (IPEC-J2) (McOrist et al., 2006) e células de camundongos semelhante a fibroblastos (McCoy) (Guedes, 2002). Além da presença de células em crescimento, são necessárias condições ambientais similares as encontradas no intestino para a manutenção *in vitro* da *L. intracellularis*. Dessa forma, utilizam-se estufas a 37°C em atmosfera com 82,2% de N<sub>2</sub>, 8,8% CO<sub>2</sub> e 8% O<sub>2</sub> (Lawson et al., 1993).

### 1.3 EPIDEMIOLOGIA

Embora seja descrita com maior frequência em suínos, hamsters e equinos, a EP já foi descrita em cobaio (Elwell et al., 1981), rato (Vandenberghe et al., 1985), furão (Fox e Lawson, 1988), raposa (Erickson et al., 1990), cão (Leblanc et al., 1993), coelho (Hotchkins et al., 1996), avestruz (Cooper et al., 1997b), macaco (Klein et al., 1999), camundongo (Smith et al., 2000), bovino, porco espinho e girafa (Herbst et al., 2003). A identificação da bactéria nas fezes de mamíferos selvagens capturados próximos a haras com histórico de animais com EP sugere que esses animais de vida livre

possam ser reservatórios e potenciais transmissores da enfermidade (Pusterla et al., 2008).

No Brasil, a doença tem sido descrita em hamsters e suídeos (Faccini et al., 2005; Pereira, 2006; Zlotowski et al., 2008). Contudo, no Estado de Minas Gerais foram encontrados eqüinos sorologicamente positivos para *L. intracellularis* associado à identificação do agente por PCR (reação em cadeia da polimerase) em fezes, indicando a presença da enfermidade na região (Guimarães-Ladeira, 2007). Apesar da existência de relatos da EP em primatas não humanos, até o momento, a infecção por *L. intracellularis* não foi observada no homem. As características anatomopatológicas da EP são similares a algumas observadas na doença intestinal inflamatória humana (doença de Crohn), contudo, a *L. intracellularis* não foi identificada em pacientes com a doença (Michalski et al., 2006).

Técnicas moleculares vêm sendo utilizadas com objetivo de compreender a epidemiologia dos diferentes isolados de suínos e outras espécies. Recentemente, a PCR associada à identificação de VNTR (*variable number of tandem repeats*) presentes no genoma da *L. intracellularis* têm determinado importantes diferenças genotípicas entre os surtos de EP em suínos de diversas regiões e entre diferentes espécies incluindo suínos, eqüinos, hamsters, furões, avestruzes e macacos (Weber et al, 2004, citado por Kroll et al., 2005) . Entretanto, pouco se sabe sobre a epidemiologia molecular da EP.

A infecção ocorre por via oro-fecal através da ingestão do agente presente nas fezes de animais infectados (Jordan et al., 2004). Suínos infectados podem eliminar cerca de 10<sup>8</sup> organismos de *L. intracellularis* por grama de fezes e a eliminação do agente pode persistir por até três meses (Smith e McOrist, 1997; Guedes e Gebhart, 2003b).

A colonização intestinal pela bactéria foi detectada em suínos inoculados oralmente com fezes mantidas a 23°C por 14 dias, evidenciando a sobrevivência do microorganismo por até 2 semanas à temperatura ambiente (Collins et al., 2000). A infecção em leitões pode ser demonstrada pela inoculação oral de 10<sup>3</sup> organismos de *L. intracellularis* (Collins et al., 2001). Neste contexto, verifica-se que embora haja dificuldade no isolamento e cultivo, esse microorganismo possui três características importantes para a manutenção e propagação da EP, sendo elas: eliminação nas fezes em alta concentração por um longo período de tempo; resistência ao ambiente e baixa dose infectante. Tais características contribuem para alta prevalência sorológica em suínos (entre 60 e 90%) observada em diferentes países (Lawson e Gebhart, 2000).

Animais com a infecção subclínica não manifestam quadros de diarreia, típicos da doença, por possuírem menor grau de infecção, entretanto, apresentam baixo desempenho e são capazes de eliminar o agente. Portanto, estes são importantes fontes de infecção para animais susceptíveis (Guedes e Gebhart, 2003b). Jacobson et al. (2003) observaram menor desempenho em suínos clinicamente saudáveis, no entanto, eliminando *L. intracellularis* nas fezes.

#### 1.4 REPRODUÇÃO EXPERIMENTAL

Estudos *in vitro* têm demonstrado a dinâmica da invasão bacteriana nos enterócitos, contudo, a proliferação celular, característica marcante da doença, não é reproduzida (McOrist et al., 2006). Dessa forma, o estabelecimento de modelos experimentais *in vivo* é fundamental na investigação da patogênese dessa enfermidade.

A reprodução experimental da EP tem sido descrita com maior frequência em suínos e hamsters por meio da inoculação oral de homogeneizado de mucosa intestinal de

animais doentes ou por cultura pura de *L. intracellularis* (McOrist e Lawson, 1987; McOrist et al., 1989; Guedes e Gebhart, 2003a; Yhe et al., 2006). A doença também foi reproduzida experimentalmente em equinos (AlGhamdi, 2003) e camundongos (Murakata et al., 2008). Homogeneizado de mucosa de suínos já foi utilizada com sucesso para infectar suínos (Guedes e Gebhart, 2003a), hamsters (Yhe et al., 2006), camundongos (Murakata et al., 2008) e eqüinos (AlGhamdi, 2003). Já cultura pura de *L. intracellularis* causou infecção em suínos (Guedes e Gebhart, 2003a), hamsters (Yhe et al., 2006) e camundongos (Smith et al., 2000). Ainda, a bactéria isolada de eqüinos foi capaz de infectar hamsters (Cooper et al., 1997b). No Brasil, a doença foi reproduzida em suínos, com homogeneizado de mucosa, e em hamsters, com cultura pura de *L. intracellularis* (França, 2007). A ocorrência de casos isolados de EP em outras espécies não tem estimulado a investigação de outros possíveis modelos experimentais.

Não foi possível reproduzir a doença a partir da inoculação oral de cultura pura de *L. intracellularis* em suínos “germ free” (McOrist et al., 1994). No entanto, a enfermidade foi reproduzida com filtrado de mucosa intestinal contendo *L. intracellularis* e outras bactérias entéricas (McOrist e Lawson, 1989). Ainda, a reprodução experimental também foi bem sucedida em suínos gnotobióticos desafiados oralmente com homogeneizado de mucosa contendo *L. intracellularis* (McOrist et al., 1994). Baseado nessas observações, fica clara a importante influência da microbiota intestinal no desenvolvimento da EP, permitindo e capacitando a colonização da bactéria no epitélio intestinal (Smith e Lawson, 2001). Entretanto, os mecanismos de interação da microbiota intestinal nas infecções por *L. intracellularis* ainda não estão esclarecidos (Molbak et al., 2008).

Como mencionado anteriormente, a EP pode ser reproduzida utilizando cultura pura de bactéria ou homogeneizado de mucosa intestinal de animais infectados. O desafio oral com cultura pura permite a determinação precisa da dose infectante através da quantificação de bactérias viáveis presentes na cultura de células. Outra vantagem da cultura pura é a ausência de outros potenciais patógenos entéricos que, eventualmente, possam confundir a resposta dos animais frente à infecção (Guedes e Gebhart, 2003a). A desvantagem é o difícil isolamento e manutenção *in vitro* do microorganismo. A reprodução experimental utilizando homogeneizado de mucosa consiste na raspagem da mucosa intestinal de animais infectados, homogeneização desse material e posterior inoculação em animais susceptíveis (Winkelman et al., 2002). Essa técnica é relativamente simples e tem sido efetiva na reprodução da doença em suínos e hamsters (Mapother et al., 1987; McOrist et al., 1993). No entanto, nesses casos, o inóculo pode conter outros microorganismos entéricos patogênicos. A determinação da dose infectante no homogeneizado de mucosa é realizada através da detecção indireta pela técnica de imunoperoxidase e contagem de organismos de *L. intracellularis* marcados, contudo, não é possível diferenciar bactérias mortas e viáveis (Guedes e Gebhart, 2003a).

A comparação entre cultura pura e homogeneizado de mucosa na reprodução experimental da EP demonstrou sinais clínicos e lesões similares. Entretanto, foi observado menor ganho de peso em suínos e hamsters inoculados com homogeneizado de mucosa, quando comparado à inoculação com cultura pura (Guedes e Gebhart, 2003a; Yhe, 2004).

### 1.5 PATOGÊNESE

Os mecanismos envolvidos na patogênese da EP são determinados pela infecção e posterior hiperplasia de enterócitos presentes

na região das criptas intestinais (Lawson e Gebhart, 2000). Entretanto, os fatores de virulência envolvidos na infecção ainda não estão bem esclarecidos (Gebhart e Guedes, 2004). Proteínas adesinas ou receptores específicos para *L. intracellularis* não foram identificados (McOrist et al., 1997). A análise da sequência genética do microorganismo identificou regiões homólogas aos fatores de membrana Yop (proteína externa da *Yersinia*) indicando que o sistema de secreção tipo III, encontrados em bactérias enteropatogênicas gram negativas, pode auxiliar no processo de invasão e evasão sistema imune do hospedeiro (Gebhart e Guedes, 2004; Kroll et al., 2005). O mecanismo de invasão não depende da viabilidade da bactéria. Células eucariotas são capazes de internalizar organismos de *L. intracellularis* fixados em formol (Lawson et al., 1995). O bloqueio do metabolismo e do citoesqueleto celular por citocalasina D reduziu significativamente a invasão bacteriana, mas ainda sim houve infecção pelo microorganismo, portanto, outros mecanismos podem estar envolvidos nesse processo (Gebhart e Guedes, 2004).

Neste contexto, a *L. intracellularis* parece ser internalizada por indução de mecanismos específicos de endocitose (Lawson et al., 1993). Em seguida, ocorre formação de vacúolo intracitoplasmático com posterior liberação da bactéria para o citoplasma (McOrist et al., 1995b). *Shigella*, *Listeria*, *Clostridium piliforme* e algumas espécies de *Rickettsia* podem ser encontradas livres na célula hospedeira por escapar do fagossomo através da produção de toxinas (citolisinas ou hemolisinas). Atividade citolítica foi observada na infecção *in vitro* pela *L. intracellularis* (Gebhart e Guedes, 2004). Hemolisinas podem estar envolvidas na interação e invasão por meio da expressão de um proteína antigênica denominada Lsa. A expressão desse gene é responsável pela síntese de proteínas na superfície bacteriana, os quais poderiam se ligar a receptores

específicos na membrana celular do hospedeiro (McCluskey et al., 2002).

A maior parte dos estudos sobre a patogênese da EP é realizada *in vivo*. A primeira alteração observada na infecção pela *L. intracellularis* é a hiperplasia da mucosa intestinal com progressiva substituição de enterócitos maduros e colunares das vilosidades, por células pouco diferenciadas, semelhantes às células do epitélio das criptas intestinais (Smith e McOrist, 1997). A alteração proliferativa está diretamente relacionada à infecção e replicação bacteriana. Entretanto, os mecanismos que promovem essa hiperplasia ainda não estão esclarecidos (Kroll et al., 2005; Guedes, 2007).

A redução temporária de mecanismos indutores de apoptose pela *L. intracellularis* poderia favorecer as alterações proliferativas. Na fase de resolução das lesões, a ausência da bactéria nos enterócitos associa-se ao aumento do número de células bem diferenciadas (McOrist et al., 1996). Contudo, Machuca et al. (1999) demonstraram aumento da apoptose nas vilosidades e criptas hiperplásicas de suínos com EP. Ainda, a identificação de caspase-3, por IHQ, foi significativamente maior em criptas hiperplásicas comparadas as criptas normais (Guedes, 2002). Dessa forma, provavelmente, a proliferação celular não é causada pela redução de apoptoses.

Com exceção das características proliferativas, até o momento não foram observados outros efeitos citopatológicos nos enterócitos infectados *in vitro* ou *in vivo* (Gebhart e Guedes, 2004). A inflamação pode ser observada nos estágios mais tardios da doença, mas não são características primárias da infecção por *L. intracellularis*.

A evolução e o desenvolvimento das lesões têm sido estudados em hamsters (Johnson e Jacoby, 1978; McOrist e Lawson, 1987) e suínos (Roberts et al., 1977; Guedes e

Gebhart, 2003b). Em hamsters, a inoculação oral com homogeneizado de mucosa de animais infectados demonstrou a presença da bactéria no citoplasma apical das células das criptas intestinais a partir do quinto dia pós-infecção. A mucosa foi gradualmente sendo revestida por células alongadas formando epitélio com aparência pseudo-estratificada com microvilosidades curtas e irregulares. Os enterócitos indiferenciados alcançaram o ápice das vilosidades no 14º dia pós-infecção e invadiram a muscular da mucosa no 17º dia. O desenvolvimento completo das lesões ocorreu no 25º após a inoculação (Johnson e Jacoby, 1978). Esse mesmo protocolo experimental evidenciou a presença da *L. intracellularis* associada a lesões proliferativas por mais de 40 dias pós-infecção (Jacoby, 1978).

A avaliação ultra-estrutural das lesões da EP em suínos e hamsters identificaram a presença da *L. intracellularis* no lúmen das criptas intestinais associados à membrana celular e em vacúolos intracitoplasmáticos (McOrist et al., 1989). As bactérias encontram-se livres no citoplasma enquanto as células infectadas entram em mitose transmitindo o microorganismo para as células filhas (McOrist et al., 1995b). Eventualmente, bactérias são liberadas no lúmen intestinal, o que permite a expansão da infecção no íleo, jejuno, ceco e cólon. As células M, importantes no reconhecimento antigênico do epitélio intestinal, podem estar envolvidas na patogênese da EP, visto a presença de lesões na região das placas de Peyer nas fases iniciais da infecção (McOrist et al., 1993).

Em suínos, a reprodução experimental identificou a bactéria a partir do quinto dia após a inoculação. As lesões microscópicas foram observadas no 11º dia pós-infecção (Guedes, 2002). A evolução da doença em suínos foi similar ao desenvolvimento das lesões em hamsters. Contudo, 29 dias pós-infecção, foi observada marcação imunoistoquímica e ausência de lesões

macroscópicas e histológicas em suínos experimentalmente infectados (McOrist e Lawson, 1987; Gebhart e Guedes, 2004).

O crescimento e manutenção *in vitro* da *L. intracellularis* permitiu a realização de estudos dos mecanismos envolvidos na entrada da bactéria em células susceptíveis e a evolução da infecção em cultura celular (Lawson et al., 1993). Embora não haja proliferação celular *in vitro*, a infecção em monocamada de células demonstrou a dinâmica da invasão bacteriana. McOrist et al. (1995b) observaram contato íntimo entre a *L. intracellularis* e a superfície de células eucariotas (IEC-18 e IPEC-J2) 10 minutos após a exposição à bactéria e, o microorganismo foi encontrado em vacúolos intracitoplasmáticos uma hora pós-exposição. A partir de três horas, a bactéria pode ser observada livre no citoplasma. Entre o segundo e o sexto dia no citoplasma celular, a bactéria multiplicou-se por divisão binária formando protruções celulares repletas de *L. intracellularis*, ruptura e liberação do agente no meio extracelular.

A replicação bacteriana no citoplasma das células das criptas intestinais associa-se a quadros de diarreia em animais infectados experimentalmente a partir do sétimo dia após inoculação oral da bactéria. Contudo, até o momento, os mecanismos fisiopatológicos determinantes para diarreia na EP ainda não são conhecidos (Moeser e Blikslager, 2007). A partir da hiperplasia das criptas intestinais, especula-se a possível redução na expressão de proteínas e transportadores de membrana na superfície celular comprometendo a capacidade de absorção. Fisiologicamente, as células das criptas possuem canais iônicos na superfície apical responsáveis pela secreção de íons cloreto (Cl<sup>-</sup>) (Welsh et al., 1982). A possível expressão desses canais na membrana apical de células hiperplásicas poderia intensificar a secreção no epitélio intestinal contribuindo para processo diarreico. Contudo, o envolvimento de mecanismos secretórios ou

absortivos na patogênese da EP não está esclarecido.

