

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

LILLIAN KARLA SILVA

AVALIAÇÃO DA MORFOMETRIA E APOPTOSE EM CÉLULAS VERO INFECTADAS
COM *Erysipelotrix* sp. strain 2 ISOLADOS DE PERUS

UBERLÂNDIA

2019

LILLIAN KARLA SILVA

AVALIAÇÃO DA MORFOMETRIA E APOPTOSE EM CÉLULAS VERO INFECTADAS
COM *Erysipelotrix* sp. strain 2 ISOLADOS DE PERUS

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do título de Médica Veterinária.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Belchiolina Beatriz Fonseca

Coorientadora: M^ª. Thais Fernanda Martins dos Reis

UBERLÂNDIA

2019

AVALIAÇÃO DA MORFOMETRIA E APOPTOSE EM CELULAS VERO
INFECTADAS COM *Erysipelotrix* sp. strain 2 ISOLADOS DE PERUS

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção de título de Médica Veterinária, pela banca examinadora formada por:

Uberlândia, 03 de julho de 2019.

Prof^a. Dr^a. Belchiolina Beatriz Fonseca
Universidade Federal de Uberlândia

Prof. Dr. Marcio de Barros Bandarra
Universidade Federal de Uberlândia

Profa. Dra. Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi
Universidade Federal de Uberlândia

UBERLÂNDIA

2019

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, pelo Dom da vida. A minha mãe, Idelma, que se faz presente em todos os momentos, não mede esforços para me ajudar, me fortalece e me inspira a ser mais forte. Palavras não descrevem tamanha gratidão.

Também agradeço a minha orientadora Bia, pela oportunidade de realizar o presente trabalho, por ter despertado em mim o gosto pela avicultura e pelos ensinamentos que vão além da vida acadêmica e profissional. Ao Grupo de Estudo em Ciências Avícolas GECA, pelo compartilhamento de informações e por agregar bons frutos ao meu conhecimento. A minha coorientadora e amiga Thais, que me auxiliou em todo processo de execução desse trabalho, sempre com paciência e carinho, serei eternamente grata pelo tempo que convivemos e tudo que eu tive a oportunidade de aprender com você.

Agradeço a equipe do laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada- LABIO, por estarem sempre dispostos a ajudar, em especial ao Phelipe Peres, o “Baner” que leva alegria por onde passa e deixa o clima mais leve e descontraído. Ao Prof. Marcelo Emílio Beletti, pelos ensinamentos e ajuda com o programa que utilizamos para fazer as medições. A Prof^a. Bruna do laboratório de Biomarcadores Tumoriais e Osteoimunologia- ICBIM, por toda ajuda prestada e por nos salvar sempre que precisamos de materiais com urgência.

Agradeço com um carinho especial o meu namorado Yudi, por toda paciência e compreensão, pela disposição em ajudar independentemente do horário, e por me mostrar na prática o verdadeiro significado de companheirismo e amor. Com você por perto tudo fica mais fácil.

Aos meus amigos, que estão sempre presente em momentos bons e ruins, em especial a Fran e ao Igor, que são minha “dupla de três” por tudo que contribuíram para meu crescimento, e pelas longas histórias que vivemos durante a graduação. Ao Lio e ao Lucas, que não pestanejaram em me ajudar em momentos de desespero, sou grata por ter uma convivência tão legal com vocês.

Ao meu irmão Juninho e a minha avó Eurides, pois em todos os momentos em que eu penso em desistir, eu me lembro que vocês jamais desistiriam de mim.

Agradeço a todos que tiveram contribuição direta ou indireta na realização desse projeto, sem vocês isso não seria possível.

Resumo

As bactérias pertencentes ao gênero *Erysipelothrix* têm formato de bastonetes gram-positivos e são seis espécies descritas: *E. rhusiopathiae*, *E. tonsillarum*, *E. inopinata*, *Erysipelothrix* sp. strain 1, *E. larvae* sp. Nov. e *Erysipelothrix* sp. strain 2. Essa última era anteriormente classificada como sorotipo 18 da espécie *E. rhusiopathiae*. Esse trabalho teve como objetivo avaliar as alterações morfométricas e apoptóticas de células VERO inoculadas com quantidades variadas de *Erysipelothrix* sp. strain 2 isoladas de perus comerciais durante um surto. Para observar a capacidade de causar alterações celulares, foram inoculadas duas amostras de isolados de *Erysipelothrix* sp. strain 2, denominadas Est06 e Est07, em diferentes concentrações em culturas de células VERO, e avaliadas em intervalos de tempo de 4 e 24 horas pós infecção. Por avaliação da microscopia ótica e fluorescência foram avaliadas a morfometria celular e a apoptose. Pela análise morfométrica todos os parâmetros medidos (área do núcleo, perímetro do núcleo, área do nucléolo e perímetro do nucléolo) apresentaram aumento significativo. Em relação a apoptose celular uma maior percentagem de células marcadas com Yo Pro (YP) nos grupos tratados Est06 e Est07 do que naqueles tratados com *Lactobacillus* spp ou sem qualquer tratamento o que indica aumento da apoptose. O grupo Est07 4h apresentou maior porcentagem de células marcadas com YP que os demais grupos. Células tratadas com Est06 e Est07 também tiveram números maiores de células marcadas com iodeto de propideo (IP) que marca células em necrose. Apoptose pode ser uma ferramenta para evasão do sistema imune caracterizando o caráter agudo e septicêmico da doença

Palavras-chave: Erisipela, perus, necrose, septicemia.

Abstract

The bacteria belonging to the genus *Erysipelothrix* are gram-positive rods and are six species described: *E. rhusiopathiae*, *E. tonsillarum*, *E. inopinata*, *Erysipelothrix* sp. strain 1, *E. larvae* sp. Nov. and *Erysipelothrix* sp. strain 2. *Erysipelothrix* sp. strain 2 was previously classified as serotype 18 of the species *E. rhusiopathiae*. This work aimed to evaluate the morphometric and apoptotic alterations of VERO cells inoculated with various load of *Erysipelothrix* sp. strain 2 isolates of commercial turkeys during an outbreak. To observe the ability to cause cellular changes, two samples of *Erysipelothrix* sp. strain 2, designated Est06 and Est07, at different concentrations in VERO cell cultures, and evaluated at time intervals of 4 and 24 hours post infection. Optical and fluorescence microscopy evaluated cell morphometry and apoptosis respectively. By the morphometric analysis all the measured parameters (area of nucleus, perimeter of nucleus, area of nucleolus and perimeter of nucleolus) showed a significant increase. In relation to cellular apoptosis, a higher percentage of cells labeled with Yo Pro (YP) in the treated groups Est06 and Est07 than in those treated with *Lactobacillus* spp or without any treatment indicating increased apoptosis. The Est07 group 4h had a higher percentage of YP-labeled cells than the other groups. Cells treated with Est06 and Est07 also had larger numbers of cells marked with propidium iodide (PI) that marked cells in necrosis. Apoptosis can be a tool to evade the immune system by characterizing the acute and septicemic nature of the disease.

