

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Detecção do Circovírus suíno Tipo-2 (PCV2) e de *Helicobacter pylori*
por imunistoquímica em úlceras gástricas de suínos.

André Mendes Ribeiro Corrêa

PORTO ALEGRE
2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**Detecção do Circovírus suíno Tipo-2 (PCV2) e de *Helicobacter pylori*
por imunistoquímica em úlceras gástricas de suínos.**

Doutorando: André Mendes Ribeiro Corrêa

Orientador: David Driemeier

Co-orientador: David Emílio Santos Neves de Barcellos

**Tese apresentada como requisito para
obtenção do grau de Doutor em Ciências
Veterinárias, na área de concentração
em Patologia Veterinária, na
Universidade Federal do Rio Grande do
Sul.**

PORTO ALEGRE

2008

AGRADECIMENTOS

Aos colegas de trabalho do SPV (doutorandos, mestrandos e estagiários) que compartilharam, ajudaram ou contribuíram em algum momento da minha formação acadêmica.

Às funcionárias Ângela e Marília (azgurias) pela pura amizade nesses quase nove anos de ótimo convívio.

Aos professores da FAVET–UFRGS que me ensinaram, apoiaram e incentivaram durante a minha formação acadêmica.

Aos colegas Patologistas Veterinários de Lages, Pelotas e Santa Maria pelo intercâmbio e bom convívio nos encontros profissionais pelo Brasil afora.

Aos colegas, amigos e “co-orientadores” Sandra Davi Traverso e Edson Moleta Colodel, pela atenção, pela disposição em me corrigir e por me ensinar como agir profissionalmente.

Aos colegas, Caroline Pescador, Cláudio Cruz, Daniela Rozza, Luis Gustavo Corbellini, Pedro Bezerra, Priscila Zlotowski e Raquel Rech, pelo apoio profissional e amizade nos momentos bons e ruins.

Aos meus familiares, meu muito obrigado pela atenção, incentivo e fé em meus estudos, principalmente para a minha Mamãe, Tônio, Bitá e Papai.

Ao meu co-orientador, David Barcellos, pelo exemplo de vida profissional e pessoal.

Ao meu orientador David Driemeier, pela humildade, profissionalismo, postura ética e acima de tudo, amizade.

À minha namorada Vanessa pelo apoio, paciência e amor.

!!! Muito obrigado a todos !!!

**Detecção do Circovírus suíno Tipo-2 (PCV2) e de *Helicobacter pylori*
por imunistoquímica em úlceras gástricas de suínos**

Autor: André Mendes Ribeiro Corrêa

Orientador: David Driemeier

Co-orientador: David Emílio Santos Neves de Barcellos

RESUMO

O objetivo deste estudo foi analisar a participação do PCV2 no desenvolvimento de ulcerações gástricas em suínos. Descrevem-se as lesões macroscópicas e histopatológicas nas diferentes zonas do estômago de suínos naturalmente infectados pelo PCV2 e *H. pylori*. As lesões foram descritas nas diferentes zonas do estômago. Os estômagos coletados eram provenientes de granjas com diagnóstico prévio de infecção pelo PCV2 durante os anos de 2006 à 2008. A presença dos agentes foi verificada por técnicas de imunistoquímica (IHQ). Dentre os 63 estômagos processados, 30 não apresentavam ulcerações no quadrilátero, sendo que 16 deles apresentavam marcação anti-PCV2 positiva em alguma das regiões analisadas. Apenas 06 casos não apresentavam marcação anti-PCV2 nos dos tecidos testados (estômago e linfonodo). Marcação positiva anti-PCV2 foi verificada em 56 linfonodos, dos quais 28 estômagos foram positivos para PCV2 em alguma zona da mucosa glandular. Grandes quantidades de antígeno do PCV2 foram observadas pela IHQ no citoplasma, núcleo e restos necróticos de células intralesionais das glândulas gástricas nas regiões do antro e cárdia; entretanto, na região do fundo, a marcação de IHQ anti-PCV2 foi restrita às células da superfície mucosa e fossetas gástricas. Marcação de IHQ anti-*H. pylori* foi identificada em 27 casos, principalmente, na superfície mucosa e fossetas gástricas no antro. A associação de antígenos PCV2 com células produtoras de muco lesadas na zona glandular gástrica sugere o envolvimento de PCV2 como um fator adicional para o desenvolvimento de úlceras gástricas em suínos.