## 1.6 SINAIS CLÍNICOS

Em suínos, a EP apresenta três formas clínicas distintas: aguda, crônica e subclínica. A apresentação aguda, também chamada de enteropatia proliferativa hemorrágica, acomete suínos de 4 a 12 meses, normalmente animais de reposição ou próximos ao abate. Essa síndrome hemorrágica resulta em morte súbita onde o animal encontra-se pálido e com hemorragia intestinal profusa (Lawson e Gebhart, 2000). Por outro lado, a forma crônica ocorre em leitões em crescimento entre 2 a 4 meses de idade e caracteriza-se por anorexia, diarreia transitória, redução no ganho de peso, diminuição do crescimento e desuniformidade entre animais da mesma idade (Guedes, 2007). A manifestação crônica da enfermidade dificulta o diagnóstico pela não identificação da diarreia transitória no exame clínico do rebanho. Sinais clínicos da doença começam a ser observados entre o sétimo e o décimo dia após a inoculação experimental de cultura pura de *L. intracellularis* ou homogeneizado de mucosa intestinal de suínos infectados. Dessa forma, o período de incubação da bactéria é de aproximadamente sete dias (Lawson e Gebhart, 2000; Guedes, 2002).

A forma subclínica pode ser a apresentação mais comum da EP em suínos, no entanto, raramente é reconhecida pela ausência de sinais clínicos (Kroll et al., 2005). Os animais assintomáticos se alimentam normalmente, mas apresentam redução no ganho de peso diário, menor conversão alimentar e conseqüente diminuição no desempenho produtivo (McOrist e Gebhart, 1999). O baixo grau de infecção desses animais pode impedir a identificação de anticorpos no sangue, por meio de avaliações sorológicas, e a detecção do

agente nas fezes pela reação de cadeia polimerase (PCR) (Guedes, 2004).

A doença ocorre em hamsters entre três e oito semanas de vida e a manipulação excessiva, transporte e superlotação de gaiolas representam importantes fatores predisponentes. Além da diarreia, perda de peso, letargia e desidratação são os sinais clínicos mais relatados (Percy e Barthold, 2001). Em equinos, a EP tem sido descrita com maior frequência em potros desmamados de três a doze meses de idade. Nesses animais, a enfermidade cursa com cólica, diarreia aquosa, perda de peso e hipoproteinemia associada à leucocitose (Bihl, 2003).

### 1.7 LESÕES

Em todas as espécies afetadas, o espessamento da mucosa intestinal é a alteração macroscópica mais evidente sendo facilmente identificada à necropsia. Em suínos, o exame *post-mortem* de animais mortos subitamente pode ser determinante para confirmação da forma aguda da EP. As lesões são normalmente observadas no íleo e caracterizam-se por espessamento da parede intestinal, edema e congestão do mesentério, rugosidade da mucosa com pregas bem evidentes e conteúdo intestinal fibrino-hemorrágico associado à presença de coágulo (Morés et al., 1985). Embora o íleo seja o segmento intestinal mais afetado, as lesões podem ser encontradas do duodeno ao reto (Guedes, 2002). Em camundongos, a reprodução experimental da doença demonstrou lesões preferencialmente na região do ceco (Murakata et al., 2008).

As lesões macroscópicas, observadas com maior frequência em hamsters, equinos e suínos, associam-se a forma crônica da enfermidade (Johnson e Jacoby, 1978; AlGhamdi, 2003; Kroll et al., 2005). Além do espessamento da parede intestinal e a maior evidência das pregas da mucosa, placas de material necrótico podem estar

presentes aderidas à superfície do intestino (Ward e Winkelman, 1990). À necropsia, as alterações podem ser discretas, caracterizadas por edema de mesentério associado à lesão proliferativa focal. Nesses casos, a avaliação das lesões é subjetiva e depende da experiência do observador (Guedes et al., 2002). Dessa forma, o envio de amostras para exame histopatológico é necessário para a confirmação do diagnóstico.

A EP possui basicamente as mesmas características histopatológicas independente da espécie acometida e da apresentação clínica. As lesões caracterizam-se por proliferação das células das criptas de Lieberkühn no intestino delgado associado à presença de microorganismo intracelular no citoplasma apical desses enterócitos (Rowland e Lawson, 1974). As criptas tornam-se alongadas, dilatadas, maior presença de células imaturas e elevado índice mitótico. Há significativa redução no número de células caliciformes nas criptas afetadas (Gebhart e Guedes, 2004). A infiltração de células inflamatórias é mínima e não constitui uma característica marcante da enfermidade (McOrist e Gebhart, 1999). Na forma aguda, os animais apresentam congestão intensa de vasos sanguíneos da mucosa com presença de sangue no lúmen intestinal (Morés et al., 1985). Em suínos e hamsters foi demonstrado encurtamento e irregularidade das microvilosidades nas células infectadas (Johnson e Jacoby, 1978; Lomax e Glock, 1982).

### 1.8 DIAGNÓSTICO

Desde a primeira descrição da doença, o diagnóstico da EP é baseado na avaliação clínica e anatomopatológica. Ao longo dos anos, o desenvolvimento de técnicas diagnósticas sensíveis e específicas permitiu o reconhecimento da doença também *ante-mortem* com identificação do microorganismo ou de anticorpos específicos para *L. intracellularis*. Os

principais métodos diagnósticos disponíveis são apresentados na Tabela 1.1.

O diagnóstico *post-mortem* é realizado pelo reconhecimento das lesões macroscópicas associadas às alterações histológicas de hiperplasia das criptas intestinais observadas pela coloração de HE (Rowland et al., 1978). A bactéria pode ser demonstrada na porção apical de enterócitos imaturos por técnicas histoquímicas de coloração pela prata (Rowland e Lawson, 1974; Mores et al., 1985), IFA (imunofluorescência indireta)

(McOrist et al., 1987), FISH (*Fluorescent in situ hybridization*) (Gebhart et al., 1994; Boye et al, 1998) e IHQ (Jensen et al., 1997) usando anticorpo específico contra *L. intracellularis* (McOrist et al., 1987). A partir de estudo comparativo utilizando anticorpos específicos para *L. intracellularis*, Guedes et al. (2002) demonstraram que a técnica de IHQ é mais sensível que a coloração histológica de HE, histoquímica (Warthin Starry) e PCR de amostras fecais.

Tabela 1.1 – Técnicas de diagnóstico disponíveis para EP em suínos com detecção direta ou indireta de *L. intracellularis* (modificado: Kroll et al., 2005).

<b>Técnica</b>	<b>Método de detecção</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>	<b>Referência</b>
H E	Hiperplasia de criptas intestinais	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presença de lesões características</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diagnóstico <i>post-mortem</i></li> </ul>	Rowland et al., 1973.
Histoquímica (Warthin Starry)	Identificação do microorganismo intracelular	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Detecção da bactéria no tecido lesado</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Não específico</li> <li>• Diagnóstico apenas <i>post-mortem</i></li> </ul>	Morés et al., 1985.
IHQ e IFA	Identificação de antígenos específicos para <i>L. intracellularis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta sensibilidade e especificidade</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diagnóstico apenas <i>post-mortem</i></li> </ul>	Guedes et al., 2002.
PCR e FISH	Identificação de seqüências específicas da <i>L. intracellularis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diagnóstico <i>ante-mortem</i> (em fezes)</li> <li>• Alta especificidade</li> <li>• Detecção de outros patógenos (PCR multiplex)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Baixa sensibilidade</li> <li>• Presença de inibidores nas fezes</li> </ul>	Jones et al., 1993. Gebhart et al., 1994. Boye et al., 1998. Nathues et al., 2007.
IFA, IPMA e ELISA	IgG no soro	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Avaliação <i>ante-mortem</i></li> <li>• Alta sensibilidade e especificidade</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Avaliação indireta</li> <li>• Não identifica animal infectado</li> </ul>	Guedes et al., 2002. Knittel et al., 1998. Boesen et al., 2005.

Em suínos, outras infecções entéricas são importantes no diagnóstico diferencial da EP. Na forma aguda, a coleta de tecidos

para exames bacteriológicos são importantes para descartar suspeitas de enterocolite por *Salmonella enterica*

sorotipo Typhimurium e infecções por *Brachyspira hyodysenteriae* (disenteria suína). Ainda, úlceras gástricas e síndrome intestinal hemorrágica também devem ser consideradas (Guedes et al., 2002). Os diagnósticos diferenciais da forma crônica em suínos devem incluir doenças que cursam com diarreia persistente, como: gastroenterite transmissível enzoótica (TGE), infecções por *Brachyspira pilosicoli* (colite espiroquetal), disenteria suína, enterocolite por *S. enterica* sorotipo Typhimurium, colibacilose e hipersensibilidade a soja (Guedes, 2007). Em equinos, é importante diferenciar a EP das principais causas de diarreia e hipoproteïnemia, como por exemplo: enterites por *Strongylus sp.*, *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium, *Clostridium sp.*, *Rhodococcus equi*, *Campylobacter jejuno*, *C. fetus*, Rotavirus e Parvovirus (Bihl, 2003).

Em hamsters, infecções por *S. enterica* sorotipo Typhimurium, *Escherichia coli*, enterocolite por *Bacillus piliformis* (Doença de Tyzzer) e por *Clostridium difficile* devem constar no diagnóstico diferencial da EP (Van Hoosier e Ladiges, 1984; Percy e Barthold, 2001).

A avaliação sorológica por ELISA (teste imuno-enzimático de absorbância), IFA e IPMA (imunoperoxidase em monocamadas de células) e a PCR são as técnicas de diagnóstico disponíveis em animais vivos. A PCR identifica o DNA específico da bactéria nas fezes e permite o reconhecimento dos animais infectados e eliminando o microorganismo nas fezes (Guedes et al., 2002). Entretanto, a técnica apresenta baixa sensibilidade (entre 40 e 70%) pela alta presença de inibidores da enzima polimerase nas fezes (Jones et al., 1993). A identificação de IgG no soro de animais com EP pode ser feita por ELISA, IFAT e IPMA (Guedes et al., 2002; Boesen et al., 2005). O diagnóstico por ELISA pode ser uma opção interessante para a

determinação da fase provável da infecção no sistema de produção de suínos. O reconhecimento da dinâmica da infecção no rebanho tem como objetivo direcionar as medidas de medicação estratégica ou vacinação.

## 1.9 CONTROLE

O controle da EP em suínos é realizado pela adição de antimicrobianos na ração. Pulsos de medicamentos na ração por duas semanas com intervalos de três semanas tem sido um procedimento freqüente na fase final de creche, recria e terminação (Guedes, 2007). A escolha do antimicrobiano a ser utilizado deve ser baseada no conhecimento do princípio farmacológico, custo da droga, idade dos animais e presença de outras enfermidades concomitantes que possam ser controladas pelo mesmo antimicrobiano (Guedes, 2003). Esse protocolo terapêutico tem sido empregado em rebanhos com a forma crônica da doença, onde a mortalidade é mínima, contudo existe impacto significativo no desempenho produtivo dos animais.

A administração endovenosa de eletrólitos, a utilização de anti-inflamatórios, e a antibioticoterapia são as principais práticas empregadas no tratamento da EP em equinos (Frank et al., 1998).

Independente da espécie, os grupos de antimicrobianos eficientes no tratamento e controle da EP são os macrolídeos, as tetraciclina, lincosamidas e pleuromitilinas. Fármacos do grupo dos macrolídeos são os mais utilizados em suínos e equinos (Lee et al., 2001; Atherton e McKenzie, 2006). Em hamsters, a antibioticoterapia com tetraciclina mostrou-se eficiente (Regina et al., 1980).

A avaliação da eficiência de antimicrobianos *in vivo* tem sido realizada através da reprodução experimental da EP

em suínos (França, 2007). Neste contexto, a redução da eliminação de bactérias nas fezes, detectada por PCR, a diminuição da extensão e severidade das lesões macroscópicas no intestino e a melhora no desempenho de animais medicados são os parâmetros avaliados (Schwartz et al., 1999; Walter et al., 2001).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 ANIMAIS

Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da UFMG (CETEA) (Protocolo nº 156/2007) e cumpriu as normas exigidas pelo órgão. No experimento foram utilizados 60 syrian hamsters (*M. auratus*) machos, entre duas e três semanas de idade e com peso médio de 34,1(±11,5) gramas. Os animais eram procedentes do biotério do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG, onde não havia histórico de EP ou qualquer outra infecção entérica.

Os hamsters permaneceram em caixas de polipropileno (com dimensões de 41 cm de comprimento x 34 cm de largura x 16 cm de altura), ambiente controlado (12 horas de luz diária e temperatura entre 20 e 25°C), recebendo ração comercial (Labina - Purina®) e água à vontade. O experimento foi conduzido em três blocos com 20 animais cada, sendo estes divididos em dois grupos: grupo infectado (n=10) e grupo controle (n=10). Cada grupo foi separado em duas caixas com cinco hamsters cada. Os animais foram pesados individualmente no dia anterior à inoculação, 9, 18 e 26 dias pós-inoculação. O projeto foi desenvolvido em três períodos diferentes, cada período representando um bloco.

A utilização da vacina viva modificada (Enterisol® Ileitis) em suínos tem mostrado o desenvolvimento imunidade humoral e celular contra *L. intracelullaris* (Guedes e Gebhart, 2003b). Suínos vacinados, além de apresentarem melhor desempenho comparado aos animais não vacinados, tiveram redução na utilização de antimicrobianos na ração (Bak e Rathkjen, 2009).

### 2.2 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

No preparo do inóculo, foram utilizados segmentos intestinais de suínos com lesões macroscópicas e histológicas típicas de EP, com confirmação da infecção por *L. intracelullaris* por IHQ. Os intestinos foram congelados e mantidos a -80°C. No dia da inoculação, após o descongelamento desse material, realizaram-se secções longitudinais com tesoura e posterior raspagem da mucosa intestinal com lâminas de vidro. O material obtido foi homogeneizado na proporção de 1:1 em solução de SPG (pH 7,0) contendo sacarose (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>; 0,218M), fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,0038M), fosfato dipotássico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,0072M) e ácido L-glutâmico. (Winkelman et al., 2002; Guedes et al., 2003). Após homogeneização manual, o material foi macerado em um triturador de tecidos de vidro (Pirex® - USA nº7727).

Amostras do homogeneizado foram coletadas para avaliações bacteriológicas e parasitológicas as quais asseguraram a ausência de patógenos entéricos que, eventualmente, pudessem interferir nas avaliações das respostas à infecção experimental.

A quantificação da concentração de bactéria presente no inóculo foi realizada, em cada um dos blocos, por meio de diluições seriadas de 1:10 em solução PBS (pH 7,2), impregnação em lâmina de vidro e coloração por imunoperoxidase (Guedes et al., 2002).

Resumidamente, a partir de uma lâmina de vidro contendo 12 poços, adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  de cada diluição por poço e, em seguida, foi incubada em estufa a  $37^\circ\text{C}$  até completa secagem (aproximadamente 30 minutos) (Figura 2.1A). Posteriormente, a lâmina foi fixada em acetona gelada ( $-20^\circ\text{C}$ ) e utilizada técnica de imunoperoxidase indireta

utilizando anticorpo policlonal específico para *L. intracellularis* (Guedes e Gebhart, 2003c). Realizou-se a contagem de organismos de *L. intracellularis* marcados, por microscopia ótica, e a concentração final de bactérias obtida pela multiplicação do número contado e o valor da diluição avaliada (Figura 2.1B).

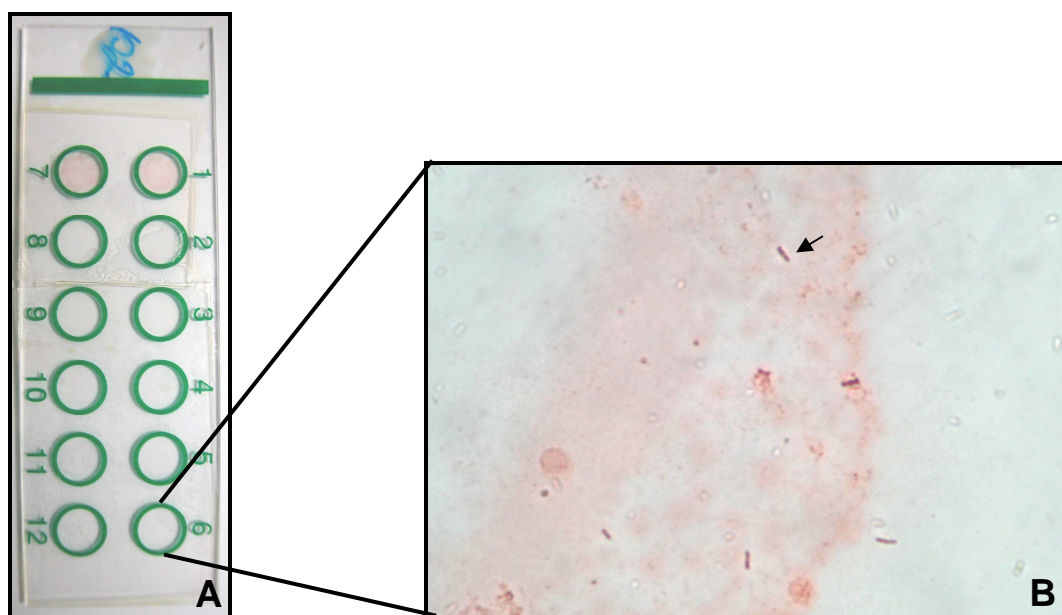


Figura 2.1 – Quantificação da concentração de *L. intracellularis* no inóculo utilizado para reprodução experimental da enteropatia proliferativa em hamsters. (A) Lâmina contendo poços usados na diluição do homogeneizado de mucosa, sendo: 7 – controle positivo e 8 – controle negativo. (B) Detecção de anticorpos contra *L. intracellularis* por imunoperoxidase (seta). Aumento 400x.