Keywords: Erisipelas, turkeys, necrosis, sepsis.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	7
1. INTRODUÇÃO	9
1.1. Objetivos gerais.....	10
1.2. Objetivos específicos.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1. Identificação do agente.....	11
2.2 Aspectos econômicos.....	11
2.3. Importância na Saúde Pública	12
2.4. Hospedeiros	12
2.5. Mortalidade e morbidade	12
2.6. Aspectos epidemiológicos.....	12
2.7. Sinais clínicos.....	13
2.8. Achados de Necropsia	13
2.9. Diagnósticos	14
2.10. Tratamento.....	14
2.11. Estratégias de prevenção	15
2.12. Apoptose	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	17
6. CONCLUSÃO	23
REFERÊNCIAS.....	24
MENZIES, B., and Kourteva, I.(2000). Staphylococcus aureus $\hat{\pm}$ -toxin induces apoptosis in endothelial cells. Fems Immunology & Medical Microbiology.29, 39-45. doi:10.1111/j.1574-695x.2000.tb01503.x	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Células Vero coradas com panótico.....	21
Figura 2: Percentagem de células marcadas com YP e IP 4 e 24 horas pós infecção.....	23
Figura 3: Imagem por fluorescência de células Vero marcadas com YP, PI e hoechst.....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Morfometria de células Vero 4 horas pós infecção com Est06 em diferentes concentrações.....	18
Tabela 2: Morfometria de células Vero 24 horas pós infecção com Est06 em diferentes concentrações.....	19
Tabela 3: Morfometria de células Vero 4 horas pós infecção com Est07 em diferentes concentrações.....	19
Tabela 4: Morfometria de células Vero 24 horas pós infecção com Est07 em diferentes concentrações.....	20

1. INTRODUÇÃO

A Erisipela é uma doença cosmopolita e reemergente que acomete animais domésticos e selvagens, inclusive humanos (KANG et al., 2017). *Erysipelothrix rhusiopathiae*, é principal agente causador da doença e provoca perdas econômicas na produção de suínos e aves (BROOKE; RILEY, 1999). Na suinocultura, a erisipela é capaz de gerar intensas perdas econômicas devido às lesões agudas e crônicas em suínos com potencial para provocar grandes surtos (OPRIESSNIG et al., 2012). Na última década, a incidência desta patologia tem aumentado consideravelmente no Japão, China e Estados Unidos (BENDER et al., 2011; TO et al., 2012).

Quando associada aos perus, a Erisipela causa uma infecção aguda e fulminante, septicemia, com a diminuição do rendimento e condenação de carcaça, mortalidade em surtos e algumas aves também apresentam marcha instável (BRICKER; SAIF, 2013). Lesões cutâneas podem ser evidenciadas, emagrecimento gradual e sinais de anemia e, em alguns casos, endocardite e morte. Pode ocorrer também perda de fertilidade nos machos, desclassificação e condenação de carcaça resultante das alterações provocadas pela septicemia (BRICKER; SAIF, 2013).

O agente causador da erisipela em perus é uma bactéria do gênero *Erysipelothrix* que possui formato de bastonete e é gram-positivo (BROOKE; RILEY, 1999) integrante do filo Firmicutes, da classe Erysipelotrichia (VERBARG et al., 2014). Deste gênero são descritas seis espécies *E. rhusiopathiae*, *E. tonsillarum*, *E. inopinata*, *Erysipelothrix* sp. strain 1 e *Erysipelothrix* sp. strain 2 (TAKAHASHI et al., 1992; VERBARG et al., 2004) e também a *E. larvae* sp. nov. a última espécie identificada (BANG et al., 2016). *Erysipelothrix* sp. strain 2 anteriormente era classificada como sorotipo 18 da espécie *E. rhusiopathiae*. e apresenta escassas descrições.

Casos de erisipela em aves são considerados reemergentes na Europa (JANBEN et al., 2015). Os surtos de erisipela em perus descritos atualmente estão relacionados à espécie *E. rhusiopathiae*, e há um conhecimento ainda limitado em relação a doença causada por *Erysipelothrix* sp. strain 2 em escala produtiva.

Em relação a fatores comerciais a produção de carne de peru no Brasil é de grande importância no mercado internacional. Com uma produção de 390,48 mil toneladas no ano de 2017, um volume maior em relação ao ano anterior. Cerca de 28% da produção é destinada ao mercado externo considerando que o restante da produção é consumida no país na forma de embutidos. O estado de Minas Gerais é inserido no ranking nacional como o quarto maior

estado exportador, seguido de forma crescente pelo Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina (ABPA, 2018).

Em 2015 houve um surto de alta mortalidade e septicemia em perus industriais em uma grande empresa situada no Triângulo Mineiro, e a avaliação microbiológica e molecular associada a análise epidemiológica realizada pelo grupo coordenado pela orientadora desse trabalho concluiu que pela primeira vez a doença nos perus foi causada por *Erysipelothrix* sp strain 2. Como não se conhece o potencial zoonótico dessa bactéria, ainda não foi possível realizar a inoculação nas aves já que nesse caso seria necessário isoladores. Dessa forma foi utilizado modelo celular para melhor compreensão da doença.

Assim, há uma necessidade de um estudo das características relacionadas à patogenicidade da erisipela em perus causada por *Erysipelothrix* sp. strain 2, usando uma metodologia de inoculação bacteriana em cultura de célula com o objetivo de mensurar as alterações morfológicas e sua capacidade de causar apoptose celular.

1.1. Objetivos gerais

Caracterizar aspectos da patogenicidade da *Erysipelothrix* sp. strain 2 isolado de perus usando técnicas laboratoriais *in vitro*, utilizando amostras provenientes de um surto da doença identificada em uma empresa integralista localizada na região do Triângulo Mineiro.

1.2. Objetivos específicos

Análise de morfometria celular em cultura de células do tipo VERO, por microscopia óptica, com inoculação bactéria em três diferentes concentrações, em períodos de pós infecção de 4 (quatro) e 24 horas.