Palavras chaves: Úlcera gástrica, PCV2, *Helicobacter pylori*, suínos.

Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias – Cirurgia e Patologia Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS (54p), junho de 2008.

Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) and *Helicobacter pylori* detection by immunohistochemical techniques in swine gastric ulcers

Author: André Mendes Ribeiro Corrêa

Adviser: David Driemeier

Co-adviser: David Emílio Santos Neves de Barcellos

ABSTRACT

The aim of this study was to describe macroscopical and histopathological found in different zones of stomachs collected from pigs naturally infected with PCV2 and *H. pylori*. lesions were described in the different zones of the stomach. Stomachs were collected during the years of 2006 to 2008 from herds previously diagnosed as positive for PCV2 infection. The presence of the agents was determined by immunohistochemical techniques. Among 63 stomachs examined, ulceration of the Pars oesophagica was not observed in 30 stomachs, although, 16 of them showed positive PCV2 immunostaining in some of the areas tested. PCV2 immunostaining was not observed in only six cases in any of the tested tissues (stomach and lymph node). PCV2 positive immunostaining was observed in 56 lymph nodes and in some zones of the glandular mucosa, in 28 stomachs. Large amounts of PCV2 antigen were observed in the cytoplasm and nucleus of intralesional cells and in debris of gastric glands of antrum and cardia. However, anti-PCV2 immunostaining was restricted to superficial mucosal cells and gastric pits, in the fundus. *H. pylori* immunostaining was observed in 27 cases, mainly on the mucosal surface and gastric pits of the antrum. The association of PCV2 antigen with damaged glandular mucus-producing cells in the gastric glandular zone suggests a role of PCV2 as an additional factor for the development of swine gastric ulcers.

Keywords: Gastric ulcer, PCV2, *Helicobacter pylori*, swine

Doctorate thesis in Veterinary Science, Animal Pathology and Surgery, Veterinary College, University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS (54p), June 2008.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	3
RESUMO.....	4
ABSTRACT	5
LISTA DE TABELAS.....	7
LISTA DE FIGURAS	8
1. OBJETIVOS	10
1.1 Objetivo Geral	10
1.2 Objetivos específicos.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1. Ulcerações Gástricas em Suínos.....	11
2.2. Circovirose Suína	17
2.3. Infecção por <i>Helicobacter pylori</i>	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1. Coleta das amostras	21
3.2. Técnica de imunistoquímica.....	22
4. RESULTADOS	24
5. ARTIGO I.....	32
6. ARTIGO II	37
7. DISCUSSÃO.....	47
8. REFERÊNCIAS	49
ANEXO I.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fatores de risco relacionados com o desenvolvimento de ulcerações gástricas em suínos.....	12
Tabela 2 - Resultados das análises patológicas dos 63 estômagos suínos analisados pelo SPV.	27
Tabela 3 - Resultados imunistoquímicos contra PCV2 e <i>H. pylori</i> e resultados histológicos para a presença de <i>Candida</i> sp. relacionados com o grau de ulceração.	28