### 2.3 INOCULAÇÃO

Ao início de cada bloco (dia -2) os animais permaneceram 48 horas em adaptação. No dia zero, cada hamster do grupo infectado recebeu, por “gavage” (via intragástrica), 1 mL de homogeneizado de mucosa intestinal

(Figura 2.2A). A concentração do inóculo foi de aproximadamente  $6,4 \times 10^9$ ,  $2,1 \times 10^9$  e  $1,4 \times 10^{10}$  organismos de *L. intracellularis* por mL no 1º, 2º e 3º blocos, respectivamente. O grupo controle recebeu, pela mesma via, 1 mL de SPG (Figura 2.2B).

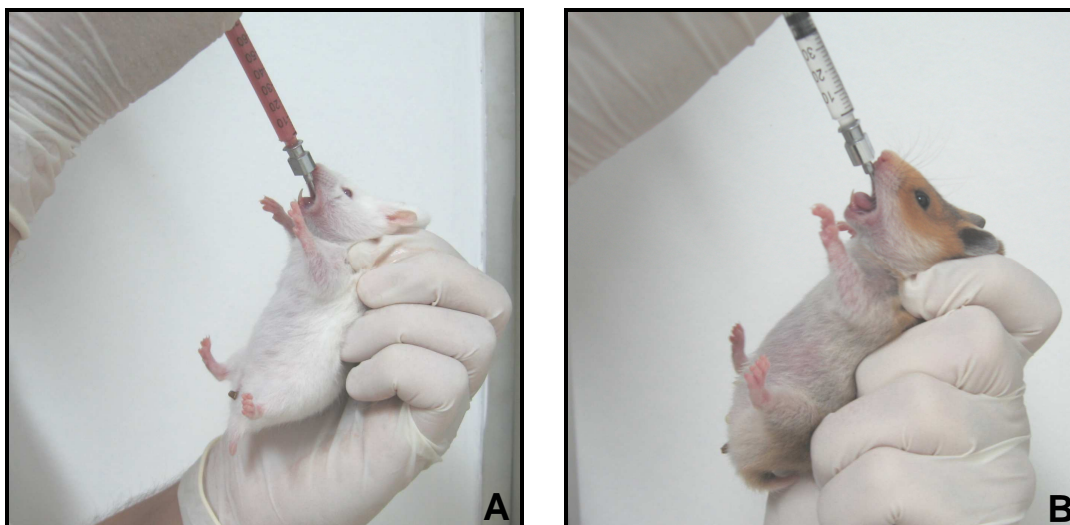


Figura 2.2 – Inoculação experimental com agulha de “gavage” em hamsters. (A) Inoculação de homogeneizado de mucosa de suínos contendo *L. intracellularis* (Grupo Infectado). (B) Inoculação de solução SPG (Grupo Controle).

#### 2.4 AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO INTESTINAL

A presença de saculações na porção lateral da cavidade oral de hamsters (“check pouch”) tem como função armazenar e transportar alimentos. Desta forma, com objetivo de evitar interferências na avaliação da absorção intestinal e complicações cirúrgicas, o jejum pré-operatório dos animais foi de aproximadamente 36 horas. O protocolo cirúrgico utilizado foi adaptado de experimentos de fisiologia da absorção intestinal em ratos Wistar (Borges et al., 1998; Borges et al., 2003; Machado et al., 2005).

No dia 26 após a inoculação, os hamsters foram anestesiados com xilazina (10 mg/Kg) e quetamina (200mg/Kg) adicionadas à mesma seringa, por via intraperitoneal (Clifford, 1984). O procedimento cirúrgico consistiu na exposição do intestino delgado, por laparotomia xifo-púbica, com preservação dos nervos e vasos. Duas cânulas foram introduzidas no intestino e fixadas por ligaduras, sendo a primeira

imediatamente caudal à flexura duodeno-jejunal, e a segunda cranial à válvula ileocecal (Figura 2.3A). Em seguida realizou-se sutura da parede abdominal com fio de algodão para evitar desidratação do tecido. As cânulas permaneceram exteriorizadas nas extremidades da sutura para infusão e drenagem de fluido. As cirurgias foram realizadas no Laboratório de Fisiologia da Nutrição no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

A solução Tyrode (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,36mM CaCl<sub>2</sub>, 0,49 mM MgCl<sub>2</sub>, 11,9 mM NaHCO<sub>3</sub> e 5mM D-glicose), a 37°C, pH 8, foi infundida, a partir do jejuno, na velocidade de 0,25 mL/min., por 20 minutos, para equilíbrio do ambiente intestinal (Figura 2.3B). Após esse período, os animais foram submetidos à infusão de solução Tyrode 2 com o dobro da concentração de glicose, cloro, sódio e potássio. Amostras do líquido foram coletadas a partir da cânula aboral aos 10, 20, 30 e 40 minutos em tubos de ensaio refrigerados.

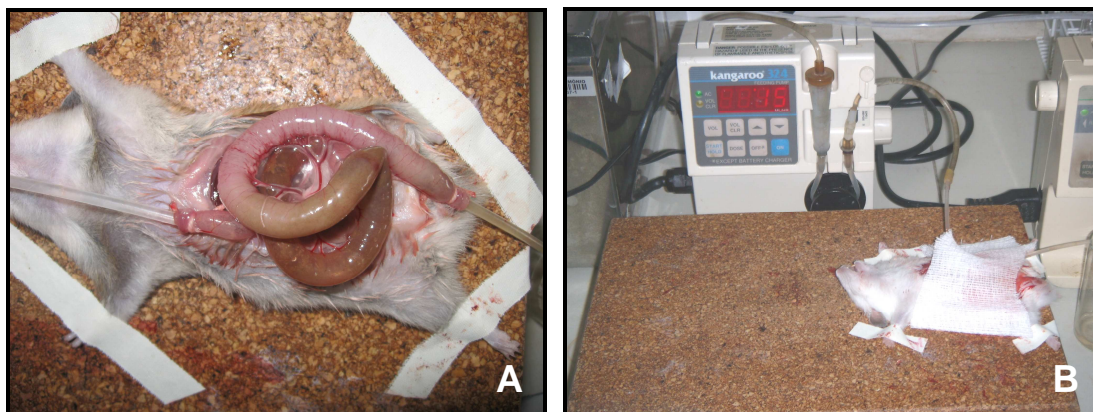


Figura 2.3 – Procedimento cirúrgico para avaliação da absorção intestinal em hamsters experimentalmente infectados com *L. intracellularis*. (A) Cânulas fixadas por ligadura caudal à flexura duodeno-jejunal e cranial à válvula ileocecal. (B) Infusão intestinal da solução Tyrode a velocidade de 0,25 mL/min.

## 2.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Os índices de absorção intestinal foram obtidos pela diferença entre a quantidade, infundida e drenada por minuto, em cada tomada de tempo (10, 20, 30 e 40 minutos). Todas as avaliações bioquímicas foram conduzidas em duplicatas sendo considerada a média entre as duas leituras.

A concentração de glicose foi determinada por método de reação enzimática baseado na utilização da glicose oxidase (Glicose GOD-ANA, Labtest®), a partir de curva padrão (Lott e Turner, 1975). Para realização do teste, 10  $\mu$ L de cada amostra foi adicionada em tubo de ensaio juntamente com 1 mL do reagente. Após homogeneização, a solução foi incubada em banho-maria a 37°C durante 15 minutos. Posteriormente, realizou-se a quantificação da absorbância das amostras por espectrofotometria e os resultados foram expressos em mg/dL (Borges et al., 2003).

Também por espectrofotometria mensurou-se a concentração de íons cloreto ( $\text{Cl}^-$ ), neste caso, a partir de kit comercial, Cloreto colorimétrico (Bioclin® K050). Com o objetivo de permitir a correta quantificação da absorbância pelo espectrofotômetro, as

amostras foram diluídas na proporção 1:4. Resumidamente, adicionou-se em tubos de ensaio 10  $\mu$ L das amostras diluídas, 3,5 mL do reagente e 100  $\mu$ L do ativador da reação. Em seguida, realizou-se a leitura, considerando os valores em mMol/L, e multiplicou-se o resultado por 4, fator de diluição.

As concentrações de íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) e potássio ( $\text{K}^+$ ) foram determinadas por fotometria de chama. A leitura foi realizada a partir da diluição de 10  $\mu$ L de cada amostra em 3,0 mL de água deionizada, utilizando fotômetro de chama, CELM® FC 280. Os valores de ambos foram expressos em mMol/L.

## 2.6 AVALIAÇÕES ANATOMO-HISTOPATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA

Ao término do procedimento cirúrgico, realizou-se eutanásia dos animais, por sobre dose dos fármacos utilizados para anestesia. À necropsia, avaliaram-se macroscopicamente os intestinos delgados e grosso quanto à presença de alterações patológicas compatíveis com enteropatia proliferativa.

Toda a porção intestinal presente entre as cânulas foi coletada, fixada em formol tamponado a 10%, processada pela técnica de rotina com inclusão em parafina e corada pela técnica histológica de HE (Luna, 1968). Os mesmos fragmentos foram submetidos à técnica de IHQ com anticorpo policlonal específico anti-*L. intracellularis* (Guedes e Gebhart, 2003c) na diluição de 1:30.000, pelo método da streptavidina-biotina marcada com peroxidase (Dako, Corporation, LSAB+, cat. K0690) e solução de cromógeno AEC (3-amino-9-etil-carbazol). A marcação pela IHQ foi graduada em escala de zero a quatro, sendo grau zero, nenhuma marcação anti-*L. intracellularis*; grau um, até 25% da mucosa intestinal com marcação; grau dois, 25 a 50% da mucosa marcada; grau três, 50 a 75% da mucosa marcada; e grau quatro, acima de 75% da mucosa com marcação antigênica (Guedes, 2002; França, 2007). As avaliações macro e microscópicas foram realizadas por um único observador.

## 2.7 AVALIAÇÕES HISTOMORFOMÉTRICAS

Os cortes histológicos, corados em HE, foram também utilizados para as avaliações histomorfométricas. A partir da seleção de vilosidades íntegras (porções basais, mediais e apicais aparentes e contínuas) utilizou-se régua graduada em micrômetros para mensurações. Posteriormente, o cálculo real foi obtido considerando o fator de correção do microscópio utilizado. A contagem foi realizada a partir da porção terminal do íleo no sentido cranial.

Os parâmetros foram mensurados na lente objetiva de 20 vezes através da contagem de 30 vilosidades e criptas por animal com obtenção das médias e desvios padrões. Neste contexto, as variáveis mensuradas foram altura das vilosidades e profundidade das criptas (Gurmini et al., 2005) (Figura 2.4). Os valores medidos permitiram o cálculo da relação vilosidade/cripta.



Figura 2.4 – Intestino delgado de syrian hamsters. Avaliação histomorfométrica: altura de vilosidade – linha reta do centro da porção basal até o ápice da vilosidade (linha azul) e profundidade de cripta – linha reta da lâmina própria do epitélio mais profundo da cripta até a junção vilosidade/cripta (linha vermelha). Aumento 200x.

## 2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental foi em parcelas subdivididas onde cada um dos três períodos em que o experimento foi realizado representou um bloco. Cada grupo (inoculado e controle) foi identificado como uma parcela e os tempos avaliados caracterizaram as sub-parcelas. Na comparação das médias utilizou-se o Teste t student e Mann Whitney, para variáveis com distribuição paramétrica (índices de absorção intestinal) e não paramétrica (imunistoquímica e histomorfometria), respectivamente. Ainda, correlações estatísticas foram determinadas pelo coeficiente de Pearson e de Spearman, para variáveis com distribuição paramétrica e não paramétrica, respectivamente.

Na análise estatística, foram realizadas comparações entre: animais positivos por IHQ (grupo infectado); animais positivos com diferentes intensidades de marcação por

IHQ (grupo Lawsonia +1 e +2) e animais controle.

## 3. RESULTADOS

### 3.1 INFECCÃO EXPERIMENTAL

Os animais foram desafiados em média com aproximadamente  $7,5 \times 10^9$  organismos de *L. intracellularis*. Os hamsters que receberam homogeneizados de mucosa apresentaram-se menos dóceis durante as pesagens a partir do 9º dia pós-infecção. Não foram observadas, em nenhum dos dois grupos, outras alterações clínicas relevantes. O peso médio dos animais infectados foi numericamente inferior aos animais do grupo controle nas três pesagens realizadas após a inoculação, com tendência à significância estatística ( $p < 0,06$ ) aos 9 dias pós-inoculação (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 – Peso médio, em gramas (média  $\pm$  desvio padrão), dos grupos controle e infectado durante a reprodução experimental da EP em hamsters.

Grupos	Peso dia -1	Peso dia 9	Peso dia 18	Peso dia 26
Controle (n=30)	34,1 $\pm$ 11,5	60,4 $\pm$ 11,2	71,2 $\pm$ 10,7	73,4 $\pm$ 10,6
Lawsonia (n=30)	34,2 $\pm$ 11,6	55,6 $\pm$ 7,3	68,7 $\pm$ 7,0	70,1 $\pm$ 9,2

À necropsia, três animais do grupo inoculado apresentaram lesões compatíveis com enteropatia proliferativa. Em um deles, as lesões estavam distribuídas difusamente por todo intestino delgado (Figura 3.1A). Os

outros dois hamsters com alterações macroscópicas apresentaram lesões focalmente extensas no terço final do intestino delgado (Figura 3.1B). Não foram observadas alterações macroscópicas, histológicas ou marcação por IHQ nos animais do grupo controle.

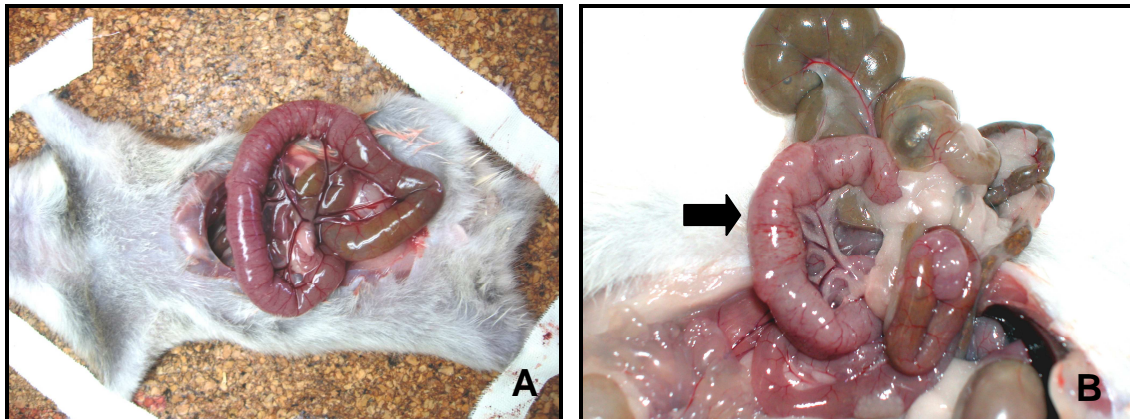


Figura 3.1 – Intestino delgado de hamsters infectados com *L. intracellularis*. (A) Espessamento difuso da parede do intestino delgado. (B) Espessamento da parede intestinal na região do íleo (seta).

Histologicamente, 21 (70%) animais inoculados com homogeneizado de mucosa apresentaram hiperplasia multifocal de enterócitos das criptas intestinais associadas à redução no número de células caliciformes com ampla variação na intensidade das lesões entre os animais. A hiperplasia caracterizava-se pela presença de vilosidades longas e tortuosas revestidas por epitélio de aspecto pseudo-estratificado (Figura 3.2). As lesões discretas eram representadas por hiperplasia de enterócitos das criptas e consequente dilatação multifocal das mesmas. No animal

com espessamento difuso da mucosa intestinal, observado à necropsia, as lesões histológicas proliferativas foram acompanhadas de hiperplasia do tecido linfóide associado ao intestino, infiltração inflamatória linfo-histiocitária e neutrofílica na lâmina própria e submucosa, raras células multinucleadas e macrófagos com características epitelióides (Figura 3.3). Em nove hamsters (30%) não foram observadas lesões histológicas indicativas de enteropatia proliferativa. Três destes animais (10%) não apresentaram marcação contra antígenos *L. intracellularis* à IHQ.