Avaliar apoptose das células Vero que foram infectadas com *Erysipelothrix* sp. strain 2 utilizando microscopia de fluorescência.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Identificação do agente

São descritas as seguintes espécies do gênero *Erysipelothrix*, *E. rhusiopathiae*, *E. tonsillarum*, *E. inopinata*, *Erysipelothrix* sp. strain 1 e *Erysipelothrix* sp. strain 2 (TAKAHASHI et al., 1992; VERBARG et al., 2004) sendo *E. larvae* sp. nov. a última espécie identificada (BANG et al., 2016). *Erysipelothrix* spp. formam colônias com uma aparência clara, com ou sem formação de hemólise parcial, tem formato circular de 0,1 a 0,5 milímetros de diâmetro, são bastonetes gram positivos não móveis, e negativos para catalase, oxidase, indol (CARTER, 1990; WOOD, 1999).

O agente mais conhecido do gênero *Erysipelothrix* é *E. rhusiopathiae* que compreende diversos sorotipos como os classificados em 1a, 1b, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 15, 16, 17, 19 e 21 e tipo N, seguida por *Erysipelothrix tonsillarum* com os respectivos sorovares 3, 7, 10, 14, 20, 22 e 25. A espécie *Erysipelothrix* sp. strain 1, anteriormente era classificada como o sorotipo 13 da espécie *E. rhusiopathiae*, e *Erysipelothrix* sp. strain 2 o sorotipo 18 da mesma espécie (TAKAHASHI et al., 1992). A filogenia aborda que *E. inopinata* divergiu antes da divisão entre a *E. rhusiopathiae* e *E. tonsillarum* amparada pelo estudo do sequenciamento do gene 16S rRNA (VERBARG et al., 2004). Para o crescimento bacteriano em laboratório, as espécies do gênero *Erysipelothrix* tem a necessidade do uso do ágar columbia (CA) ou ágar sangue (AS) enriquecido com sangue de carneiro a 5% (BROOKE; RILEY, 1999).

2.2 Aspectos econômicos

A Erisipela é uma doença que está ressurgindo nas produções avícolas europeias (JANBEN et al., 2015; ERIKSSON et al., 2013) . Quando acometidos pela Erisipela pode ocorrer perda de fertilidade nos perus machos, morte, desclassificação e condenação de carcaça resultante das alterações provocadas por septicemia. (BRICKER; SAIF, 2013). Segundo Bender et al.(2011) um dos fatores que leva a condenação de carcaças em suínos nos Estados Unidos é a ocorrência dessa patologia.

2.3. Importância na Saúde Pública

Geralmente as pessoas infectadas são as que lidam diretamente com a produção animal como é o caso de funcionários de frigoríficos, açougueiros e pescadores (VERALDI et al., 2009). Essa doença apresenta lesões de três tipos, as de pele eritematosa (erisipelóide), a forma cutânea generalizada e a forma septicêmica frequentemente associada à endocardite (BROOKE; RILEY, 1999). Pesquisas recentes relatam que a família Erysipelotrichaceae está associada com alterações a nível intestinal como inflamações do trato gastrointestinal e câncer colorretal (KAAKOUSH, 2015; NAGAO-KITAMOTO et al., 2016).

2.4. Hospedeiros

A Erisipela é uma doença cosmopolita, que acomete vários animais domésticos, selvagens e humanos (KANG et al., 2017). Nas produções avícolas e suínas, a espécie *E. rhusiopathiae* é a mais encontrada.

Esta doença foi relatada em outros tipos de aves, como em galinhas poedeiras em gaiolas (MUTALIB; KING; MCDONOUGH, 1993), patos (DHILLON et al., 1980), codornas (MUTALIB; KEIRS; AUSTIN, 1995) faisões de pescoço anelado (HENNIG et al., 2002), golfinhos (DÍAZ-DELGADO et al., 2015) e pingüins (BOERNE5 et al. 2004).

2.5. Mortalidade e morbidade

Animais infectados pela *E. rhusiopathiae* apresentam alta mortalidade e morbidade considerando animais que não foram imunizados ou não tiveram tratamento precoce administrado. Em aves com boas pode ocorrer uma queda repentina de imunidade e geralmente morte em 24 a 48 horas. A mortalidade pode variar muito dentro de determinado na produção avícola (BRICKER; SAIF, 2013).

2.6. Aspectos epidemiológicos

A Erisipela é diagnosticada com maior frequência em perus machos, no entanto não há evidências de predileção entre os sexos. Por meio de observações a campo o que pode ser notado é que a principal porta de entrada para o patógeno são lesões de pele, estrutura mais violada no macho por seu temperamento (BRICKER; SAIF, 2013). Surtos a campo ocorrem

geralmente em perus mais velhos, porém pode ocorrer em aves de qualquer idade (HOLLIFIELD et al. 2000).

Aves silvestres, mamíferos podem ser fonte de infecção por *E. rhusiopathiae* (SHUMAN, 1971). A ampla distribuição ecológica e geográfica do gênero é atribuída a sua capacidade de infectar um grande número de indivíduos hospedeiros que podem funcionar como portadores, permanecendo no ambiente e disseminando a doença (BROOKE; RILEY, 1999). É importante destacar a capacidade de infecção pela *Erysipelothrix* spp, em humanos por meio do contato com produtos de origem animal contaminados (NAKAZAWA, 1998).

2.7. Sinais clínicos

Quando ocorre o surto, o que se observa são diversas aves caídas pelo galpão, algumas com marcha instável, emagrecimento gradual, infertilidade no macho, lesões cutâneas, fraqueza e sinais de anemia. Perus que foram anteriormente vacinados podem vir a óbito com um possível resultado de embolia, sem apresentar sinais clínicos aparentes. (BRICKER; SAIF, 2013). Em galinhas podem ocorrer alterações como peritonite, congestão peritoneal e descoloração de pele, nas poedeiras pode ocorrer queda na produção de 50 a 70% (KILLAN et al., 1958).

Sobre o tempo de incubação Bricker; Saif (2013) revelou por meio de testes feitos em laboratório que ocorre a mortalidade em 44 a 70 horas em perus, e 96 a 120 horas na maioria dos animais quando inoculados por via subcutânea. Já com a inoculação por via oral, os parâmetros foram alterados para 2 a 3 dias, podendo chegar de 2 a 3 semanas com uma taxa de mortalidade menor.

2.8. Achados de Necropsia

Em suínos a doença causa septicemia aguda, com a formação de edema e hemorragia nos pulmões e coração, infartos cutâneos, coagulação intravascular e necrose vascular. Já na forma crônica provoca quadros de artrite e endocardite (BROOKE; RILEY, 1999; BRICKER; SAIF, 2013).

Em surtos endêmicos, as lesões são sugestivas de septicemia generalizadas, as principais lesões observadas em perus são: degeneração de gordura na borda anterior da coxa, hemorragia na gordura pericárdica, petéquias na gordura abdominal, hemorragia do músculo

cardíaco, fígado friável, aumento do baço e rins, exsudato fibrinopurulento nas articulações e saco pericárdico, placas de fibrina no músculo cardíaco, espessamento do proventrículo e ulcerações na parede da moela. Além de pequenos nódulos amarelos no ceco, enterite catarral ou sanguinolenta, endocardite, lesões cutâneas escuras e crostas (ROSENWALD; DICKINSON, 1941).