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Ulcerações gástricas em suínos. Estômago suíno normal fixado em formalina demonstrando as diferentes regiões internas. 1- Quadrilátero esofágico. 2- Mucosa glandular do cárdia. 3- Fundo. 4- Mucosa glandular do piloro. Seta - *Torus piloricus*. ..13
- Figura 2 - Ulcerações gástricas em suínos. Sinal clínico e achado de necropsia. Fezes escurecidas aderidas ao ânus e períneo..... 13
- Figura 3 - Ulcerações gástricas em suínos. Estenose do cárdia devido à cicatrização de ulceração gastresofágica. Observe as pregas características (plissadas) da mucosa adjacente tecido cicatricial no quadrilátero esofágico..... 13
- Figura 4 - Ulcerações gástricas em suínos. Esôfago de dois suínos de mesmo porte seccionados na altura da entrada do cárdia. Suíno 1 - Controle. Suíno 2 - Estenose do cárdia. Hipertrofia das camadas musculares e dilatação da luz..... 13
- Figura 5 - Ulcerações gástricas em suínos. Sangue coagulado, com formação de coágulo cruórico. Tubo 1 - suíno com úlcera hemorrágica. Tubos 2 e 3 - Suínos controles. Observe o hematócrito diminuído no suíno afetado, quando comparado aos controles, devido à anemia provocada pela hemorragia na úlcera gástrica.25
- Figura 6 - Ulcerações gástricas em suínos. Observe o conteúdo gastrintestinal escuro, a palidez da carcaça e acentuação do padrão lobular hepático em um suíno com úlcera gastresofágica hemorrágica.25
- Figura 7 - Ulcerações gástricas em suínos. Ulceração acentuada do quadrilátero esofágico com ausência de epitélio queratinizado e grande quantidade de tecido de granulação. Conteúdo escuro grumoso (sangue) com milho particulado.25
- Figura 8 - Ulcerações gástricas em suínos. Superfície de corte do fígado mostrando acentuação do padrão lobular em casos de ulceração gastresofágica hemorrágica com anemia intensa.25
- Figura 9 - Ulcerações gástricas em suínos. Marcação anti-PCV2 acentuada principalmente no citoplasma de histiócitos dos linfonodos gástricos. IHQ com DAB, obj 100x.26
- Figura 10 - Ulceração gastresofágica em suínos. Marcação anti-PCV2 no citoplasma das células das glândulas gástricas. IHQ com DAB, obj 40x.....26
- Figura 11 - Ulcerações gástricas em suínos. Pseudomembranas brancas recobrem a área ulcerada da porção do quadrilátero esofágico.26

Figura 12 - Ulcerações gástricas em suínos. Coloração de PAS evidenciando leveduras e pseudo-hifas de <i>Candida</i> sp. na superfície do epitélio queratinizado do quadrilátero esofágico, obj 40x.....	26
Figura 13 - Ulcerações gástricas em suínos. Marcação positiva para anti-PCV2 no citoplasma das glândulas gástricas. Diminuição da produção e secreção de muco na superfície da mucosa gástrica. IHQ com DAB + Azul Alciano + Hematoxilina, obj 20x.	29
Figura 14 - Ulcerações gástricas em suínos. Marcação positiva anti-PCV2 no citoplasma das células das glândulas gástricas. IHQ com DAB, obj 20x.....	29
Figura 15 - Ulcerações gástricas em suínos. Marcação positiva Vector <i>NovaRED</i> positiva anti- <i>H. pylori</i> com múltiplos agregados de <i>H. pylori</i> no muco superficial e nas fossetas gástricas na altura do piloro. IHQ, obj 40x.....	29
Figura 16 - Ulcerações gástricas em suínos.. Marcação IHQ Vector <i>NovaRED</i> positiva anti- <i>H. pylori</i> na superfície da mucosa gástrica na altura do piloro. Presença de bactérias <i>Helicobacter pylori</i> no muco superficial e nas fossetas gástricas, obj 100x.	29
Figura 17 - Ulcerações gástricas em suínos. Células gigantes e histiócitos com marcação IHQ com DAB anti-PCV2 positiva expandindo a lâmina própria da mucosa gástrica, obj 40x.	30
Figura 18 - Ulcerações gástricas em suínos. Célula gigante associada a glândula gástrica na lâmina própria. IHQ com DAB, obj 100x.	30
Figura 19 – Ulcerações gástricas em suínos. Marcação IHQ anti-PCV2 no citoplasma e núcleo das células das glândulas gástricas. Restos necróticos no lúmen. IHQ com DAB obj 100x.	31
Figura 20 – Ulcerações gástricas em suínos. Marcação IHQ anti-PCV2 no citoplasma e núcleos das células das glândulas gástricas e nos debrís necróticos do lúmen. IHQ com DAB obj 100x.....	31

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

- Analisar aspectos de necropsia e histológicos dos casos de ulcerações gástricas em suínos, procurando estabelecer uma relação entre as lesões potencialmente atribuídas ao Circovírus suíno Tipo-2 (PCV2) e *Helicobacter pylori* através da técnica de imunistoquímica.