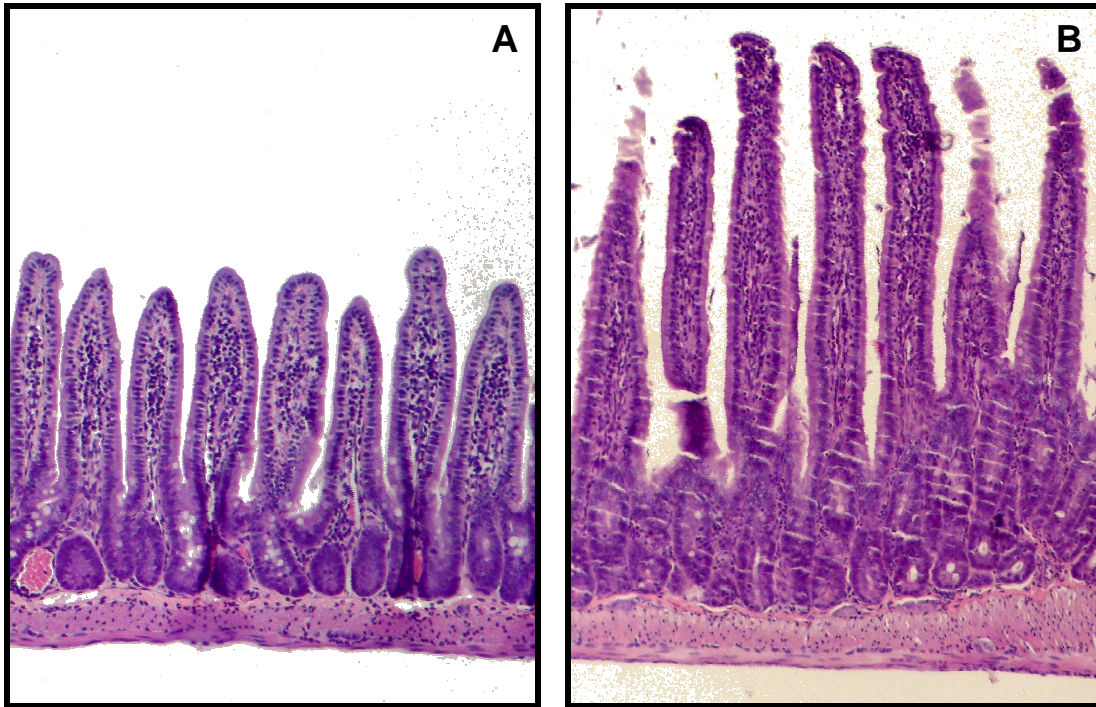


Figura 3.2 – Intestino delgado de syrian hamster (26 dias pós-inoculação). (A) Animal inoculado com SPG (grupo controle). Aumento 100x. (B) Animal inoculado com homogeneizado de mucosa intestinal contendo *L. intracellularis* (grupo infectado) apresentando hiperplasia de células das criptas e alongamento das vilosidades. Aumento 100x.

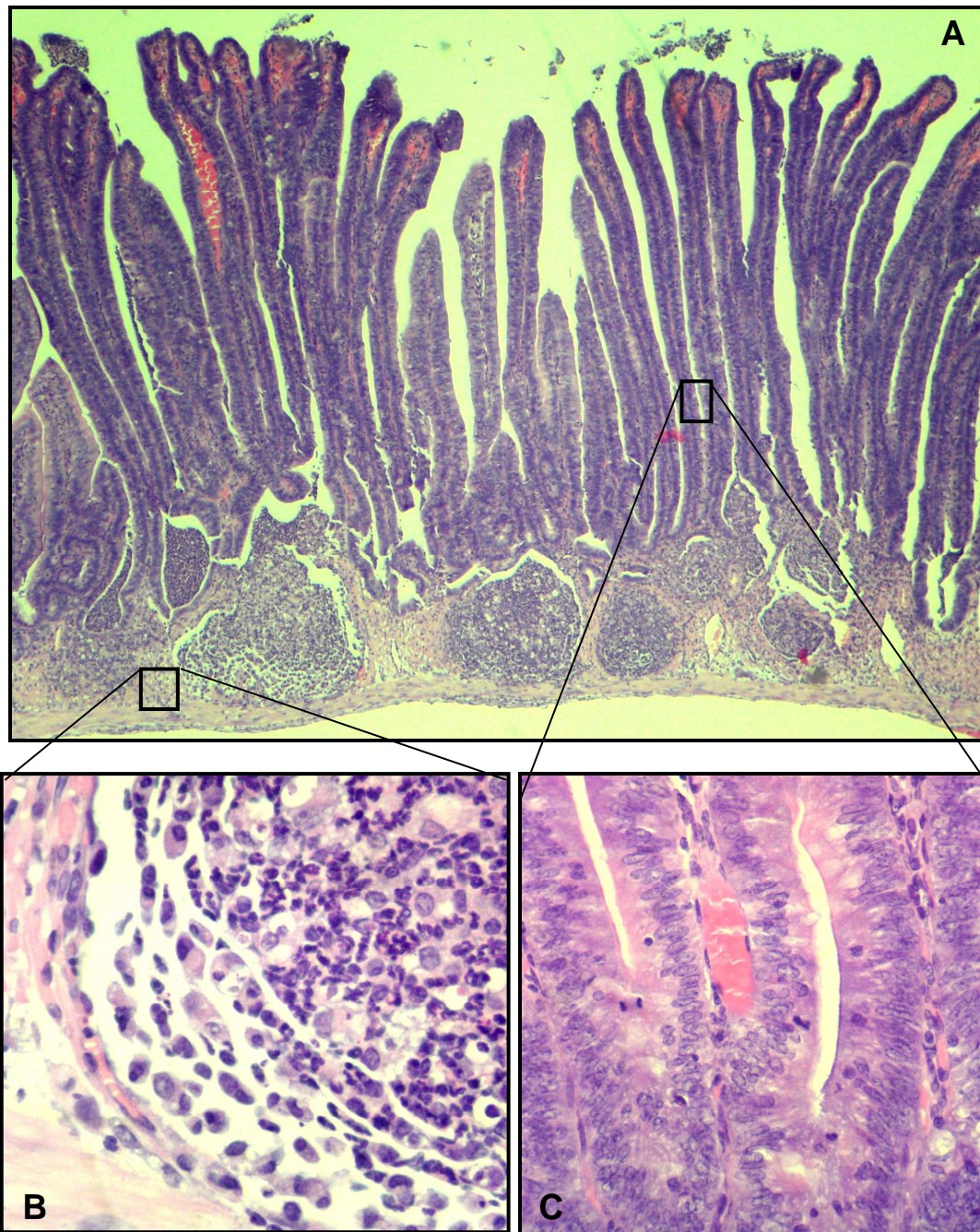


Figura 3.3 – Intestino delgado de syrian hamster experimentalmente infectado com homogeneizado de mucosa intestinal de suínos contendo *L. intracellularis*. (26 dias pós-inoculação). (A) Proliferação das criptas intestinais. Hiperplasia do tecido linfóide associado ao intestino. Aumento 40x. (B) Submucosa apresentando infiltração inflamatória linfo-histiocitária e neutrofílica. Aumento 400x. (C) Cripta hiperplásica caracterizada pela redução no número de células caliciformes e elevado índice mitótico. Aumento 400x.

A intensidade da infecção foi avaliada por IHQ por meio da presença e quantidade de antígeno de *L. intracellularis* em cortes histológicos da porção do intestino delgado submetida à avaliação da absorção intestinal. Todos os animais do grupo controle foram negativos à IHQ. Em 90% (27/30) dos

hamsters inoculados com homogeneizado houve marcação positiva na IHQ (Tabela 3.2), confirmando a reprodução experimental da EP.

Tabela 3.2 – Intensidade da infecção por *L. intracellularis*, baseado na marcação por IHQ, em fragmentos de intestino delgado de syrian hamsters inoculados com homogeneizado de mucosa de suínos.

Grupo	Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4	Total de positivos
Controle (n=30)	30	0	0	0	0	0
Lawsonia (n=30)	3	10	13	2	1	27

Grau 0 – nenhuma marcação anti-*L. intracellularis*; Grau 1 – até 25% da mucosa intestinal e lâmina própria marcadas; Grau 2 – 25 a 50% da mucosa e lâmina própria marcadas; Grau 3 – 50 a 75% da mucosa e lâmina própria marcadas; Grau 4 – acima de 75% da mucosa e lâmina própria marcadas.

Houve ampla variação na intensidade de marcação entre os animais infectados, no entanto, observou-se predomínio do grau dois, representado por marcações multifocais em células das criptas intestinais e macrófagos da lâmina própria (Figura 3.4). O animal que apresentou espessamento da parede intestinal difuso à necropsia e hiper-

plasia do tecido linfóide associado à intensa proliferação das criptas intestinais na avaliação histológica, também apresentava mais de 75% da mucosa infectada (marcação grau 4). Os dois hamsters com marcação grau três também demonstraram lesões compatíveis com enteropatia proliferativa à necropsia ao exame histopatológico.

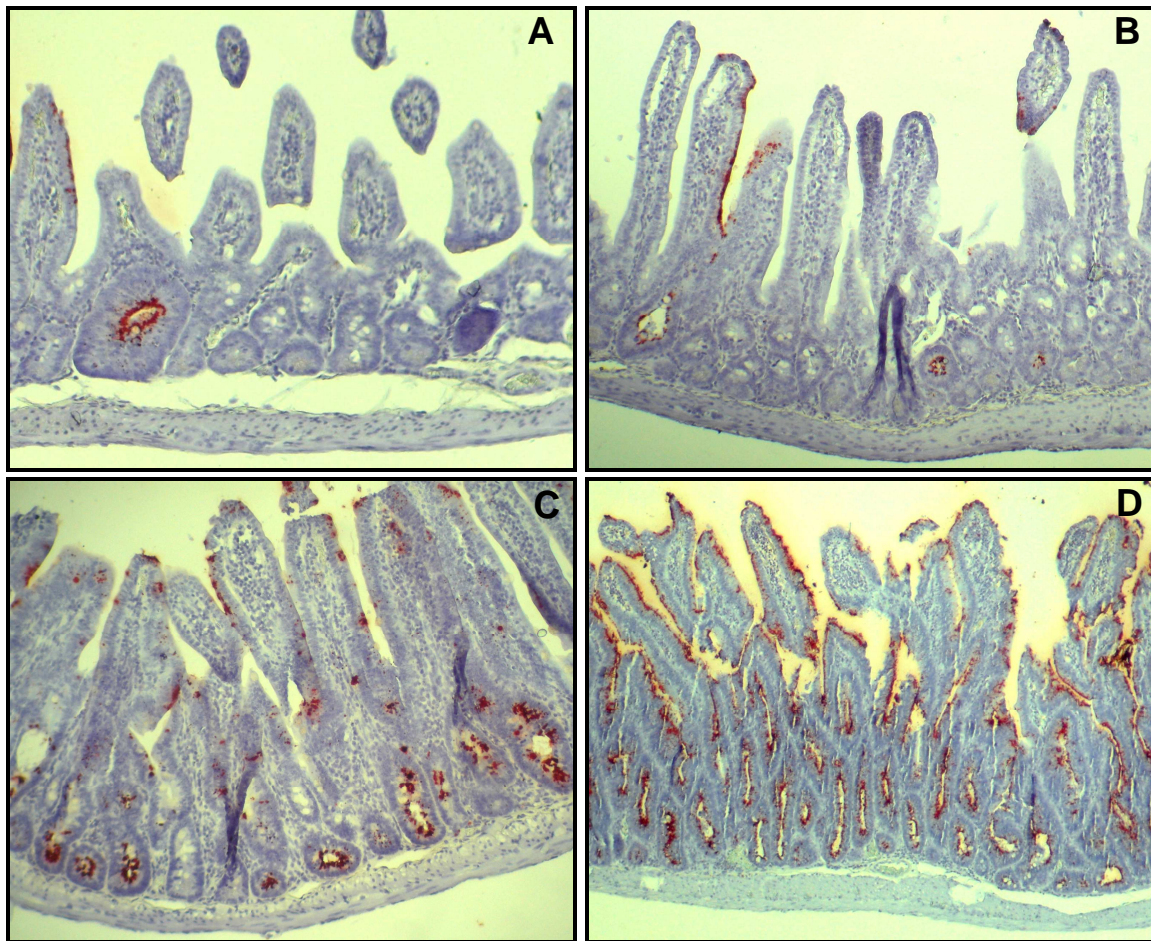


Figura 3.4 – Intestino delgado de syrian hamsters experimentalmente infectados com *L. intracellularis* corado pela técnica de IHQ utilizando anticorpo policlonal (diluição 1:30.000). Diferentes graus de marcação: (A) Grau um, até 25% da mucosa infectada pela bactéria (200x); (B) Grau dois, 25 a 50% da mucosa infectada (100x); (C) Grau três, 50 a 75% da mucosa infectada (100x) e (d) Grau quatro, acima de 75% da mucosa infectada (40x).

### 3.2 ABSORÇÃO INTESTINAL

Durante os procedimentos cirúrgicos cinco animais do grupo controle e dois do grupo inoculado vieram a óbito. Um desses hamsters infectados foi o mesmo que apresentou lesões macro e microscópicas mais graves e maior intensidade de marcação por IHQ. No outro animal do grupo infectado, foram observadas lesões histológicas multifocais discretas e marcação IHQ grau um. Portanto, o procedimento de infusão intestinal foi realizado em 28 animais

inoculados com homogeneizado e 25 controles.

Os três hamsters inoculados com *L. intracellularis* e negativos na IHQ não foram incluídos na análise estatística que comparou a absorção intestinal entre os grupos. Desta forma, a avaliação dos resultados foi realizada a partir das diferenças entre a quantidade de glicose, sódio, potássio e cloreto infundidas e coletadas por minuto em quatro tempos (10, 20, 30 e 40 minutos). Neste contexto os resultados obtidos

indicavam a absorção intestinal de cada animal nos diferentes tempos avaliados. Desta forma, as médias do grupo inoculado com homogeneizado e positivo por IHQ (Grupo Lawsonia+/n=25) foram comparadas com as do grupo inoculado com solução SPG (Grupo Controle/n=25).

A diferença entre a quantidade de glicose, em miligramas por minuto (mg/min.), infundida

e coletada na porção aboral do íleo está representada na Figura 3.5. A curva do gráfico foi similar entre os grupos, no entanto, os valores médios observados no grupo Lawsonia+ foi significativamente inferior ao do grupo controle aos 40 minutos ( $p<0,05$ ), indicando menor absorção intestinal de glicose.

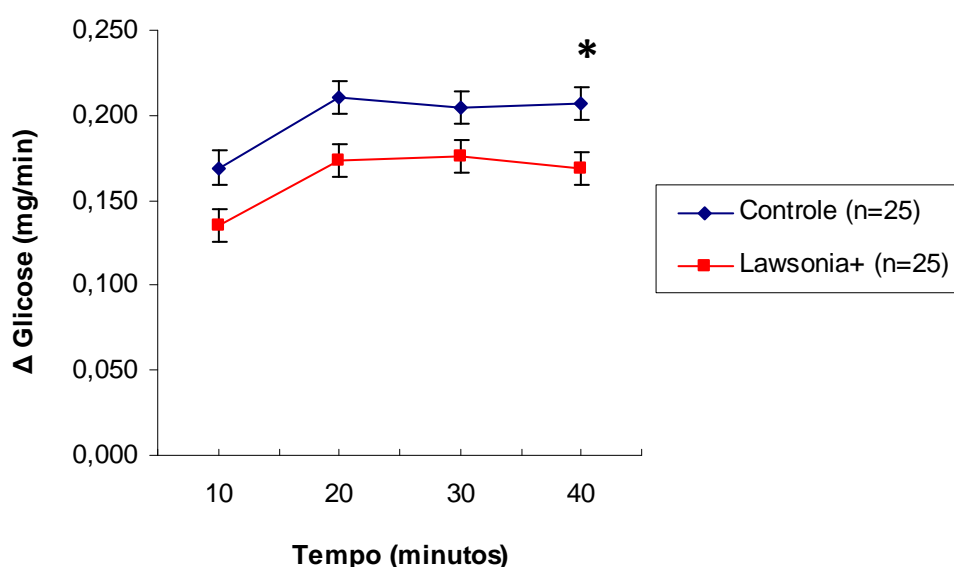


Figura 3.5 – Diferença (média  $\pm$  erro padrão) entre a quantidade de glicose (mg) por minuto infundida e coletada no intestino delgado de hamsters experimentalmente infectados com *L. intracellularis* (Grupo Lawsonia+) e inoculados com solução SPG (Grupo Controle) em diferentes tempos. Diferença estatística entre os grupos: \*  $p<0,05$ .