Em relação as lesões microscópicas, as características histológicas da Erisipela aguda em perus tem alterações esperados comumente em infecções septicêmicas (BICKFORD; CORSTVET; ROSENWALD, 1978).

2.9. Diagnósticos

Para diagnosticar as diferentes espécies do gênero *Erysipelothrix* a campo é usado o teste de aglutinação, por seu conjunto diverso de sorotipos (PAL; BENDER; OPRIESSNIG, 2010). Porém, não é adequado para análise da evolução dentro da espécie pois pode ocorrer a troca horizontal entre genes específicos de cápsula em muitas bactérias (KING et al., 2002).

Os agentes relacionados ao diagnóstico diferencial são facilmente diferenciados em relação ao gênero *Erysipelothrix*, baseados em coloração de Gram, realização das provas bioquímicas, crescimento em meio Packer e o padrão típico de crescimento no meio TSI. O diagnóstico confirmatório é feito por metodologia molecular, como teste de PCR, teste de anticorpos fluorescentes ou teste de patogenicidade em animais (BRICKER; SAIF, 2013).

De acordo com Bricker e Saif (2013) diversas patologias podem ser confundidas com a Erisipela em perus. Podemos citar: Cólera aviária, infecções por *Escherichia coli*, Salmonelose. A doença de Newcastle em estado agudo pode ser confundida pelo fato de causar mortalidade aguda.

2.10. Tratamento

Para perus diagnosticados com erisipela o tratamento de eleição é o uso de antibioticoterapia, sendo a penicilina sódica o fármaco de primeira escolha a ser administrada IM 10.000 U/lb do peso corporal em animais individualmente. Quando os animais acometidos são perus de corte, o manuseio individual das aves é prejudicial para sua saúde devido ao seu temperamento, sendo indicado nesses casos a administração da penicilina (1.000.000 U/gal) em água de bebida para todo o plantel com diagnóstico presuntivo,

considerando que todas as aves devem ser tratadas. A penicilina sódica é indicada por ser de ação rápida, porém existem indicações para uso de penicilina procaína e outros derivados de longa duração (BRICKER; SAIF, 2013).

2.11. Estratégias de prevenção

Para o controle de erisipela em regiões endêmicas, é indicado um protocolo de vacinação para perus. A proposta é uma única dose subcutânea (SC) inoculada na superfície dorsal do pescoço, atrás do atlas. Nos primeiros testes, a dose foi aplicada por via intramuscular (IM), no entanto, ocorreu à formação de abscessos com a possibilidade de desclassificação no abate, então a forma mais indicada é SC. Para perus classificados como reprodutores, é indicado o uso de duas doses com intervalo de 4 semanas, as vacinas devem ser realizadas antes do início da produção. A primeira dose deve ser realizada com 16-20 semanas de idade e a segunda imediatamente ao início da postura (BRICKER; SAIF, 2013).

Para a imunização de Perus contra a Erisipela os produtos usados são o hidróxido de alumínio inativado com formalina e bacterinas de *E. rhusiopathiae* adsorvidas que podem conter células inteiras ou lisadas. Estas bacterinas foram desenvolvidas para o uso em suínos e mostra-se eficaz para o uso em perus (WOOD, 1965).

Bricker e Saif (2013) sugerem de forma geral o uso de equipamentos limpos e desinfetados, produção em locais distantes de instalações previamente contaminadas. Uso de desinfetantes, como soluções de hidróxido de sódio 1-2%, fenóis, cresóis. Eficazes contra *E. rhusiopathiae*, e assim, importantes para o controle da doença.

2.12. Apoptose

Apoptose caracteriza-se, biologicamente, por fragmentação cromossômial do DNA, associado a uma série de anormalidades de expressão genética. Apoptose, também, pode ser diferenciada de necrose por alterações típicas celulares, como redução de volume celular e condensação da cromatina nuclear, além de pequenas formações bolhosas na membrana celular. Uma outra diferenciação importante é que necrose costuma ocorrer num agrupamento de células, enquanto apoptose pode ocorrer numa única célula ou, seqüencialmente, num número de células. Este processo, assim como a necrose, ocorre em

horas. Após apoptose, células são fagocitadas por macrófagos ou sofrem um processo de aglomeração extracelular (KERR, et al., 1972).

3. MATERIAL E MÉTODOS

De 2014 a março de 2015 houve um surto com septicemia e mortalidade aguda em 45 lotes de perus da linhagem Nicholas de uma empresa situada na região do Triângulo Mineiro. As lesões observadas durante a necropsia foram sugestivas de septicemia, e incluíam baço e rins aumentados e friáveis e alguns perus apresentavam enterite catarral. O grupo coordenado pela orientadora desse trabalho isolou a *Erysipelothrix* sp. strain 2 e verificou associação epidemiológica positiva entre a doença e a presença da *Erysipelothrix* sp. strain 2. Como não se conhecia o potencial zoonótico dessa bactéria e esse grupo de trabalho não possui isoladores para inoculação *in vivo* foi realizada análise em modelo celular.

Para análise o efeito citopático celular geral pela *Erysipelothrix* sp. strain 2, foi usado cultura de células do tipo VERO. Nakamura e colaboradores em 1962 no Japão, designaram a linhagem VERO, originária do rim do Macaco Verde Africano (*Cercopithecus aethiops*) como modelo para experimentos de laboratório (BRETAS, 2011).

No laboratório foram semeadas células VERO em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) enriquecido com soro fetal bovino a 5% em lâminas circulares de 13 mm colocadas em placas de 6 poços a uma densidade de $1,68 \times 10^4$ células / poço e foram incubadas por 4 e 24 horas em estufa de CO₂. Após adesão e confluência das células (aproximadamente 48 horas) foi inoculado em triplicata dois isolados referidos de *Erysipelothrix* sp. strain 2 (Est06 e Est07) utilizando o seguinte inóculo de bactéria isoladas de ágar sangue enriquecida com 5% de sangue de carneiro: DO: > 1 Log CFU; D3: 3 Log CFU; D7: 7 Log CFU. e NC (Controle negativo) tratado com o mesmo diluente usado para bactérias (PBS) estéril. Após 4 e 24 horas, as lâminas foram removidas e fixadas em formalina a 10%, lavadas em PBS, coradas com corante panótico (New Prov®), por último, colocadas em lâminas com Entellan (Merk®). A visualização e a documentação fotográfica foram realizadas sob um microscópio acoplado a câmera (Olympus câmera, 200), tipo Olympus BX 40 com ampliação de 100x, utilizando o software *Data Translation* 3153. A edição, processamento e análise das imagens foram realizados por meio do programa *image J*, versão 1.51 2017. Foram avaliados 8 diferentes campos por lâmina considerando que 4 parâmetros

foram analisados: área do núcleo, perímetro do núcleo, área do nucléolo e perímetro do nucléolo.