1.2 Objetivos específicos

- O aperfeiçoamento dessa técnica poderá auxiliar no diagnóstico dessas doenças adicionando novas informações sobre a real participação desses agentes etiológicos na patogenia das ulcerações gástricas em suínos no Brasil.
- Descrever as principais alterações macroscópicas e microscópicas encontradas nas úlceras gástricas em suínos, bem como alterações sistêmicas associadas a essa lesão, e a possível patogenicidade dos agentes etiológicos detectados nas úlceras no estômago;
- Detectar os patógenos PCV2 e *H. pylori* nas amostras de estômagos de suínos através das técnicas de imunistoquímica (IHQ);
- Levantar a possibilidade de que um vírus, altamente freqüente na população suína mundial, ter contribuição direta na patogênese das ulcerações gástricas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Ulcerações Gástricas em Suínos

As ulcerações gástricas sempre ocorreram em suínos e seus primeiros relatos datam do final da década de 50 e início da década de 60 do século passado (O'Brien, 1986). A ulceração do quadrilátero esofágico (*pars oesophagea*), ou ulceração gástrica, é sem dúvida a mais comum e importante patologia observada nos estômagos suínos (Embaye et al., 1990; Friendship, 1999). Essa região do estômago suíno, revestida por um epitélio escamoso estratificado, é desprovida de células secretoras de muco e tampouco apresenta uma camada extracelular de muco, nem um mecanismo local produtor de bicarbonato necessário para neutralizar a acidez gástrica. As principais regiões do estômago suíno estão representadas na Figura 1 (Friendship, 1999). A incidência de casos de úlceras gástricas aumentou significativamente nos últimos anos devido à intensificação do sistema de produção, mudanças na dieta e condições de confinamento (Kowalczyk, 1969).

A etiologia das úlceras gástricas em suínos é considerada multifatorial (Tabela 1) e tem como principais responsáveis aspectos fisiológicos da espécie, componentes nutricionais e estruturais da dieta, microbiota residente e inúmeros fatores de manejo que contribuem, de alguma forma, para uma condição de estresse social dos animais, tais como o tipo e a frequência do arraçamento, superlotação, enfermidades, contaminação ambiental com poeira ou amônia, entre outros (Embaye et al., 1990; Friendship, 1999; Amory et al., 2006).

Em um recente trabalho, Krakowka et al. (2005) reproduziram ulcerações gástricas em suínos com a inoculação de *Helicobacter pylori* isolado previamente de animais com casos clínicos de ulceração. Nos últimos anos, com o surgimento da infecção pelo circovírus suíno 2, com as diversas síndromes e doenças associadas, a constatação clínica do aumento do

número de ulcerações gástricas foi levantada (Segalés, 2002; Barcellos & Driemeier - comunicação pessoal).

Tabela 1 - Fatores de risco relacionados com o desenvolvimento de ulcerações gástricas em suínos.

Nutrição	Manejo/instalações	Outros
Tamanho de partícula	Tipo de confinamento	Estação do ano
Tipo de grão	Tamanho do rebanho	Doenças intercorrentes
Moagem	Mistura de animais	Parição
<ul style="list-style-type: none"> • Peletizada • Martelo • Rolagem 	Superpopulação	Hereditariedade
Aquecimento	Manejo e transporte	Somatotropina - exógena
Ausência de fibra na dieta	Nutrição	Histamina
Deficiência de Vitamina E/Se	Tipo de piso	Infecção por ascarídeos
Rancificação da gordura		Infecção por <i>Helicobacter</i> sp.
Retirada da alimentação		Infecção por PCV2

Fonte: Friendship, 1999.

Animais de recria-terminação com idade entre três e seis meses são mais comumente afetados pelas ulcerações gástricas, porém suínos adultos também podem ser acometidos (Friendship, 1999). Em fêmeas de descarte foram encontradas prevalências entre 32 e 65% (Ayles et al., 1996). Em suínos de abate, as lesões gástricas podem ser verificadas em até 65% dos animais (Friendship, 1999).

O primeiro passo para um bom monitoramento é reconhecer os sinais clínicos das ulcerações gástricas. A perda de sangue para o trato gastrintestinal é o principal sinal clínico e normalmente cursa com anemia e melena (Figura 2). A anemia severa resulta na palidez, fraqueza e respiração acelerada. Há diminuição de volume fecal e as fezes são escuras, com consistência até levemente pastosa, fato esse que difere do quadro de hemorragias entéricas causadas por agentes infecciosos como *Lawsonia intracellularis* e *Brachyspira hyodysenteriae*, que sempre cursam com diarreia (Friendship, 2004). Suínos com ulcerações extensas e profundas podem parecer sadios se a hemorragia gástrica for mínima.