As médias do grupo controle foram comparadas com diferentes categorias de marcação por IHQ. Não houve diferença estatística entre os animais com marcação grau 1+ (n=10) e o grupo controle (n= 25). Entretanto, a quantidade de glicose foi estatisticamente menor nos hamsters infectados com marcação grau 2+ (n=13) comparado ao grupo controle a partir dos 20 minutos (Figura 3.6). Aos 30 minutos, esse índice também foi menor nos animais com marcação grau 2+ quando comparado aos

hamsters grau 1+ ( $p<0,05$ ). Por outro lado, nas avaliações de absorção intestinal para sódio, potássio e cloreto não houve diferença estatística na comparação das médias entre os grupos com marcação grau 1+ e 2+. Ainda, os índices para absorção de glicose, sódio e potássio do grupo com marcação por IHQ grau 3+ foi numericamente menor que todos os tempos avaliados (dados não mostrados), contudo, a reduzida amostragem dessa categoria (n=2) não permitiu a avaliação estatística.

Considerando as coletas realizadas aos 30 e 40 minutos, o grupo inoculado apresentou correlação negativa, ( $p < 0,03$  e  $p < 0,04$ ), entre a quantidade de glicose coletada por minuto e a graduação estabelecida para a intensidade

de marcação por IHQ. Neste contexto, os menores índices de absorção de glicose correspondiam aos animais com maior intensidade de marcação IHQ e, por consequência, mais gravemente infectados.

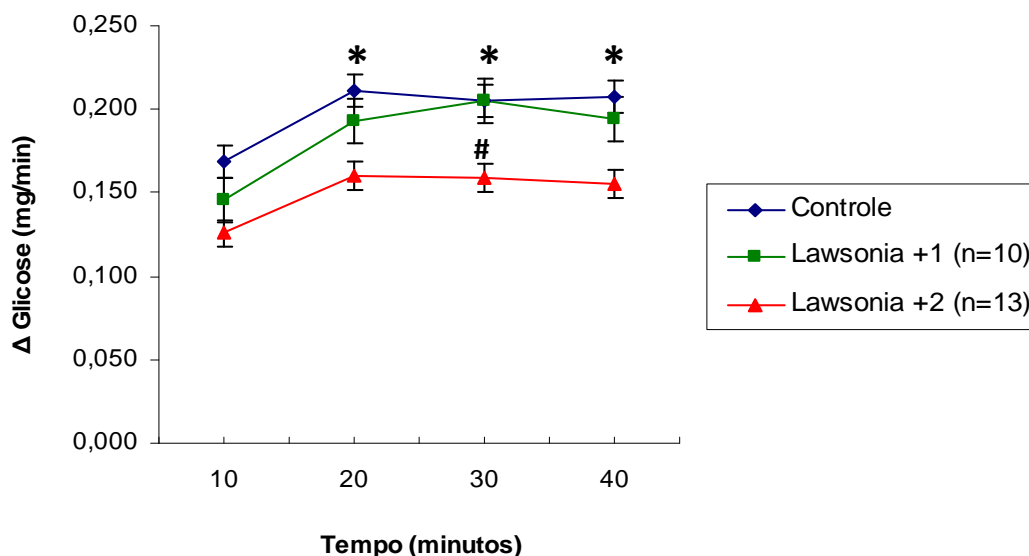


Figura 3.6 – Diferença (média  $\pm$  erro padrão) entre a quantidade de glicose (mg) por minuto infundida e coletada no intestino delgado de hamsters experimentalmente infectados com *L. intracellularis* (Grupo Lawsonia+), de acordo com a intensidade de marcação por IHQ, e inoculados com solução SPG (Grupo Controle) em diferentes tempos. Diferenças estatísticas entre o grupo de animais com marcação por IHQ grau 2+ e o grupo controle: \*  $p < 0,05$ . Diferença estatística entre os grupos com marcação grau 1+ e 2+: #  $p < 0,05$ .

Na a avaliação da absorção intestinal do íon  $\text{Na}^+$ , embora tenha ocorrido tendência a significância estatística aos 40 minutos ( $p < 0,06$ ), não houve diferença significativa quando comparado o grupo controle, os animais positivos por IHQ (grupo infectado)

e os animais com intensidades de marcação grau 1+ e 2+. A curva de absorção do grupo controle mostrou relativa similaridade com a curva de glicose. Por outro lado, os animais infectados apresentaram constante queda na concentração de  $\text{Na}^+$  durante os tempos avaliados, indicando redução contínua da absorção intestinal (Figura 3.7).

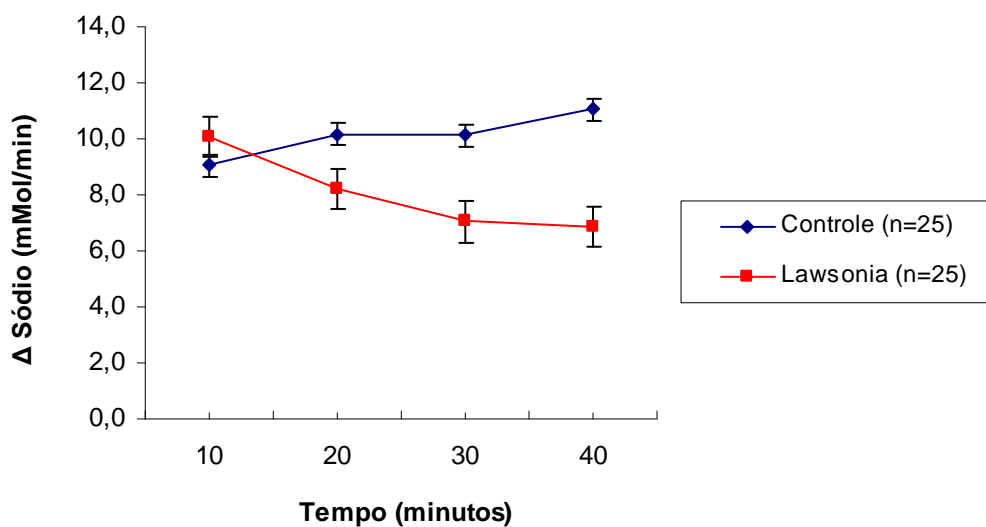


Figura 3.7 – Diferença (média  $\pm$  erro padrão) entre a quantidade de íons sódio (mMol) por minuto infundida e coletada no intestino delgado de hamsters experimentalmente infectados com *L. intracellularis* (Grupo Lawsonia+) e inoculados com solução SPG (Grupo Controle) em diferentes tempos.

A diferença entre a absorção intestinal média de  $K^+$  foi estatisticamente menor no grupo infectado aos 30 e 40 minutos em relação ao grupo controle (Figura 3.8). Os animais com marcação por IHQ grau 1+ apresentaram

menor diferença entre a quantidade de potássio infundida e coletada aos 40 minutos ( $p < 0,05$ ), enquanto no grupo com marcação grau 2+ observou-se diferença estatística a partir dos 20 minutos ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle (Figura 3.9).

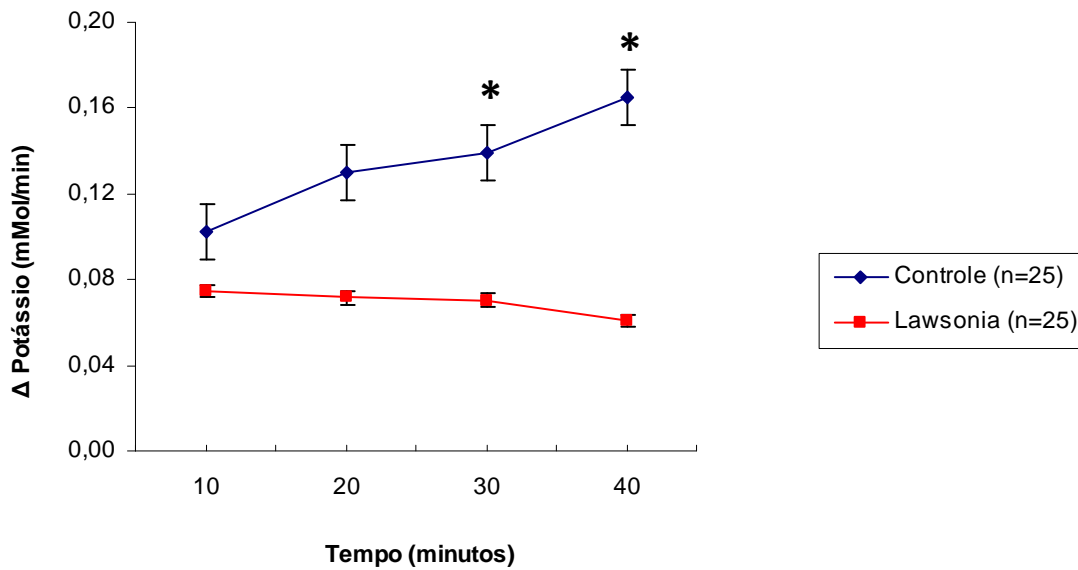


Figura 3.8 – Diferença (média  $\pm$  erro padrão) entre a quantidade de íons potássio (mMol) por minuto infundida e coletada no intestino delgado de hamsters experimentalmente infectados com *L. intracellularis* (Grupo Lawsonia+) e inoculados com solução SPG (Grupo Controle) em diferentes tempos. Diferenças estatísticas entre os grupos: \*  $p < 0,05$ .

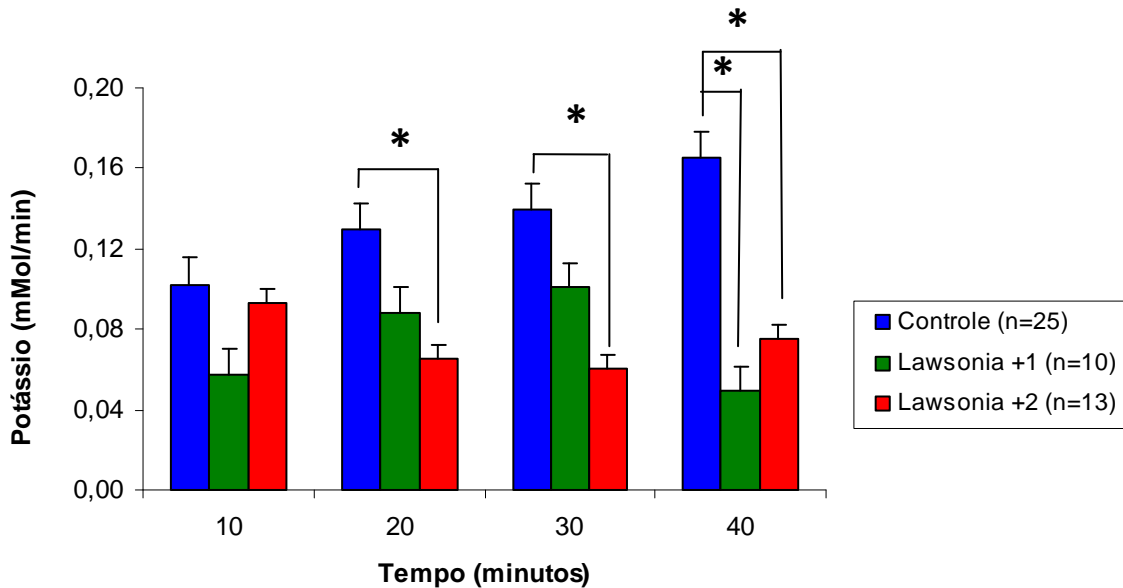


Figura 3.9 – Diferença (média  $\pm$  erro padrão) entre a quantidade de íons potássio (mMol) por minuto infundida e coletada no intestino delgado de hamsters experimentalmente infectados com *L. intracellularis* (Grupo Lawsonia+), de acordo com a intensidade de marcação por IHQ, e inoculados com solução SPG (Grupo Controle) em diferentes tempos. Diferenças estatísticas entre os grupos: \*  $p < 0,05$ .

A diferença entre a quantidade de cloreto infundida e drenada foi significativamente menor no grupo infectado aos 20 minutos de avaliação (Figura 3.10). Essa diferença aumentou significativamente dos 30 para os 40 minutos em ambos os grupos ( $p < 0,05$ ).

Na avaliação da absorção intestinal de cloreto, a comparação entre os animais controle e as diferentes categorias de intensidade de marcação por IHQ revelou diferença estatística no grupo com marcação grau 1+ aos 20 e 30 minutos. Os animais com marcação grau 2+ apresentaram menor

quantidade de cloreto ( $p < 0,05$ ) aos 20 e 40 minutos (Figura 3.11). No grupo com marcação por IHQ grau 1+ ocorreu aumento significativo entre os 30 e 40 minutos ( $p < 0,05$ ).

Nas avaliações da absorção intestinal de glicose, sódio e potássio, não foram observadas diferenças estatísticas quando comparadas as médias entre os diferentes tempos (10, 20, 30 e 40 minutos). Portanto, nessas avaliações não houve aumento ou redução significativa nos índices de absorção durante os tempos avaliados.

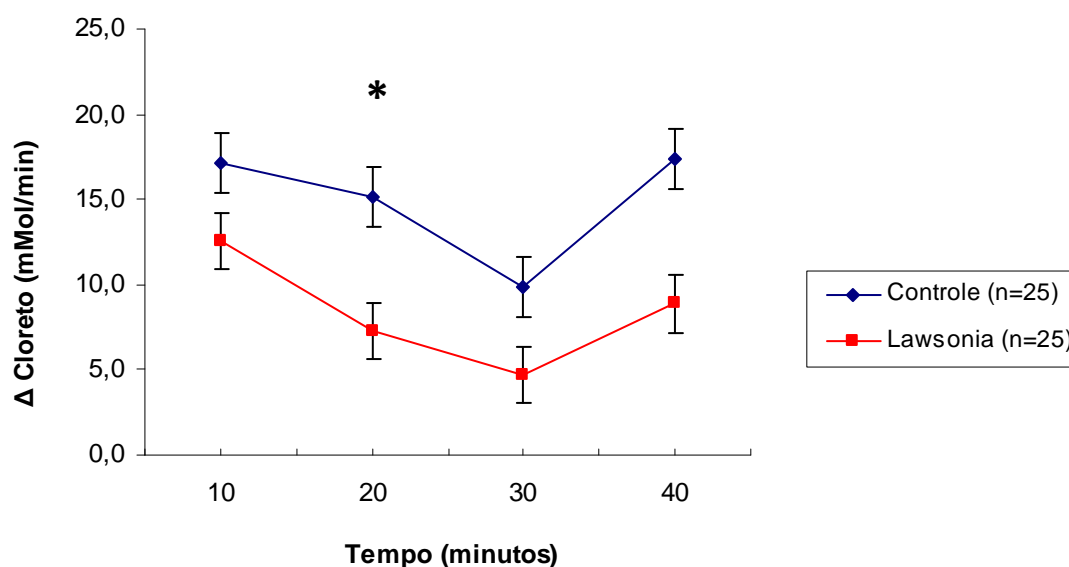


Figura 3.10 – Diferença (média  $\pm$  erro padrão) entre a quantidade de íons cloreto (mMol) por minuto infundida e coletada no intestino delgado de hamsters experimentalmente infectados com *L. intracellularis* (Grupo Lawsonia+) e inoculados com solução SPG (Grupo Controle) em diferentes tempos. Diferença estatística entre os grupos: \*  $p < 0,05$ .