Para a verificação de apoptose as células VERO foram semeadas em DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco) enriquecido com 5% de soro fetal bovino em lamínulas circulares de 13mm e colocadas em uma placa de 6 poços a uma densidade de 2×10^4 células / poço e incubadas por 48 horas a 37°C e 5% de CO₂ atmosfera e confirmada a confluência celular. Neste momento, foi inoculado em triplicata: (i) *Erysipelothrix* sp. strain 2 isolado Est06, (ii) *Erysipelothrix* sp. strain 2 isolado Est07 ambas utilizando 3 log CFU / poço, (iii) 3 log CFU / poço *Lactobacillus* spp (LB) isolado de bebida láctea probiótica fermentada (CALU®) em ágar MRS (deMan, Rogosa e Sharpe) como controle negativo bacteriano (OXOID) e (iv) NC: Tratado com o mesmo diluente utilizado para bactérias (PBS) estéril sem nenhuma bactéria como controle negativo do processo.

Após 4 e 24 horas as células foram lavadas três vezes com PBS, tratadas com Yo Pro-01 (YP) para marcar células que ainda são metabolicamente ativas, e iodeto de propideo (PI) (1: 1000) (Invitrogen®) que marca células em necrose, durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após o tratamento das células com YP e PI, as lamínulas foram lavadas três vezes e fixadas com formalina a 4% durante 10 minutos. Em seguida, as células foram tratadas com Hoechst (Sigma®) para marcar o material genético da célula. As lamínulas foram lavadas e montados em ProLong anti-fading (Invitrogen®). As contagens foram avaliadas sob um microscópio de fluorescência. De cada lamínula cinco campos diferentes foram avaliados. Todas as análises foram realizadas no GraphPad Prism 7.04.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na análise morfométrica das células VERO infectadas com os isolados Est06 e Est07 de *Erysipelothrix* sp. strain 2 em diferentes concentrações e tempo de 4 e 24 horas de incubação, todos os parâmetros medidos (área do núcleo, perímetro do núcleo, área do nucléolo e perímetro do nucléolo) apresentaram aumento significativo. Foi observado que a menor quantidade de bactérias (D0) foi eficiente em aumentar todos os parâmetros com 4 e 24 horas em Est06, e todos os parâmetros com 4 horas em Est07, com 24 horas em Est07 a quantidade de bactérias (D0) foi eficiente em aumentar a área do núcleo. A quantidade de

bactéria (D3) foi eficiente em aumentar parâmetros do núcleo com 4 e 24 horas em Est06. A figura 1 exemplifica o aumento das células VERO quando inoculadas com *Erysipelothrix* sp. strain 2.

Tabela 1. Morfometria de Células Vero 4 horas após infecção com Est06 em diferentes concentrações.

	4h NC	4h D0	4h D3	4h D7
Área do Núcleo (uM)	2,514 ^{ab}	6,279 ^c	3,751 ^d	2,897 ^b
Perímetro do Núcleo (uM)	177,5 ^a	280,6 ^b	216,9 ^c	191,1 ^d
Área do Nucléolo (uM)	1,238 ^a	3,491 ^b	2,359 ^c	1,983 ^d
Perímetro do Nucléolo (uM)	124,3 ^a	208,6 ^b	172,0 ^c	157,2 ^d

Letras diferentes na mesma linha representam estatísticas diferentes ($p < 0.05$).

Tabela 2. Morfometria de Células Vero 24 horas após infecção com Est06 em diferentes concentrações.

	24h NC	24h D0	24h D3	24h D7
Área do Núcleo (uM)	2,448 ^a	6,838 ^b	3,263 ^c	3,976 ^d
Perímetro do Núcleo (uM)	175,1 ^a	292,6 ^b	202,2 ^c	223,4 ^d
Área do Nucléolo (uM)	1,194 ^a	3,737 ^b	1,878 ^c	2,024 ^d
Perímetro do Nucléolo (uM)	122,0 ^a	216,0 ^b	153,2 ^c	159,3 ^e

Letras diferentes na mesma linha representam estatísticas diferentes ($p < 0.05$).

Tabela 3. Morfometria de Células Vero 4 horas após a infecção com Est07 em diferentes concentrações.

	4h NC	4h D0	4h D3	4h D7
Área do Núcleo (uM)	2,656 ^a	4,948 ^b	3,492 ^b	2,763 ^a
Perímetro do Núcleo (uM)	181,3 ^a	246,3 ^b	209,5 ^c	188,1 ^a
Área do Nucléolo (uM)	1,270 ^a	2,539 ^b	1,877 ^c	1,661 ^c
Perímetro do Nucléolo (uM)	126,0 ^a	178,2 ^b	153,2 ^c	143,9 ^c

Letras diferentes na mesma linha representam estatísticas diferentes ($p < 0.05$).

Tabela 4. Morfometria de Células Vero 24 horas após infecção com Est07 em diferentes concentrações

	24h NC	24h D0	24h D3	24h D7
Área do Núcleo (uM)	2,721 ^a	4,402 ^b	4,510 ^c	2,910 ^a
Perímetro do Núcleo (uM)	184,4 ^a	236,0 ^b	238,5 ^b	191,4 ^a
Área do Nucléolo (uM)	1,309 ^a	2,083 ^{bc}	2,305 ^b	1,666 ^c
Perímetro Nucléolo (uM)	127,9 ^a	161,0 ^b	168,6 ^b	146,4 ^c

Letras diferentes na mesma linha representam estatísticas diferentes ($p < 0.05$).