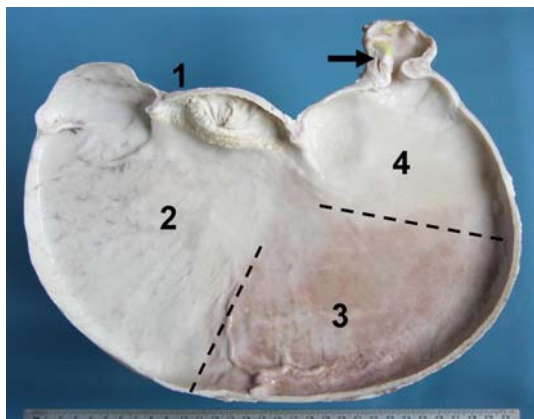


Figura 1 - Ulcerações gástricas em suínos. Estômago suíno normal fixado em formalina demonstrando as diferentes regiões internas. 1- Quadrilátero esofágico. 2- Mucosa glandular do cárdia. 3- Fundo. 4- Mucosa glandular do piloro. Seta - *Torus piloricus*.



Figura 2 - Ulcerações gástricas em suínos. Sinal clínico e achado de necropsia. Fezes escurecidas aderidas ao ânus e períneo.

Em lesões crônicas, quando a abertura do esôfago no estômago é parcialmente obstruída por tecido cicatricial, também chamada de estenose do cárdia (Figuras 3 e 4), os animais podem se alimentar e regurgitar logo em seguida. Esse processo costuma se repetir algumas vezes e estes animais, normalmente, têm um desenvolvimento retardado em comparação aos companheiros de baia (Friendship, 2004).



Figura 3 - Ulcerações gástricas em suínos. Estenose do cárdia devido à cicatrização de ulceração gastresofágica. Observe as pregas características (plissadas) da mucosa adjacente tecido cicatricial no quadrilátero esofágico.

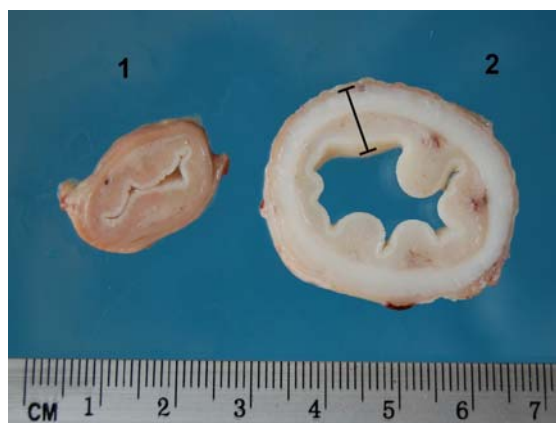


Figura 4 - Ulcerações gástricas em suínos. Esôfago de dois suínos de mesmo porte seccionados na altura da entrada do cárdia. Suíno 1 - Controle. Suíno 2 - Estenose do cárdia. Hipertrofia das camadas musculares e dilatação da luz.

Freqüentemente, a perda de sangue é tão acentuada e aguda que os animais são encontrados mortos sem prévia visualização de sinais clínicos (Friendship, 2004). A patogenia das ulcerações gástricas ainda não é totalmente conhecida. Elas ocorrem principalmente na região do quadrilátero esofágico, enquanto que as ulcerações da região fúndica e pilórica são raras e normalmente associadas com infecções sistêmicas (Dufresne, 1998). O quadrilátero esofágico é exposto a uma nova ingesta com pH aproximado de 5,0. Diferentemente do resto do estômago, esta porção não é protegida por uma camada fina de muco e bicarbonato. Enquanto a diferença de pH é mantida entre as regiões esofágica e pilórica, estômago é desprovido de lesões. No entanto, quando ocorre a mistura do conteúdo estomacal e o gradiente (ou diferença) do pH não é mantido, existe um aumento da exposição do quadrilátero esofágico ao material ácido, enquanto a região pilórica é exposta a um conteúdo relativamente mais básico. A região pilórica, uma vez exposta a uma ingesta mais alcalina, tentará compensar este desequilíbrio com uma maior produção de ácido. Este mecanismo de compensação expõe o quadrilátero esofágico a um alto nível de acidez, resultando na hiperqueratose e erosão que, subseqüentemente, pode se tornar uma úlcera gástrica extensa. Esta patogenia já foi descrita por diversos autores (O'Brien, 1986; Embaye et al., 1990; Krakowka et al., 1995; Argenzio & Eisemann, 1996).