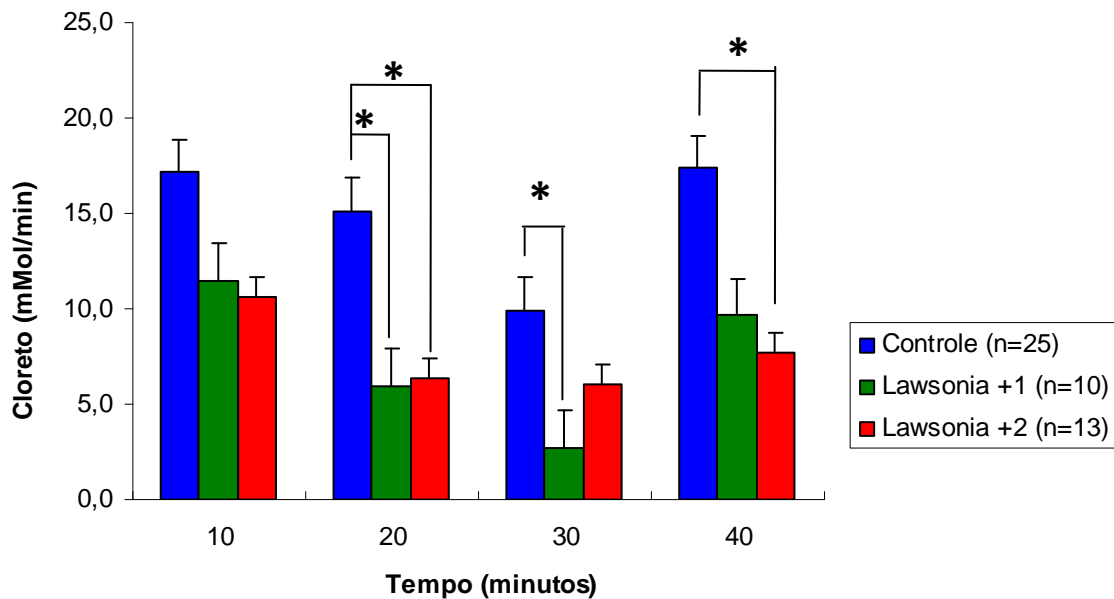


Figura 3.11 – Diferença (média  $\pm$  erro padrão) entre a quantidade de íons cloreto (mMol) por minuto infundida e coletada no intestino delgado de hamsters experimentalmente infectados com *L. intracellularis* com intensidade de marcação por IHQ grau 1+ (Grupo Lawsonia+1) e inoculados com solução SPG (Grupo Controle) em diferentes tempos. Diferenças estatísticas entre os grupos: \*  $p < 0,05$ .

### 3.3 HISTOMORFOMETRIA

Em um animal do grupo controle não houve preservação da arquitetura tecidual das criptas e vilosidades impedindo a avaliação histomorfométrica. Os três hamsters inoculados com homogeneizado e negativos por IHQ foram avaliados, mas não foram considerados na análise estatística para comparação das médias. Desta forma, os resultados compreenderam 29 hamsters controles e 27 infectados.

Não foram observadas diferenças estatísticas na comparação do grupo controle (n=25) e infectado (n=25) para altura de vilosidades, profundidade de criptas e relação vilosidade/cripta. Ainda, também não foram identificadas diferenças nas comparações entre as médias de intensidade de marcação por IHQ e o grupo controle (Figura 3.12). O

animal com marcação grau quatro apresentou aproximadamente vilosidades quatro vezes mais altas que a média dos animais do grupo controle. Ainda, as criptas desse animal mostraram-se aproximadamente duas vezes mais profundas comparadas à média dos hamsters controle. Semelhante as outras avaliações, as médias dos animais com marcação grau três (n=2) não foram consideradas na avaliação estatística.

Marcações por IHQ foram observadas nas criptas intestinais e em células presentes no terço médio e no ápice das vilosidades. Contudo, no grupo infectado (n=25) houve correlação positiva ( $p < 0,02$ ) entre a intensidade de marcação por IHQ e a profundidade das criptas. Desta forma, quanto maior a intensidade da infecção (avaliada pela intensidade de marcação por IHQ) mais profunda são as criptas intestinais dos animais infectados.

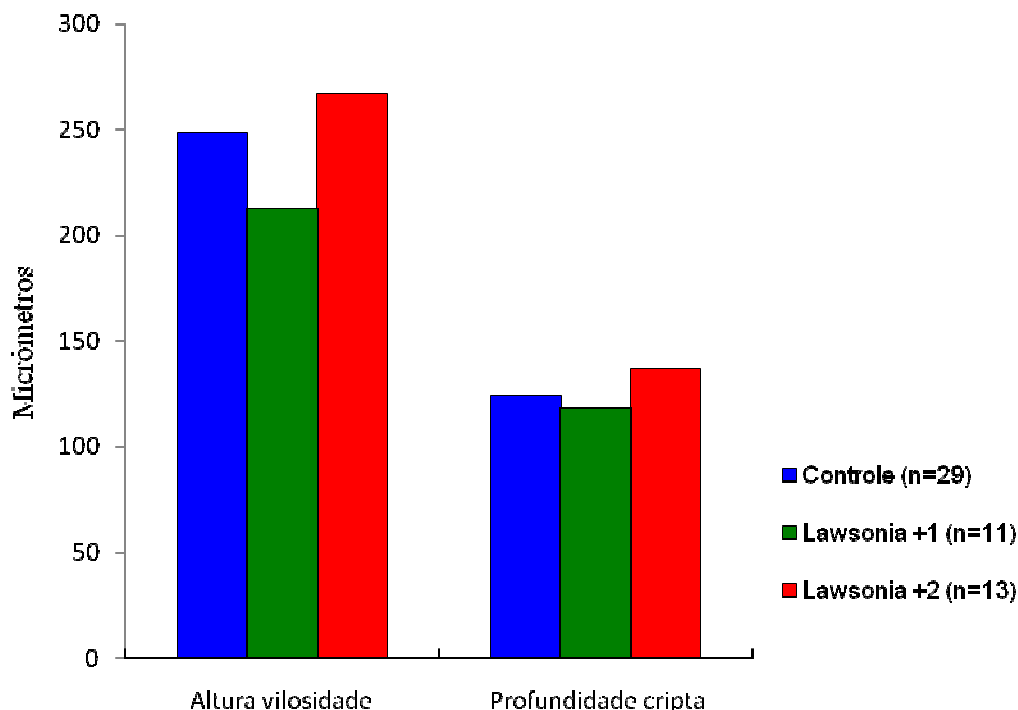


Figura 3.12 – Altura das vilosidades e profundidade das criptas em micrômetros (média  $\pm$  erro padrão) de hamsters inoculados com SPG (grupo controle) e infectados experimentalmente com homogeneizado de mucosa contendo *L. intracellularis* de acordo com intensidade de marcação por IHQ.

#### 4. DISCUSSÃO

As alterações anátomo-histopatológicas presentes nos animais infectados com homogeneizado de mucosa intestinal foram compatíveis com EP. Posteriormente, a identificação do antígeno específico da *L. intracellularis* na porção apical de enterócitos das criptas intestinais confirmou a infecção induzida pela inoculação experimental. A grande similaridade no desenvolvimento das lesões em hamsters e suínos permitiram a utilização desse modelo experimental para estudos ultra-estruturais na investigação de mecanismos envolvidos na interação da bactéria com o epitélio intestinal (Frisk e Wagner, 1977; McOrist e Lawson, 1987; McOrist et al., 1989; Jasni et al., 1994). Contudo, até o momento não havia sido demonstrado ou caracterizado possíveis distúrbios na absorção intestinal de nutrientes

e eletrólitos em animais natural ou experimentalmente infectados.

O reduzido desempenho de suínos a campo afetados com a forma crônica ou subclínica da EP foi também observado em infecções experimentais em suínos e hamsters (Jacobson et al., 2003; Yhe, 2004; França, 2007). Neste contexto, o menor ganho de peso dos animais infectados observado neste experimento, com tendência estatística aos nove dias pós-inoculação, corrobora com a literatura (Yhe, 2004). Essa queda no desempenho associa-se a infecção das células das criptas intestinais observadas a partir do quinto dia pós-inoculação com posterior substituição gradual da mucosa por células pouco diferenciadas apresentando microvilosidades curtas e irregulares (Johnson e Jacoby, 1978). A elevada presença de enterócitos imaturos no epitélio

intestinal poderia comprometer sua capacidade de absorção ou intensificar a secreção intestinal de Cl<sup>-</sup> por meio de canais iônicos presentes a membrana apical de células das criptas.

Na literatura consultada, não foram encontrados relatos de manifestação clínica típica da EP, caracterizada por quadros de diarreia, em hamsters experimentalmente infectados com homogeneizado de mucosa de suínos ou cultura pura de *L. intracellularis* isolada de suínos. Agressividade, canibalismo, diarreia profusa e desidratação foram observadas apenas em animais infectados com homogeneizados ou filtrados de mucosa intestinal extraídos de hamsters afetados com a doença (Jacoby et al., 1975; Jacoby et al., 1978). Em suínos, a reprodução da doença clínica tem sido relatada com homogeneizado e cultura pura (Winkelman et al., 2002; Guedes e Gebhart, 2003a). No presente trabalho, a preparação do inóculo a partir de homogeneizado ou cultura pura extraída de hamsters com EP poderia ter elevado a intensidade de infecção e promover a manifestação clínica da doença. Entretanto, intestinos de hamsters com lesões típicas de PE não estavam disponíveis para este estudo. Esta teórica especificidade de amostras de *L. intracellularis* poderá, num futuro próximo, ser estudada correlacionando diferentes apresentações clínicas e patológicas em diferentes espécies animais a partir de infecções cruzadas, associada a técnicas moleculares para determinação de diferenças genotípicas da *L. intracellularis*. Neste sentido, a PCR associada à identificação de VNTR presentes no genoma da bactéria tem se mostrado uma ferramenta promissora na compreensão da epidemiologia molecular da EP (Beckler et al., 2005).

As alterações macro e microscópicas típicas da EP foram descritas por outros pesquisadores que utilizaram cultura pura, homogeneizado ou filtrado de mucosa de suínos para reprodução experimental da doença em hamsters (McOrist e Lawson,

1987; Yhe, 2004; Yhe et al., 2006). Contudo, neste experimento foi possível reproduzir lesões compatíveis com enterite concomitante a hiperplasia do tecido linfóide associado ao intestino (GALT), a partir de homogeneizado de mucosa extraída de suínos com EP. Até o momento, tais lesões haviam sido descritas somente em infecções naturais ou experimentais com homogeneizado de mucosa de hamsters com EP (Jacoby et al., 1975; Amend et al., 1976; Jacoby, 1978).

Os animais infectados com intensidade de marcação, por IHQ, grau 1+ (n=11) apresentaram somente hiperplasia de criptas multifocal, com redução na altura das vilosidades. Jacoby (1978) observou maior número de células presentes nas vilosidades de hamsters experimentalmente infectados, a partir do 15º dia pós-infecção. Nesses animais, o autor relatou alongamento de vilosidade e presença de criptas mais profundas, no entanto, o referido trabalho não mensurou altura ou profundidade dessas estruturas. Embora não tenha sido observada diferença estatística na comparação das médias de profundidade de criptas neste experimento. O presente trabalho demonstrou que quanto maior a intensidade da infecção (avaliada pela intensidade de marcação por IHQ), mais profundas são as criptas intestinais dos animais infectados.

A digestão e absorção de carboidratos compreendem basicamente duas fases: luminal e epitelial. Na primeira, a  $\alpha$ -amilase, promove clivagens em sítios de ligações específicas presentes em carboidratos complexos (Traber, 1995). Embora não haja estudos que avaliem a atividade dessa enzima nas infecções por *L. intracellularis*, provavelmente, nos casos de EP não há alterações nesta fase da digestão, visto que a referida enzima é produzida na glândula parótida e no pâncreas. Desta forma, parece que a menor absorção de glicose dos animais infectados, observada neste experimento não esteja relacionada à reduzida atividade da  $\alpha$ -amilase.

Por outro lado, a fase epitelial depende estritamente da funcionalidade da mucosa intestinal. Dissacaridases, enzimas ancoradas na superfície apical de enterócitos maduros, realizam a última etapa do processo digestivo de carboidratos por meio da clivagem de dissacarídeos em monossacarídeos (Hoffman e Chang, 1991). O elevado número de células das criptas presentes no revestimento epitelial do intestino dos animais infectados associada à reduzida expressão dessas enzimas na superfície de células das criptas (Chandrasena et al., 1992) pode ter contribuído para significativa redução na absorção de glicose nos animais com intensidade de marcação por IHQ grau 2+. Apesar de não avaliarmos a absorção de peptídeos e aminoácidos, é possível que também haja comprometimento na digestão e absorção de proteínas, visto a reduzida expressão de peptidases nas células das criptas (Buddington, 1992).

Os açúcares simples são absorvidos através da mucosa intestinal especificamente por três mecanismos: transporte passivo; co-transportador  $\text{Na}^+$ /glicose (SGLT1) e difusão facilitada (específica para a absorção de frutose) (Traber, 1992). O transporte passivo de glicose ocorre pela dilatação das junções intercelulares dependente da ativação do SGLT1 (Madara e Pappenheimer, 1987). Neste contexto, o transporte de glicose acoplado ao  $\text{Na}^+$  pelo SGLT1 representa o principal mecanismo de absorção desse nutriente (Drozdowski e Thomson, 2006). O SGLT1 é expresso na membrana apical de enterócitos maduros presentes no ápice das vilosidades de coelhos e ratos (Hwang et al., 1991; Yoshida et al., 1995). Apesar da ausência de estudos sobre a localização e função do SGLT1 em hamsters, é possível que a menor absorção intestinal de glicose nos animais infectados ocorra pela reduzida expressão ou ausência de SGLT1 e dissacaridases na membrana apical de enterócitos infectados. Portanto, a presença de nutrientes não absorvidos no intestino e conseqüente direcionamento de água, por

osmose, para o lúmen intestinal pode ser um fator importante na fisiopatologia da diarreia presente na EP. A menor absorção de glicose em hamsters com marcação por IHQ grau 2+ comparado aos animais com marcação grau 1+ foi observada aos 30 minutos. Este fato demonstra a influência da intensidade da infecção na absorção intestinal de glicose e o possível envolvimento do SGLT1 e das dissacaridases da patogênese desse processo.

Por outro lado, não houve diferença estatística na comparação entre os hamsters com marcação grau 1+ e 2+ para a absorção de  $\text{Na}^+$ . A queda contínua na absorção intestinal desse íon, apresentada pelos animais infectados, difere do padrão de curva observado na absorção de glicose. Falhas na expressão do SGLT1 também comprometem a absorção de  $\text{Na}^+$  (Wright et al., 2003). Contudo, o mecanismo mais importante de absorção intestinal de  $\text{Na}^+$  ocorre por meio de trocas iônicas com íons  $\text{H}^+$  realizadas por transportadores NHE (transportador iônico de sódio/ $\text{H}^+$  - NHE2 e NHE3) (Zachos et al., 2005). O acionamento desse mecanismo ocorre simultaneamente à ativação de transportadores  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ , os quais permitem a transferência de íons  $\text{Cl}^-$  para o meio intracelular em troca de  $\text{HCO}_3^-$  para o lúmen intestinal. Portanto, como resultado desse processo dinâmico ocorre absorção de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  associada à secreção de  $\text{H}^+$  e  $\text{HCO}_3^-$  (Kaunitz et al., 1995).

Até o momento, ainda existem controvérsias com relação à localização dos transportadores NHE2 e NHE3 presentes na superfície apical dos enterócitos. Hoogerwerf et al. (1996) demonstrou a presença de ambos por todo intestino delgado a partir do ápice das vilosidades até o terço superior das criptas em humanos e coelhos. Outros pesquisadores observaram a presença do NHE2 em semelhantes proporções nas vilosidades e nas criptas e NHE3 apenas no terço apical das vilosidades em humanos e ratos (Dudeja et al., 1996; Musch et al., 2002). Em cães, o NHE3 parece ser mais importante para a

absorção de  $\text{Na}^+$  que o NHE2 (Maher et al., 1997). Não foram encontrados estudos referentes à distribuição ou atividade biológica desses transportadores em hamsters. A acentuada variação com relação à importância do NHE2 e NHE3 nas diferentes espécies impede a avaliação da influência de ambos transportadores na absorção intestinal de  $\text{Na}^+$  observada nos animais experimentalmente infectados.

A curva que representa a absorção intestinal de  $\text{K}^+$  do grupo controle e infectado assemelha-se as curvas de absorção de  $\text{Na}^+$ . A absorção de íons  $\text{K}^+$  no intestino delgado ocorre de forma passiva acompanhando as diferentes variações de concentrações de  $\text{Na}^+$  e glicose no lúmen (Field, 2003). A absorção de  $\text{K}^+$  por transporte ativo ocorre no cólon e está condicionada a ativação da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase (bomba de sódio e potássio) localizada na membrana apical de enterócitos dessa região (Kaunitz et al., 1995).

Como citado anteriormente, a absorção de  $\text{Cl}^-$  ocorre através de trocas iônicas com  $\text{HCO}_3^-$  (transportadores  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ) concomitante a ação de transportadores NHE. Portanto, nas infecções entéricas em que há comprometimento da atividade biológica dos transportadores NHE certamente existirá falhas na absorção intestinal de  $\text{Cl}^-$  (Zachos et al., 2005). Este fato pode ter contribuído para a reduzida absorção de íons  $\text{Cl}^-$  nos animais infectados.