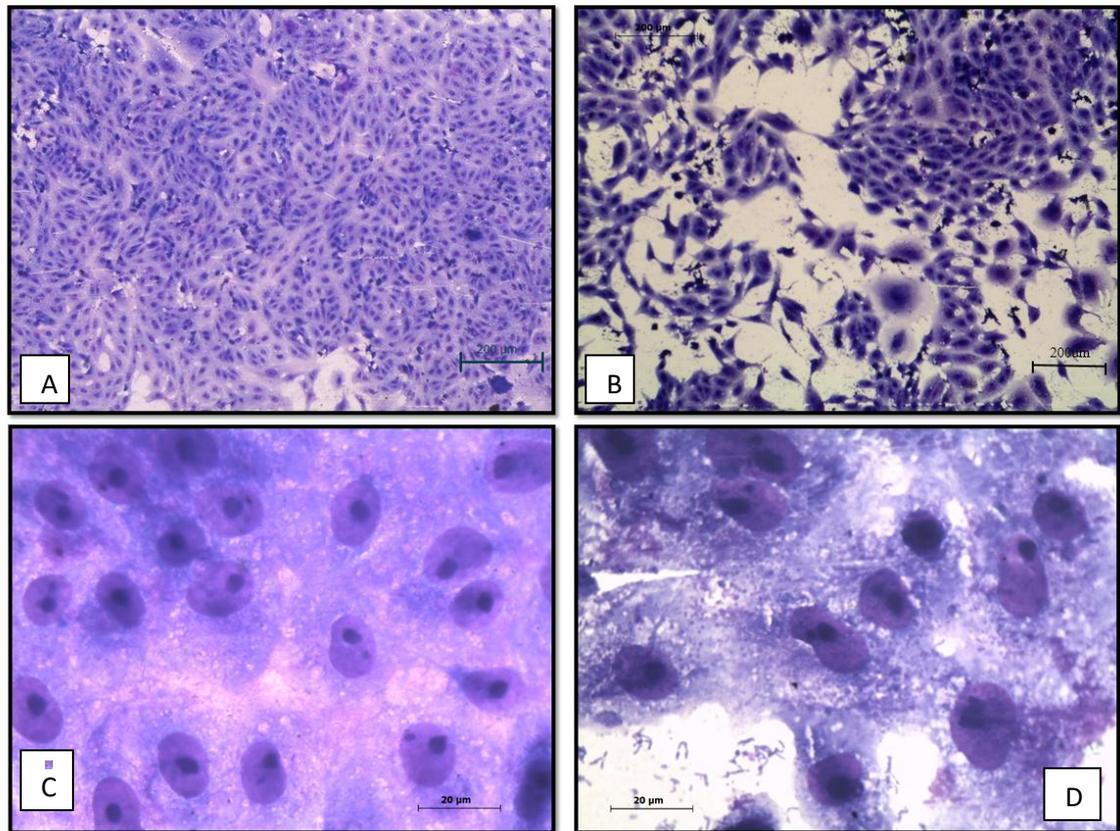


Figura 1: Células Vero coradas com corante panótico. A. Grupo de controle negativo de células Vero 4 horas (objetiva de 10 vezes). B. Celulas Vero D0 Est06 grupo 4 horas pós inóculo (objetiva de 10 vezes). C. Grupo de controle negativo de células Vero 4 horas (objetiva de 100 vezes). B. Celulas Vero D0 Est06 grupo 4 horas pós inóculo. (objetiva de 100 vezes).

Para verificar alterações morfológicas em células VERO infectadas com *Erysipelothrix* sp. strain 2, foram produzidas imagens com base em técnicas de microscopia celular e morfométrica. Segundo Falk et. al. (2018) essas análises favorecem maior rigor estatístico. Houve aumento significativo da área e perímetro do núcleo e nucléolo durante 4 e 24 horas pós inoculação em diversas concentrações (Tabelas 1,2,3 e4). Estes resultados mostram que a *Erysipelothrix* sp. strain 2 pode levar a citotoxicidade celular.

Embora tenha sido observado aumento de núcleo e nucléolo, não identificamos a (s) proteína (s) de virulência que pode (m) gerar essa alteração celular. Em bactérias gram-negativas (como *Shigella* spp. E *Campylobacter jejuni*) (JINADASA, et al. 2011) existem toxinas citotóxicas distensoras (CDT - sigla em inglês) que levam ao aumento e distensão das células e então promovem a apoptose celular, mas não há toxinas similares relacionadas em bactérias gram-positivas. No entanto, proteínas como alfa-hemolisina (MENZIES e KOURTEVA, 2000) e exotoxina pirogênica B (TSAI et al., 1999) são exemplos de proteínas conhecidas por induzir apoptose em bactérias gram-positivas. Jain et al. (2009) também

afirma que a CDT causa uma distensão nas células e provoca apoptose com fragmentos de DNA utilizando gram-negativas. De uma forma geral, pôde-se observar que a menor quantidade da bactéria inoculada foi capaz de alterações significativas. Esse evento pode ser explicado pelo fato de que uma menor quantidade de bactéria se beneficiou com mais meio de cultura e encontrou as células livres para infectar; quando a concentração é maior, o efeito nas células é menor, podendo ser explicado pelo fato que há uma competição maior quando a concentração de bactérias é maior.

O aumento das dimensões do núcleo e do nucléolo instigou a avaliação do índice apoptótico dessas células (Figura 2 e 3). Para isso, foi utilizado o YP que pode marcar células que ainda são metabolicamente ativas, mas que têm membranas plasmáticas comprometidas, ou seja, detectam células em estágios iniciais de apoptose (células nas quais a fragmentação do DNA ainda não ocorreu) (FUJISAWA et al., 2014). Assim, foi observado uma maior percentagem de células marcadas com YP nos grupos tratados com Est06 e Est07 do que naqueles tratados com LB ou sem qualquer tratamento. O grupo Est07 4h apresentou maior porcentagem de células marcadas com YP que os demais grupos indicando um comportamento diferente para cada cepa isolada. Células tratadas com Est06 e Est07 também tiveram números maiores de células marcadas com IP (Figura 1, 2) que marca células em necrose.

A apoptose pode ser prejudicial ao hospedeiro associada ao potencial aumentado de virulência da bactéria. Para persistir na célula hospedeira, os patógenos desenvolveram mecanismos de sobrevivência intracelular e / ou apoptose (SHIMOJI, 2000, GALAN e COSSART, 2005; MOSTOY e COSSART, 2012). A apoptose dessa bactéria pode ser a chave para o melhor entendimento da patogênese da *Erysipelotrix* sp. strain 2. A apoptose pode ser um mecanismo importante para evadir a resposta imune em particular a inata, reduzindo as lesões inflamatórias (KERR, 1972; GALLUCCI et al., 1999).