Todos os fatores que contribuem para uma mistura irregular do conteúdo estomacal e perda do gradiente do pH aumentam o risco do surgimento de ulcerações gástricas (Dufresne, 1999). Qualquer condição que curse com um período relativamente longo de anorexia pode ocasionar mortalidades por hemorragia intragástrica ou aumento da intensidade das ulcerações gástricas situadas no epitélio aglandular (Straw et al., 1992).

O manejo alimentar e a composição da dieta são fatores de risco já bem documentados para o surgimento de ulcerações gástricas. Rações com alta porcentagem de partículas finas (menores que 500 μ m) promovem homogeneização mais rápida e menor tempo de

permanência do bolo alimentar no estômago. Possivelmente o gradiente de pH entre a *pars oesophagea* e a região pilórica desaparece, permitindo assim o contato do ácido e enzimas com o epitélio desprotegido e sensível do quadrilátero esofágico (Maxwell et al., 1970).

A ração peletizada promove lesões ulcerativas mais facilmente que rações fareladas e, em boa parte, isso se deve ao fato de que para formar um pellet de qualidade é necessário que a moagem inicial dos grãos utilizados seja fina (Griffing, 1963; Potkins et al., 1989a). A utilização do calor na fabricação da ração peletizada, atingindo aproximadamente a temperatura de 80°C, provavelmente promove a gelatinização do amido e contribui para a formação de úlceras (Friendship, 1999).

A aveia e a cevada são consideradas menos ulcerogênicas do que o milho e o trigo e isso, em parte, pode ser explicado pela composição destes cereais (Reese et al., 1966; Smith & Edwards, 1996). A adição de fibra vegetal bruta na dieta de suínos alimentados com ração finamente moída mostrou ser eficaz na diminuição do desenvolvimento de lesões gástricas. A porção fibrosa da dieta serviria como uma barreira física contra a acidez do conteúdo finamente granulado do bolo alimentar, prevenindo a ulceração do quadrilátero esofágico (Potkins et al., 1989b).

A presença ou produção de ácidos graxos de cadeia curta também teria uma contribuição considerável na formação de úlceras gástricas. Interrupções e quebras no manejo alimentar influenciam diretamente o desenvolvimento de úlceras. Problemas com o fluxo de ração no cocho, interrupção no fornecimento de água, competição e hierarquização na hora da alimentação, doenças e calor excessivo associado com um padrão irregular de fornecimento de ração contribuem negativamente para a manutenção da integridade do quadrilátero esofágico (Friendship 1999). Segundo o resultado estatístico de Amory et al. (2006), a ração peletizada teve uma menor relevância do que o piso ripado no desenvolvimento e predisposição às úlceras gástricas. Foi também descrita a associação de ulcerações com a

deficiência de Vitamina E e Selênio e a utilização de gordura rancificada, aumentando tanto a formação de peróxidos como a produção de ácido clorídrico (Nafstad et al., 1967; Van Vleet et al., 1970). Outro agente infeccioso encontrado em associação com úlceras gástricas tem sido o circovírus (PCV2) detectado através da técnica de PCR e imunistoquímica, inclusive dentro de células do interior de glândulas gástricas (Pastor et al., 1998; Pérez-Martín et al., 2007).

Suíños criados em um ambiente socialmente enriquecido não apresentaram nenhum caso de ulcerações gástricas. Já o grupo controle, criado em condições padrões de confinamento, com o piso parcialmente ripado, teve uma prevalência de 17.5 % de ulcerações gástricas (Ramis et al., 2005). A utilização de diversas formulações contendo antiácidos tem sido geralmente ineficaz na prevenção do desenvolvimento e na redução de mortes causadas pelas ulcerações gástricas (Friendship & Deen, 1997).

Em trabalhos anteriores realizados aqui no Brasil, índices de 11.8% de ulcerações gástricas foram observados em sinos de abatedouro (Bivin et al, 1974).