Knickelbein et al. (1988) demonstraram a presença simultânea dos transportadores NHE e transportadores  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  somente na membrana apical de enterócitos maduros presentes nas vilosidades. Além disso, os processos secretórios do epitélio intestinal ocorrem predominantemente nas células das criptas e o  $\text{Cl}^-$  é o principal eletrólito envolvido (Welsh et al., 1982). A secreção desse íon na membrana apical ocorre pela abertura de canais iônicos: CaCC (canal de cloreto dependente de cálcio) e CFTR (regulador transmembrana da fibrose cística).

Mensageiros intracelulares AMPc (mono fosfato de adenosina cíclico) e GMPc (mono fosfato de guanosina cíclico) regulam o funcionamento do CFTR através da ativação de proteínas quinases. A ativação descontrolada dos canais iônicos CFTR tem sido descrita nas infecções por *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) e *Vibrio cholerae* (em humanos) sendo associada à produção de enterotoxinas (Peterson e Whipp, 1995). A presença dessas enterotoxinas no citoplasma dos enterócitos eleva a concentração intracelular de AMPc promovendo a ativação da PKA e posterior abertura dos canais iônicos CFTR (Peterson e Whipp, 1995). Nestes casos, ocorre diarreia secretória com acentuada perda de eletrólitos e morte por desidratação.

Até o momento, não foi demonstrada produção de enterotoxinas pela *L. intracellularis*. A reduzida absorção de  $\text{Cl}^-$  observada nos animais infectados pode ser atribuída à maior presença de células das criptas revestindo o epitélio intestinal e, por consequência, maior presença de canais iônicos de  $\text{Cl}^-$ . Contudo, é possível que haja envolvimento de outros mecanismos de absorção intestinal de  $\text{Cl}^-$ , visto que os animais com intensidade de marcação por IHQ grau 1+ não apresentaram diferença estatística quando comparados aos animais com marcação grau 2+, que teoricamente teriam maior presença de células das criptas.

Embora não tenha sido possível esclarecer mecanismos específicos envolvidos na absorção intestinal de nutrientes e eletrólitos, o presente trabalho demonstrou que, além da reduzida absorção intestinal de glicose, as infecções por *L. intracellularis* resultam em significativa perda de eletrólitos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ). Desta forma, esses fatores contribuíram para o reduzido ganho de peso dos hamsters infectados e, provavelmente, contribuem para menor desempenho de suínos acometidos com a forma clínica ou subclínica da EP.

## 5. CONCLUSÕES

A inoculação de homogeneizado de mucosa intestinal extraído de suínos infectados com *L. intracellularis* mostrou-se eficiente na reprodução experimental da EP em hamsters. A estreita relação entre a patogênese dessa enfermidade em suínos e hamsters caracteriza o último como adequado modelo experimental *in vivo* para estudos envolvendo a patogênese dessa enfermidade.

Neste contexto, a reduzida absorção intestinal de glicose e eletrólitos pode ser um dos fatores determinantes para o menor ganho de peso nos hamsters acometidos com a forma clínica ou subclínica da EP. O aprofundamento das criptas correlacionado à elevada presença de células infectadas com reduzida capacidade de absorção, pode ser responsável por esse processo patológico. Desta forma, a diarreia por má absorção parece ser o principal mecanismo envolvido na fisiopatologia da diarreia na EP.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDERTON, M.; BORLAND, R.; COLOE, P. Experimental reproduction of porcine proliferative enteritis. *J. Comp. Path.*, v.106, p.159-167, 1992.
- AL-GHAMDI, G. *Characterization of proliferative enteropathy in horses*. 2003. 157f. Thesis (PhD). College of Veterinary Medicine, University of Minnesota, Minnesota, USA.
- AMEND, N.K.; LOEFFLER, D.G.; WARD, C. et al. Transmission of enteritis in the syrian hamster. *Lab. Anim. Sci.*, v.26, p.566-572, 1976.
- ARMBRUSTER, G.A.; DEEN, J.; GEBHART, C.J. et al. Review of *Lawsonia intracellularis* seroprevalence screening in the United States, June 2003 to July 2006. In: AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE VETERINARY – ANNUAL MEETING, 38, 2007, Orlando, *Proceedings...* Florida: AASV, 2007. p.231-234.
- ATHERTON, R.P.; MCKENZIE III, H.C. Alternative antimicrobial agents in the treatment of proliferative enteropathy in horses. *J. Equine. Vet. Sci.*, v.26, p.535-541, 2006.
- BAK, H.; RATHKJEN, P.H.S. Reduced use of antimicrobials after vaccination of pigs against porcine proliferative enteropathy in a Danish SPF herd. *Acta. Vet. Scand.*, v.51, p.1-13, 2009.
- BECKLER, D.C.; WEBER, N.L.; GEBHART, C.J. Typing of *Lawsonia intracellularis* isolates by analysis of variable number tandem repeat prolif. In: AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE VETERINARY – ANNUAL MEETING, 36, 2005, Toronto, *Proceedings...* Ontario: AASV, 2005. p.205.
- BIESTER, H.E.; SCHWARTE, L.H. Intestinal adenoma in swine. *Am. J. Pathol.*, v.7, p.175-185, 1931.
- BIHR, T.P. Protein-losing enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis* in a weanling foal. *Can. Vet. J.*, v.44, p.65-66, 2003.
- BOESEN, H.T.; JENSEN, T.K.; MOLLER, K. et al. Evaluation of a novel enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of porcine proliferative enteropathy. *Vet. Microbiol.*, v.109, p.105-112, 2005.
- BOOSINGER, T.; THACKER H.; ARMSTRONG, C. *Campylobacter sputorium* subsp. *mucosalis* and *Campylobacter hyointestinalis* infections in the intestine of gnotobiotic pigs. *Am. J. Vet. Res.*, v.46, p.2152-2156, 1985.

- BORGES, E.L.; MACHADO A.D.C.V.; HAIBARA, A.S. et al. Effects of vasoactive intestinal polypeptide microinjected into the nucleus tractus solitarius on jejunal glucose absorption in rats. *Auton. Neurosci.*, v.107, p.111-113, 2003.
- BORGES, E.L.; BRAGA, A.A.; PETROIANU, A. Influence of obstructive jaundice on jejunal absorption of glucose, electrolytes and vitamin A in rats. *Dig. Dis. Sci.*, v.43, p.2196-2200, 1998.
- BOYE, M.; JENSEN, T. K.; MOLLER, K. et al. Specific detection of *Lawsonia intracellularis* in porcine proliferative enteropathy inferred from fluorescent rRNA in situ hybridization. *Vet Pathol.*, v.35, p.153-156, 1998.
- BUDDINGTON, R.K. Intestinal nutrient transport during ontogeny of vertebrates, *Am. J. Physiol.*, v.263, p.R503-R509, 1992.
- CHANDRASENA, G.; SUNITHA, I.; LAU, C. et al. Expression of sucrase-isomaltase mRNA along the villus-crypt axis in the rat small intestine. *Cell. Mol. Biol.*, v.38, p.243-254, 1992.
- CLIFFORD, D.H. Preanesthesia, anesthesia, analgesia and euthanasia. In: FOX, J.G.; COKEN, B.J.; LOEW, F.M. (Ed). *Laboratory Animal Medicine*. Florida: Academic Press, 1984, p.528-554.
- COLLINS, A.M.; DIJK, M.V.; VU, N.Q. et al. Immunity to *Lawsonia intracellularis*. In: ALLEN D. LEMAN CONFERENCE, 28, 2001, Minneapolis. *Anais...Saint Paul: Veterinary Outreach Programs/UMN* 2001. p. 115-120.
- COLLINS, A.M.; LOVE, R.J.; POZO, J. et al. Studies on the *ex vivo* survival of *Lawsonia intracellularis*. *Swine Health Prod.*, v.8, p.211-215, 2000.
- COOPER, D.M.; SWANSON, D.L.; BARNES, S.M. et al. Comparison of the 16S ribosomal DNA sequence from the intracellular agent of proliferative enteritis in a hamster, deer, and ostrich with the sequence of a porcine isolate of *Lawsonia intracellularis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.47, p.635-639, 1997a.
- COOPER, D.M.; SWANSON, D.L.; GEBHART, C.J. Diagnosis of proliferative enteritis in frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from a hamster, horse, deer, and ostrich using a *Lawsonia intracellularis*-specific multiplex PCR assay. *Vet. Microbiol.*, v.54, p.47-62, 1997b.
- DROZDOWSKI, L.A.; THOMSON, A.B.R. Intestinal sugar transport. *World J. Gastroenterol.*, v.12, p.1657-1670, 2006.
- DUDEJA, P.K.; RAO, D.D.; SYED, I. et al. Intestinal distribution of human Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoforms NHE-1, NHE-2, and NHE-3 mRNA. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, v.271, p.G483-G493, 1996.
- ELWELL, M.R.; CHAPMAN, A.L.; FRENKEL, J.K. Duodenal hyperplasia in a guinea pig. *Vet. Pathol.*, v.181, p.136-139, 1981.
- ERICKSON, K.; LANDSVERK, T.; BRATBERG, B. Morphology and immunoperoxidase studies of intestinal adenomatosis in the blue fox, *Alopex lagopus*. *J. Comp. Path.*, v.102, p.265-278, 1990.
- FACCINI, G.S.; GUEDES, R.M.C.; PESCADOR, C.A. et al. Diagnóstico histoquímico e imunoistoquímico da enteropatia proliferativa (*Lawsonia intracellularis*) em suínos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, p.569-575, 2005.
- FIELD, M. Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea. *J. Clin. Invest.*, v.111, p.931-943, 2003.

- FOX, J.G.; LAWSON, G.H.K. *Campylobacter*-like omega intracellular antigen in proliferative colitis in ferrets. *Lab. Anim. Sci.*, v.38, p.34-36, 1988.
- FRANÇA, S.A. *Aspectos epidemiológicos e terapêuticos da enteropatia proliferativa suína*. 2007. 30f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- FRANK, N; FISHMAN, C.E.; GEBHART, C.J. et al. *Lawsonia intracellularis* proliferative enteropathy in a weanling foal. *Eq. Vet. J.*, v.30, n.6, p.549-552, 1998.
- FRISK, C.S.; WAGNER, J.E. Experimental hamster enteritis: an electron microscopic study. *Am. J. Vet. Res.*, v.38, p.1861-1868, 1977.
- GEBHART, C.J.; GUEDES, R.M.C. *Lawsonia intracellularis*. In: GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F.; SONGER, J.G. et al. (Ed). *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. Oxford: Blackwell Publishing, 2004, p.363-372.
- GEBHART, C.J; KAPUR, V. Whole genome sequence of *Lawsonia intracellularis* PHE/MN1-00, 2002. Disponível em: <[http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_organism?org=lip/](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_organism?org=lip/)>. Acessado em: 30 jan. 2009.
- GEBHART, C.J. ; BARNS, S.M. ; McORIST, S. et al. *Ileal symbiont intracellularis*, an obligate bacterium of porcine intestine showing a relationship to *Desulfuvibrio* species. *Intern. J. Syst. Bact.*, v.43, p.533-538, 1993.
- GEBHART, C.J. ; McORIST, S. ; LAWSON, G.H.K. et al. Specific in situ hybridization of the intracellular organism of porcine proliferative enteropathy. *Vet. Pathol.*, v.31, p.462-467, 1994.
- GEBHART, C.J.; WARD G.E.; CHANG, K. et al. *Campylobacter hyointestinalis* (new species) isolated from swine with lesions of proliferative ileitis. *Am. J. Vet. Res.*, v.44, p.361-367, 1983.
- GUEDES, R.M.C. *Porcine proliferative enteropathy: diagnosis, immune response and pathogenesis*. 2002. 130f. Thesis (PhD). College of Veterinary Medicine, University of Minnesota, Minnesota, USA.
- GUEDES, R.M.C. Enteropatia proliferativa suína (ileíte). *Cad. Tec. Vet. Zootec.*, v.42, p.45-56, 2003.
- GUEDES, R.M.C. Update on epidemiology and diagnosis of porcine proliferative enteropathy. *J. Swine Health Prod.*, v.12, p.134-138, 2004.
- GUEDES, R.M.C. Enteropatia proliferativa. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. (Ed.) *Doenças dos suínos*. Goiânia: Cãnone Editorial, 2007, p.109-116.
- GUEDES, R.M.C.; GEBHART, C.J. Comparison of intestinal mucosal homogenate and pure culture of the homologous *Lawsonia intracellularis* isolate in reproducing proliferative enteropathy in swine. *Vet. Microbiol.*, v.93, p.159-166, 2003a.
- 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*. *Vet. Microbiol.*, v.91, p.135-145, 2003b.
- GUEDES, R.M.C.; GEBHART, C.J. Preparation and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies against *Lawsonia intracellularis*. *J. Vet. Diag. Invest.*, v.15, p.438-446, 2003c.

- GUEDES, R.M.C.; GEBHART, C.J.; WINKELMAN, N.A. et al. Comparison of different methods for diagnosis of Porcine Proliferative Enteropathy. *Can. J. Vet. Res.*, v.66, p.99-107, 2002.
- GUEDES, R.M.C.; WINKELMAN, N.L.; GEBHART, C.J. Relationship between the severity of porcine proliferative enteropathy and the infectious dose of *Lawsonia intracellularis*. *Vet. Rec.*, v.153, p.432-433, 2003.
- GUIMARÃES-LADEIRA, C.V.G. *Estudo retrospectivo imunoistoquímico e pesquisa por PCR em fezes e sorologia para Lawsonia intracellularis em equinos no Estado de Minas Gerais-Brasil*. 2007. 20f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- GURMINI, J.; CECÍLIO, W.A.C.; SCHULER, S.L. et al. Desnutrição intra-uterina e suas alterações no intestino delgado de ratos Wistar ao nascimento e após a lactação. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, v.41, p.271-278, 2005.
- HERBST, W.; HERTRAMPF, B.; SCHMITT, T. et al. Diagnosis of *Lawsonia intracellularis* using the polymerase chain reaction (PCR) in pigs with and without diarrhea and other animal species. *Dtsch. Tierarzti. Wochenschr.*, v.110, p.361-364, 2003.
- HOFFMAN, L.R.; CHANG, E.B. Determinants of regional sucrase-isomaltase expression in adult rat small intestine. *J. Biol. Chem.*, v.266, p.21815-21820, 1991.
- HOOGERWERF, W.A.; TSAO S.C.; DEVUYST, O, et al. NHE2 and NHE3 are human and rabbit intestinal brush-border proteins. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, v.270, p.G29-G41, 1996.
- HOTCHKISS, C.H.E.; SHAMES, B.; PERKINS, S.E. et al. Proliferative enteropathy of rabbits: The intracellular *Campylobacter*-like organism is closely related to *Lawsonia intracellularis*. *Lab. Anim. Sci.*, v.46, p.623-627, 1996.
- HWANG, E.; HIRAYAMA, B.A.; WRIGHT, E.M. Distribution of the SGLT1 Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter and mRNA along the crypt-villus axis of rabbit small intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.181, p.1208-1217, 1991.
- JACOBSON, M.; SEGERTAD, C.H.; GUNNASRSSON, A. et al. Diarrhoea in the growing pig – a comparison of clinical, morphological and microbial findings between animals from good and poor performance herds. *Res. Vet. Sci.*, v.74, p.163-169, 2003.
- JACOBY, R.O.; OSBALDISTON, G. W.; JONAS, A.M. Experimental transmission of atypical ileal hyperplasia of hamsters. *Lab. Anim. Sci.*, v.25, p.465-473, 1975.
- JACOBY, R.O. Transmissible ileal hyperplasia of hamsters. *Am. J. Pathol.*, v.91, p.433-444, 1978.
- JASNI, S.; McORIST, S.; LAWSON, G.H.K. Experimental induced proliferative enteritis in hamsters: an ultra-structural study. *Rec. Vet. Sci.*, v.56, p.186-192, 1994.
- JENSEN, T.K.; MOLLER, K.; SESER, T.D. et al. Comparison of histology, immunohistochemistry and polymerase chain reaction for detection of *Lawsonia intracellularis* in natural porcine proliferative enteropathy. *Eur. J. Vet. Pathol.*, v.3, p.115-123, 1997.
- JOHNSON, E.A.; JACOBY, R.O. Transmissible ileal hyperplasia of hamster. *Am J. Pathol.*, v.91, p.451-459, 1978.