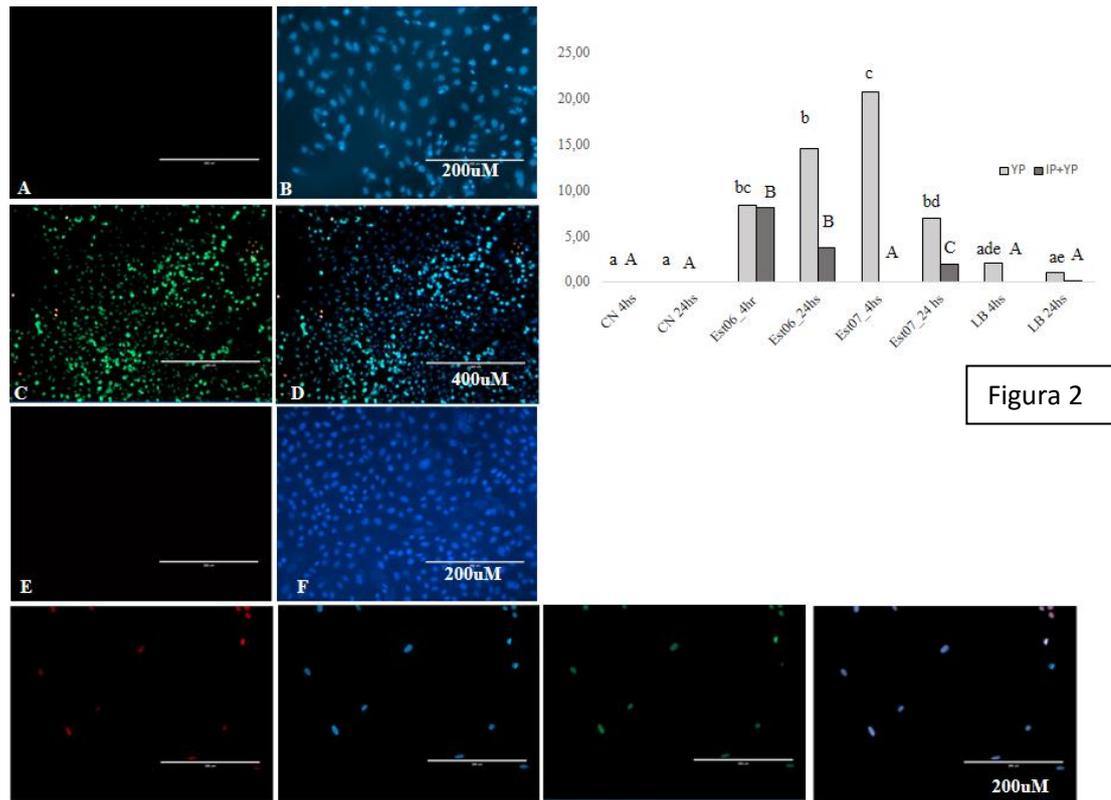


Figura 2

Figura 3

Figura 2: Percentagem de células marcadas com YP e IP 4 e 24 horas p.i. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística para marcações YP. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística para marcação com YP + IP.

Figura 3: Imagem por fluorescência de células Vero marcadas com YP, PI e hoechst. A e B: células do *Lactobacillus* spp. grupo de controlo 4 horas mostrando apenas os núcleos marcados com Hoechst. B. as células não foram marcadas com PI e YP (A). C e D: células do grupo Est06 4 horas mostrando núcleos marcados com IP e YP (C) e, YP, PI Hoechst (D). E e F: as células do grupo de Controlo Negativo 24 horas mostrando apenas as culas dos neleos marcados com Hoechst (F) n foram marcadas com PI e YP (E). G, H, I, J: células do Est07 24 horas mostrando núcleos marcados com PI (G), marcados com Hoeschst (H), marcados com YP (I) e todos os marcadores (J).

6. CONCLUSÃO

Erysipelothrix sp. strain 2 quando inoculada em células VERO em diferentes concentrações, apresenta capacidade de aumentar as dimensões de núcleo e nucléolo e levar a apoptose o que pode ser uma estratégia de evadir o sistema imune e levar a doença septicêmica.

REFERÊNCIAS

- ABPA. **Brazilian association of Animal Protein, 2018.** Relatório anual 2018. Available in: <http://abpa-br.com.br/storage/files/relatorio-anual-2018.pdf> Acesso em: Mar. 23, 2019.
- BANG, B. et al. Erratum to: *Erysipelothrix larvae* sp. nov., isolated from the larval gut of the rhinoceros beetle, *Trypoxylus dichotomus* (Coleoptera). **Antonie van Leeuwenhoek**, [s.l.], v. 109, n. 1, p.167-168, 25 jan. 2016.
- BENDER, J. S. et al. *Erysipelothrix* Spp. Genotypes, Serotypes, and Surface Protective Antigen Types Associated with Abattoir Condemnations. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.139-142, jan. 2011.
- BOERNER, L. et al. *Erysipelothrix* Septicemia in a Little Blue Penguin (*Eudyptula Minor*). **Journal Of Veterinary Diagnostic Investigation**, [s.l.], v. 16, n. 2, p.145-149, mar. 2004.
- BRETAS, R.M. (2011) **Avaliação da capacidade instalada para a produção e certificação de células animais** [dissertação/dissertação de mestrado]. [Rio de Janeiro] Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos.
- BRICKER, Joseph M., SAIF, Mohamed Y., 2013. Erysipelas, in: Swayne, D.E., Glisson, J.R., Mc Dougald, L.R, Nolan, L.K., Suarez, L. D., Nair,V. (Eds.), **Diseases of Poultry**, Ames: Iowa State University Press, p. 812-826.
- BROOKE, Josephine C.; RILEY, Thomas V. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of an occupational pathogen. **J. Med. Microbiol: Journal of Medical Microbiology**, [s.l.], v. 48, n. 20, p.789-799, 5 out. 1999.
- CARTER, G. R. *Erysipelothrix rhusiopathiae*, in: Cole JR (Ed.) *Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology*, 1st edn. Springfield, Academic Press, pp 195-196 (1990).
- DÍAZ-DELGADO, J. et al. Fatal *Erysipelothrix rhusiopathiae* septicemia in two Atlantic dolphins (*Stenella frontalis* and *Tursiops truncatus*). **Diseases Of Aquatic Organisms**, [s.l.], v. 116, n. 1, p.75-81, 17 set. 2015.
- DHILLON, A. S. et al. Erysipelas in Domestic White Pekin Ducks. **Avian Diseases**, [s.l.], v. 24, n. 3, p.784-787, jul. 1980.
- ERIKSSON, H. et al. Erysipelas in laying hens is associated with housing system. **Veterinary Record**, [s.l.], v. 173, n. 1, p.18-18, 29 mar. 2013.
- FUJISAWA, S., Romin Y, Barlas, A., Petrovic, L.M., Turkekul, M., Fan, N., Xu, K., Garcia, A.R., Monette, S., Klimstra, D.S., Erinjeri, J.P., Solomon, S.B., Manova-Todorova,