2.2. Circovirose Suína¹

No início desta década, a entrada do PCV2 no Brasil desencadeou epidemias graves em muitas granjas produtoras, causando grande mortalidade e, segundo o relato de clínicos especializados em suínos, o número de casos de ulcerações gástricas concomitantemente aumentou (Barcellos & Driemeier - comunicação pessoal).

A circovirose suína, através das suas diversas formas de manifestação clínica, como a síndrome do definhamento progressivo pós-desmame suíno, a síndrome dermatite nefropatia suína, problemas reprodutivos, problemas do complexo respiratório suíno, entre outros, é sempre associada com a infecção pelo PCV2 (Allan & Ellis, 2000; Segalés & Domingo, 2002; Kim et al., 2003; Clark et al., 2004). Dentre elas, a síndrome do definhamento progressivo pós-desmame suíno causa grandes prejuízos para a suinocultura mundial. A doença é caracterizada pelo definhamento², palidez e dispnéia associadas com linfadenomegalia, pneumonia intersticial e nefrite (Allan et al., 1998; Clark et al., 2004).

A depleção linfóide e o infiltrado linfoistiocitário e/ou granulomatoso encontrado nos tecidos linfóides e em outros órgãos são as principais lesões histológicas encontradas (Segalés et al., 2004; Clark et al., 2004). Em alguns casos é possível a visualização de numerosos corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos nos tecidos linfóides como linfonodos, baço e tonsilas. Outros tecidos como o pâncreas, mucosas gástricas e intestinais, coração, fígado, glândulas adrenais, glândulas salivares e medula óssea podem apresentar focos de infiltrado inflamatório linfoistiocitário, porém em menor intensidade e extensão que nos órgãos linfóides (Segalés, 2005).

¹ O autor prefere aqui convencionar o termo circovirose suína como a doença oriunda da infecção dos animais pelo PCV2, manifestada clinicamente em umas das formas das infecções descritas para o PCV2 na espécie suína.

² É interessante aqui fazer uma diferenciação entre o termo definhamento e refugagem. O termo refugo é correntemente utilizado na suinocultura brasileira para aquele leitão que nunca acompanhou o desempenho normal da sua leitegada. Já o animal que sofre de definhamento chegou a ter o seu crescimento normal, porém ao ser acometido por uma doença qualquer, perde peso acentuadamente.

A ulceração gástrica tem sido relatada freqüentemente em casos da síndrome do definhamento progressivo (Segalés, 2002), no entanto não foi estabelecida uma relação direta entre a infecção pelo PCV2 e o desenvolvimento das úlceras (Segalés, 2005). Dentre todos os achados patológicos freqüentemente encontrados em animais infectados com o PCV2 listados por Segalés 2002, as ulcerações gástricas do quadrilátero esofágico figuraram em 28,6% dos casos.

2.3. Infecção por *Helicobacter pylori*

Assim como ocorre no estômago de humanos, a colonização do estômago de suínos por organismos do tipo *Helicobacter* sp. em suínos está sendo relacionada com o desenvolvimento de lesões gástricas (Krakowka et al., 2005).

Helicobacter pylori coloniza o estômago humano e causa gastrite crônica, úlcera péptica, câncer gástrico e linfoma nos tecidos linfóides associados às mucosas (Suerbaum & Michetti, 2002). Estudos epidemiológicos em humanos sugerem que *H. pylori* é transmitido verticalmente entre famílias e não apresenta caráter epidêmico. É provavelmente adquirido na infância e acompanha os hospedeiros humanos por décadas durante a vida, freqüentemente sem sintomas exceto pela inflamação crônica da mucosa gástrica (Josenhans et al., 2007).

Em suínos infectados com *H. pylori*, hiperplasia dos tecidos linfóides da mucosa gástrica e edema de submucosa, principalmente na curvatura menor e no antro tem sido um achado de necropsia (Krakowka & Ellis, 2006). Este organismo pode ser detectado na mucosa glandular do estômago através de técnicas histológicas com coloração de prata e técnica imunoistoquímica, utilizando-se anticorpo policlonal anti-*Helicobacter pylori* (Krakowka et al., 2005). Um teste rápido de seleção pode ser realizado com indicadores de pH, considerando que bactérias do tipo *Helicobacter* degradam uréia em amônia, produzindo mudanças de coloração no meio (Melnichouk et al., 1999).