- JONAS, A.M.; TOMITA, Y.; WYAND, D.S. Enzootic intestinal adenocarcinoma in hamsters. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.147, p.1102-1108, 1965.
- JONES, G.F.; WARD, G.E.; MURTAUGH, G. et al. Enhanced detection of intracellular organism of swine proliferative enteritis, *Ileal symbiont intracellularis*, in feces by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, v.31, p.2611-2615, 1993.
- JORDAN, D.J.; KNITTEL, J.P.; ROOF, M.B. et al. *Lawsonia intracellularis* transmission study using a pure culture inoculated seeder-pig sentinel model. *Vet. Microbiol.*, v.104, p.83-90, 2004.
- KAUNITZ, J.D.; BARRETT, K.E.; McROBERTS, J.A. Electrolyte secretion and absorption: small intestine and colon. In: YAMADA, T. (Ed.) *Textbook of Gastroenterology*. Philadelphia: J B Lippincott Company, 1995, p.326-346.
- KLEIN, E.C.; GEBHART, C.J.; DUHAMEL, G.E. Fatal outbreaks of proliferative enteritis caused by *Lawsonia intracellularis* in young colony-raised rhesus macaques. *J. Med. Primatol.*, v.28, p.11-18, 1999.
- KNICKELBEIN, R.G.; ARONSON, P.S.; DOBBINS, J.W. Membrane distribution of sodium-hydrogen and chloride-bicarbonate exchangers in crypt and villus cell membranes from rabbit ileum. *J. Clin. Invest.*, v.82, p.2158-2163, 1988.
- KROLL, J.J.; ROOF, M.B.; HOFFMAN, L.J. et al. Proliferative enteropathy: a global enteric disease of pigs caused by *Lawsonia intracellularis*. *Anim. H. Res. Rev.*, v.6, p.173-197, 2005.
- LAWSON, G.H.K.; McORIST, S.; JASNI, S. et al. Intracellular bacteria of porcine proliferative enteropathy: cultivation and maintenance *in vitro*. *J. Clin. Microbiol.*, v.31, p.1136-1142, 1993.
- LAWSON, G.H.K.; MACKIE, R.A.; SMITH, D.G.E. et al. Infection of cultured rat enterocytes by ileal symbiont intracellularis depends on host-cell function and actin polymerization. *Vet. Microbiol.*, v.45, p.339-350, 1995.
- LAWSON, G.H.K.; GEBHART, C.J. Proliferative enteropathy: review. *J. Comp. Path.*, v.122, p.77-100, 2000.
- LAWSON, G.H.K.; McORIST, S. The enigma of the proliferative enteropathies: a review. *J. Comp. Path.*, v.108, p.41-46, 1993.
- LEBLANC, B.; FOX, J. G.; LE NET, J. L. et al. Hyperplastic gastritis with intraepithelial *Campylobacter*-like organism in a beagle dog. *Vet. Pathol.*, v.30, p.391-194, 1993.
- LEE, S.W.; KIM, T.J.; PARK, S.Y. et al. Prevalence of porcine proliferative enteropathy and its control with tilosin in Korea. *J. Vet. Sci.*, v.2, p.209-212, 2001.
- LOMAX, L.G.; GLOCK, R.D. Naturally occurring porcine proliferative enteritis: pathologic and bacteriologic findings. *Am. J. Vet. Res.*, v.43, p.1608-1621, 1982.
- LOTT J.A.; TURNER, K. Evaluation of Trinder's glucose oxidase method for measuring glucose in serum and urine. *Clin. Chem.*, v.21, p.1754-1760, 1975.
- LOVE, R.J.; LOVE, D.N.; EDWARDS, M. J. Proliferative haemorrhagic enteropathy in pigs. *Vet. Rec.*, v.100, p.65-68, 1977.
- LUNA, L.G. (Ed). *Manual of Histologic Staining Methods of The Armed Forces Institute of Pathology*. New York: McGraw-Hill Book Co, 1968.

- MACHADO, A.D.C.V.; HAIBARA, S.A.; PETROIANU, A. et al. Effects of vasoactive intestinal polypeptide microinjected into the nucleus tractus solitarius on jejunal electrolytes absorption in rats. *Neuropeptides*, v.39, p.15-19, 2005.
- MACHUCA, M. A.; QUIROGA, M. A.; RIGANTI, J. et al. Porcine proliferative enteropathy: immune labeling of proliferation cell nuclear antigen (PCNA) and apoptosis. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 9, 1999, Escola de Veterinária-UFMG, *Anais...*Belo Horizonte: FEP-MVZ/UFMG Editora. 1999, p.11.
- MADARA, J.L.; PAPPENHEIMER, J.R. Structural basis for physiological regulation of paracellular pathways in intestinal epithelia. *J. Memb. Biol.*, v.100, p.149-164, 1987.
- MAHER, M.M.; GONTAREK, J.D.; BESS, R.S. et al. The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange isoform NHE3 regulates basal canine ileal Na<sup>+</sup> absorption *in vivo*. *Gastroenterol.*, v.112, p.174-183, 1997.
- MAPOTHER, M.E.; JOENS, L.A.; GLOCK, R.D. Experimental reproduction of porcine proliferative enteritis. *Vet. Rec.*, v.121, p.553-536, 1987.
- McCARTNEY, E.; LAWSON, G. H. K.; ROWLAND, A. Behaviour of *Campylobacter sputorium* sub-specie *mucosalis* in gnotobiotic pigs. *Res. Vet. Sci.*, v.36, p.290-297, 1984.
- McCLUSKEY, J.; HANNIGAN, J.; HARRIS, J.D. et al. LsaA, an antigen involved in cell attachment and invasion, is expressed by *Lawsonia intracellularis* during infection *in vitro* and *in vivo*. *Infect. Immun.*, v.70, p.2899-2907, 2002.
- McORIST, S.; GEBHART, C.J. Porcine proliferative enteropathies. In: STRAW, B.E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W.L. et al. (Ed.) *Diseases of swine*. Ames: Iowa State University Press, 1999, p.521-534.
- McORIST, S.; LAWSON, G. H. K. Proliferative enteropathies: *Campylobacter* species in the faeces of normal and contact pigs. *Vet. Rec.*, v.124, p.40, 1989.
- McORIST, S.; LAWSON, G.H.K. Possible relationship of proliferative enteritis in pigs and hamsters. *Vet. Microbiol.*, v.15, p.293-302, 1987.
- McORIST, S.; BOID, R.; LAWSON, G.H.K. et al. Monoclonal antibodies to intracellular *Campylobacter*-like organisms of the porcine proliferative enteropathies. *Vet. Rec.*, v.121, p.421-422, 1987.
- McORIST, S.; GEBHART, C.J.; BOSWORTH, B.T. Evaluation of porcine ileum models of enterocyte infection by *Lawsonia intracellularis*. *Can. J. Vet. Res.*, v.70, p.155-159, 2006.
- McORIST, S.; JASNI, S.; MACKIE, R. A. et al. Reproduction of porcine proliferative enteropathy with pure culture of *Ileal symbiont intracellularis*. *Infect. Immun.*, v.61, p.4286-4292, 1993.
- McORIST, S.; GEBHART, C.J.; BOID, R. et al. Characterization of *Lawsonia intracellularis* gen. nov, sp nov, the obligately intracellular bacterium of porcine proliferative enteropathy. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.45, p.520-525, 1995a.
- McORIST, S.; JASNI, S.; MACKIE, R. A. et al. Entry of the bacterium ileal symbiont intracellularis into cultured enterocytes and subsequent release. *Res. Vet. Sci.*, v.59, p.255-260, 1995b.
- McORIST, S.; LAWSON, G.H.K.; ROWLAND, A.C. et al. Early lesions of proliferative enteritis in pigs and hamsters. *Vet. Pathol.*, v.26, p.260-264, 1989.

- McORIST, S.; MACKIE, R.A.M.; AITKEN, I. et al. Synergism of *ileal symbiont intracellularis* and gut bacteria in the reproduction of porcine proliferative enteropathy. *Vet. Rec.*, v.134, p.331-332, 1994.
- McORIST, S.; MACKIE, R.A.; LAWSON, G.H.K. et al. In vitro interactions of *Lawsonia intracellularis* with cultured enterocytes. *Vet. Microbiol.* v.54, p.385-392, 1997.
- McORIST, S.; ROBERTS, L.; JASNI, S. et al. Developed and resolving lesions in porcine proliferative enteropathy: possible pathogenic mechanisms. *J. Comp. Path.*, v.115, p.35-45, 1996.
- MICHALSKI, C.W.; MOLA, F.F.; KUMMEL, K. et al. Human inflammatory bowel disease does not associate with *Lawsonia intracellularis* infection. *BMC Microbiol.*, v.6, p.1-7, 2006.
- MOESER, A.M.; BLIKSLAGER, A.T. Mechanisms of porcine diarrhea. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.231, p.56-67, 2007.
- MOLBAK, L.; JOHNSEN, K.; BOYE, M. et al. The microbiota of pigs influenced by diet texture and severity of *Lawsonia intracellularis* infection. *Vet. Microbiol.*, v.128, p.96-107, 2008.
- MORÉS, N; NOGUEIRA, R.H.G.; NEVES, O.S. et al. Diagnóstico clínico e anatomohistopatológico de casos espontâneos de enterite proliferativa hemorrágica dos suínos (EPH). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.37, p.29-37, 1985.
- MURAKATA, K.; SATO, A.; YOSHIYA, M. et al. Infection of different strains of mice with *Lawsonia intracellularis* derived from rabbit or porcine proliferative enteropathy. *J. Comp. Path.*, v.139, p.8-15, 2008.
- MUSCH, M.W.; BOOKSTEIN, C.; ROCHA, F. et al. Region specific adaptation of apical Na/H exchangers after extensive proximal small bowel resection. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, v.283, p.G975-G985, 2002.
- NATHUES, H.; OLIVEIRA, C.J.; WURM, M. et al. Simultaneous detection of *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* and *Lawsonia intracellularis* in porcine faeces and tissue samples by multiplex-PCR. *J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.*, v.54, p.532-538, 2007.
- PERCY, D.H.; BARTHOLD, S.W. Hamster. In: PERCY, D.H.; BARTHOLD, S.W. (Ed.) *Pathology of laboratory rodents & rabbit*. Ames: Iowa State University Press, 2001, p.179-180.
- PEREIRA, A.M. Principais doenças de camundongos, ratos e hamsters. In: ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, S.R. (Ed.) *Animais de laboratório: Criação e Experimentação*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2006, p.129.
- PETERSON, J.W.; WHIPP, S.C. Comparison of the mechanisms of action of cholera toxin and the heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, v.63, p.1452-1461, 1995.
- PUSTERLA, N.; MAPES, S.; REJMANEK, D. et al. Detection of *Lawsonia intracellularis* by real-time PCR in the feces of free living animal from equine farms with documented occurrence of equine proliferative enteropathy. *J. Wild. Dis.*, v.44, p.992-998, 2008.
- REGINA, M.; FALES, W.H.; WAGNER, J.E. Effects of antibiotic treatment on the occurrence experimentally induced proliferative ileitis of hamsters. *Lab. Anim. Sci.*, v.30, p.38-41, 1980.

- RISTOW, L.E.; ZICA, K.G.B.; BOTELHO, R.G.A et al. Evaluation of indirect immunofluorescent test and frequency of antibody detection for *Lawsonia intracellularis* against this bacterium in the state of Minas Gerais. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 16, 2000, Melbourne, *Proceedings...*Melbourne: IPVS, 2000, p.78.
- ROBERTS, L.; ROWLAND, A.C.; LAWSON, G.H.K. Experimental reproduction of porcine intestinal adenomatosis and necrotic enteritis. *Vet. Rec.*, v.100, p.12-13, 1977.
- ROWLAND, A.C.; LAWSON, G.H.K. Intestinal adenomatosis in the pig: immunofluorescent and electron microscopic studies. *Res. Vet. Sci.*, v.17, p.323-330, 1974.
- ROWLAND, A.C.; LAWSON, G.H.K.; MAXWELL, A. Intestinal adenomatosis in the pig: occurrence of a bacterium in affected cells. *Nature*, v.247, p.417, 1973.
- SCHWARTZ, K.; KNITTEL, J; WALTER, D. et al. Effect of oral tiamulina on the development of porcine proliferative enteropathy in a pure-culture challenge model. *Swine Health Prod.*, v.7, p.5-11, 1999.
- SMITH, D.G.E.; MITCHELL, S.C.; NASH, T. et al. Gamma interferon influences intestinal epithelial hyperplasia caused by *Lawsonia intracellularis* infection in mice. *Infect. Immun.*, v.68, p.6737-6743, 2000.
- SMITH, D.G.E.; LAWSON, G.H.K. *Lawsonia intracellularis*: getting inside the pathogenesis of proliferative enteropathy. *Vet. Microbiol.* v.82, p.331-345, 2001.
- SMITH, S.H.; McORIST, S. Development of persistent intestinal infection and excretion of *Lawsonia intracellularis* by piglets. *Res. Vet. Sci.*, v.62, p.6-10, 1997.
- STILLS, H.F. Isolation of an intracellular bacterium from hamsters (*Mesocricetus auratus*) with proliferative ileitis and reproduction of the disease with a pure culture. *Infect. Immun.*, v.59, p.3227-3236, 1991.
- TRABER, P.G. Carbohydrate Assimilation. In: YAMADA, T. (Ed.) *Textbook of Gastroenterology*. Philadelphia: J B Lippincott Company, 1995, p.410.
- TURNBERG, L.A. Potassium transport in the human small bowel. *Gut*, v.12, p.811-818, 1971.
- VAN HOOSIER JR., G.L.; LADIGES, W.C. Biology and diseases of hamsters. In: FOX, J.G.; COKEN, B.J.; LOEW, F.M. (Ed.) *Laboratory Animal Medicine*. Florida: Academic Press, 1984, p.124-132.
- VANDENBERGHE, J.; VERHEYEN, A.; LAUWERS, S. et al. Spontaneous adenocarcinoma of the ascending colon in Wister rats: the intracytoplasmic presence of a *Campylobacter*-like bacterium. *J. Comp. Path.*, v.95, p.45-55, 1985.
- WALTER, D.; KNITTEL, J.; SCHWARTZ, K. et al. Treatment and control of porcine proliferative enteropathy using different tiamulin delivery methods. *J. Swine Health Prod.*, v.9, p.109-115, 2001.
- WARD, G.E.; WINKELMAN, N.L. Recognizing the three forms of proliferative enteritis in swine. *Vet. Med.*, v.85, p.197-203, 1990.
- WEBER, N.L.; BECKLER, D.C.; KAPUR, V. et al. Variable number tandem repeat analysis for the differentiation of *Lawsonia intracellularis* from various animal species. 2004. St. Paul: University of Minnesota.

WELSH, M.J.; SMITH, P.L.; FROMM, M. et al. Crypts are the site of intestinal fluid and electrolyte secretion. *Science*, v.218, p.1219-1221, 1982.

WINKELMAN, N.L.; CRANE, J.P.; ELFRING, G.D. Lincomycin-medicated feed for the control of porcine proliferative enteropathy (ileitis) in swine. *J. Swine Health Prod.*, v.10, p.107-111, 2002.

WINKELMAN, N.L.; DEE, S.D. Ileitis: an update. *Comp. Cont. Educ.*, v.19, p.519-525, 1996.

WRIGHT, E.M.; MARTIN, M.G.; TURK, E. Intestinal absorption in health and disease-sugars. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, v.17, p.943-956, 2003.

YHE, J.Y. *In vitro* cultivation and identification of *Lawsonia intracellularis* isolated in Korea. 2004. 30f. Thesis (Master). Graduate School of Konkuk University, Seoul, Korea.

YHE, J.Y.; KIM, T.J.; PARK, S.Y. et al. Isolation of *Lawsonia intracellularis* in Korea and reproduction of proliferative enteropathy in pigs and hamsters. *J. Vet. Med. Sci.*, v.68, p.499-501, 2006.

YOSHIDA, A.; TAKATA K.; KASAHARA, T. et al. Immunohistochemical localization of Na(+)-dependent glucose transporter in the rat digestive tract. *Histochem. J.*, v.27, p.420-426, 1995.

ZACHOS, N.C.; TSE, M.; DONOWITZ, M. Molecular physiology of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> exchange. *Ann. Rev. Physiol.*, v.67, p.411-443, 2005.

ZLOTOWSKI, P.; CORRÊA, A.M.R.; BORBA, M.R. et al. Enteritis associated with *Lawsonia intracellularis* and porcine circovirus type 2 infection in wild boars in Southern Brazil. *Cienc. Rural.*, v.38, p.2540-2544, 2008.