- K., Sofocleous, C.T., et al.(2013) Evaluation of YO-PRO-1 as an early marker of apoptosis following radiofrequency ablation of colon cancer liver metastases. **Cytotechnology**. 66, 259-273. doi:10.1007/s10616-013-9565-3.
- GALÁN, J.,and Cossart, P.(2005). Host–pathogen interactions: a diversity of themes, a variety of molecular machines. **Current Opinion In Microbiology**. 8,1-3. doi: 10.1016/j.mib.2004.12.015.
- GALLUCCI, S.,Lolkema, M.,Matzinger, P.(1999). Natural adjuvants: Endogenous activators of dendritic cells. **Nature Medicine**. 5,1249-1255. doi:10.1038/15200.
- HENNIG, G. E. et al. Diagnosis by Polymerase Chain Reaction of Erysipelas Septicemia in a Flock of Ring-Necked Pheasants. **Avian Diseases**, [s.l.], v. 46, n. 2, p.509-514, abr. 2002.
- HOLLIFIELD, J. L.; COOPER, G. L.; CHARLTON, Bruno Ricardo. An outbreak of erysipelas in 2-day-old poult. **Avian Diseases**, [s.l.], v. 44, n. 3, p.721-724, jul-set. 2000.
- JAIN,D.; PRASAD, K. N.; SINHA, S.; Vishwakarma, A.L. Cell cycle arrest e apoptosis of epithelial cell line by cytolethal distending toxin positive *Campylobacter jejuni*. **Indian Journal Medical Research**, April 2009, PP 418-423.
- JANßEN, T. et al. A combinational approach of multilocus sequence typing and other molecular typing methods in unravelling the epidemiology of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains from poultry and mammals. **Veterinary Research**, [s.l.], v. 46, n. 1, p.46-84, 21 jul. 2015.
- KAAKOUSH, Nadeem O. Insights into the Role of Erysipelotrichaceae in the Human Host. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s.l.], v. 5, v. 84, p.1-3, nov. 2015.
- KANG, C. et al. Transcription analysis of the responses of porcine heart to *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **Plos One**, [s.l.], v. 12, n. 10, p.1-13, out. 2017.
- KERR, J. F. R., Wyllie, A. H., Currie, A. R.(1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal Of Cancer**. 26, 239-257. doi: [10.1038/bjc.1972.33](https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33)
- KILLAN, J G; BABCOCK, W. E.; DICKINSON, E. M. Two case of Erysipelothrix rhusiopathiae infection in chickens. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, [s.l.], v. 44, n. 1, p.560-562, jan. 1958.
- KING, S. J. et al. Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for the Pig Pathogen *Streptococcus suis*: Identification of Virulent Clones and Potential Capsular Serotype Exchange. **Journal of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 40, n. 10, p.3671-3680, out. 2002.

- MENZIES, B., and Kourteva, I.(2000). Staphylococcus aureus $\hat{\pm}$ -toxin induces apoptosis in endothelial cells. **Fems Immunology & Medical Microbiology**. 29, 39-45. doi:10.1111/j.1574-695x.2000.tb01503.x
- MOSTOWY, S., Cossart, P.(2012). Bacterial autophagy: restriction or promotion of bacterial replication?. **Trends In Cell Biology**. 22, 283-291. doi: 10.1016/j.tcb.2012.03.006.
- MUTALIB, A.; KEIRS, R.; AUSTIN, F. Erysipelas in Quail and Suspected Erysipeloid in Processing Plant Employees. **Avian Diseases**, [s.l.], v. 39, n. 1, p.191-193, jan. 1995.
- MUTALIB, A. A.; KING, J. M.; MCDONOUGH, P. L. Erysipelas in Caged Laying Chickens and Suspected Erysipeloid in Animal Caretakers. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, [s.l.], v. 5, n. 2, p.198-201, abr. 1993.
- NAGAO-KITAMOTO, H. et al. Pathogenic role of the gut microbiota in gastrointestinal diseases. **Intestinal Research**, [s.l.], v. 14, n. 2, p.127-138, mar. 2016
- NAKAZAWA, H. et al. Occurrence of Erysipelothrix spp. in chicken meat parts from a processing plant. **Journal Food Protection**, [s.l.], v. 61, n. 9, p.1207-1209, jul. 1998.
- OPRIESSNIG T, Wood RL. **Erysipelas**. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, editors. Diseases of swine. 10. Hoboken: John Wiley & Sons; 2012. pp. 750–9.
- SHIMOJI, Y.(2000). Pathogenicity of Erysipelothrix rhusiopathiae: virulence factors and protective immunity. **Microbes And Infection**. 2, 965-972. doi:10.1016/s1286-4579(00)00397-x.
- SHUMAN, R. D., 1971. *Erysipelothrix*, in: Davis, J.W., Anderson, R.C., Karstad, L.H., Trainer, D.O. (Eds.), Infectious and Parasitic Diseases of Wild Birds, Ames: **Iowa State University Press**, p.141.
- TAKAHASHI, T. et al. DNA relatedness among Erysipelothrix rhusiopathiae strains representing all twenty-three serovars and Erysipelothrix tonsillarum. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s.l.], v. 142, n. 3, p.469-476, jul 1992.
- TO, Ho et al. Characterization of Erysipelothrix rhusiopathiae Strains Isolated from Recent Swine Erysipelas Outbreaks in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, [s.l.], v. 74, n. 7, p.949-953, mar.2012
- TSAI, P.J., Lin, Y.S., Kuo, C.F., Lei, H.Y., Wu, J.J., et al.(1999) Group A Streptococcus Induces Apoptosis in Human Epithelial Cells. **Infection And Immunity**. 67,4334-4339.

- PAL, N.; BENDER, J. S.; OPRIESSNIG, T. Rapid detection and differentiation of *Erysipelothrix* spp. by a novel multiplex real-time PCR assay. **Journal of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 108, n. 3, p.1083-1093, mar. 2010.
- ROSENWALD, Alan Silva; DICKINSON, Emilio Mario. A report of swine erysipelas in turkeys. **American Journal of Veterinary Research**, [s.l.], v. 2, n. 0, p.202-2013, 1941.
- VERALDI, S. et al. Erysipeloid: a review. **Clinical And Experimental Dermatology**, [s.l.], v. 34, n. 8, p.859-862, dez. 2009.
- VERBARG, Susanne. *Erysipelothrix inopinata* sp. nov., isolated in the course of sterile filtration of vegetable peptone broth, and description of Erysipelotrichaceae fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s.l.], v. 54, n. 1, p.221-225, jan. 2004.
- VERBARG, S. et al. The Families Erysipelotrichaceae emend, Coprobacillaceae fam. nov., and Turicibacteraceae fam. nov. **The Prokaryotes**, [s.l.], p.79-105, 2014.
- WOOD, R. L. **Erysipelas**, in: Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ. (Eds.), *Diseases of Swine*, Ames: Iowa State University Press, pp. 419-430 (1999).