O exame histológico do estômago demonstra múltiplos folículos linfóides distribuídos na mucosa gástrica. Inflamação com infiltrado linfocítico na lâmina própria acompanha a hiperplasia folicular.

É importante salientar que nenhum *Helicobacter* spp. adere ao epitélio escamoso estratificado intacto e que o estudo de Krakowka & Ellis (2006) indica uma forte associação entre a colonização de *H. pylori* na mucosa gástrica e a formação de úlcera gástrica.

Aspectos adicionais devem ser estudados para comprovar a real participação desta bactéria na gênese das ulcerações gástricas em suínos (Corrêa et al., 2007).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta das amostras

Os estômagos foram coletados durante a necropsia de suínos, realizadas em conjunto pelo Setor de Patologia Veterinária e Setor de Suínos da FAVET-UFRGS. Os animais normalmente estavam em estágio terminal de doença debilitante e eram encaminhados à necropsia para fins diagnósticos ou coleta de material biológico para a confecção de vacina autógena contra *Circovirus*. As idades dos suínos necropsiados eram variadas, com predomínio de animais jovens (3-5 meses). Uma avaliação resumida da condição clinicopatológica do animal foi realizada, e anotadas as principais alterações sistêmicas. A eutanásia dos suínos foi feita com atordoamento elétrico com posterior sangria dos grandes vasos do pescoço.

O estômago foi retirado inteiro, juntamente com o linfonodo gástrico aderido a curvatura menor. Após abertos pela curvatura maior, os estômagos foram lavados, identificados e fotografados antes de serem imersos inteiramente em solução de formol tamponado a 10% por 24-48 horas. Estômagos sem lesões também foram coletados como possíveis controles.

Na avaliação macroscópica foi observada a integridade da porção do quadrilátero esofágico (graduando-se as lesões ulcerativas de 0 a 3; sendo grau 0 atribuído a ausência de lesão, 1 para lesões leves, 2 para lesões moderadas e 3 para lesões acentuadas). O grau de hiperqueratose foi estimado através da observação da porção queratinizada ou seu resquício, sendo também graduada de 0-3 quanto à intensidade da reação.

Para análise histológica, foram colhidas secções do cárdia (transição da porção não-glandular e glandular do cárdia ou transição do quadrilátero esofágico com a mucosa

glandular), piloro (fragmentos alocados no bloco 1), fundo e fragmento do linfonodo gástrico (alocados no bloco 2). Após processados, cortes seriados de 4 µm de cada bloco foram feitos e colocados em lâminas com albumina para coloração de HE e colorações especiais e em lâminas de Poli-L-lizine (anexo I) para a realização da técnica de IHQ.

Colorações de HE e técnica de IHQ anti-PCV2 foram realizadas em todos os blocos. Técnica de IHQ anti-*Helicobacter pylori* foi realizada somente no bloco 1. Colorações especiais de Azul Alciano, PAS e Warthin-Starry foram feitas em casos selecionados.

3.2. Técnica de imunoistoquímica

Foi realizada a técnica adaptada de Sorden et al, (1999). Após serem secados a 60°C por no mínimo 12 horas, os cortes foram desparafinados, hidratados e tratados com 3% de peróxido de hidrogênio em água destilada por 20 minutos (bloqueio da peroxidase endógena), lavados em água destilada por dois minutos, tratados com protease (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) a 0,005% por 15 minutos em câmara úmida e temperatura ambiente e lavados com água destilada por 2 minutos em temperatura ambiente.

Para a diminuição das ligações inespecíficas, os cortes foram tratados com leite desnatado na diluição de 5% por vinte minutos e lavados por 2 minutos em água destilada. Após, acrescentou-se o anticorpo policlonal anti-PCV2 (Sorden et al., 1999) a 37°C por 45 minutos na diluição de 1:1000 em câmara úmida.

Posteriormente, foram lavados em água destilada por dois minutos e tratados com anticorpo secundário biotilado (DAKO LSAB 2 kit, DAKO Corp., Carpinteria, CA) por 15 minutos, lavados e tratados com o conjugado streptavidina-peroxidase (DAKO) por mais quinze minutos, lavados novamente e submetidos ao cromógeno DAB (diaminobenzidina) (DAKO) por 5-10 minutos.

Os cortes foram lavados e contra-corados com hematoxilina por 5-10 segundos. As lâminas foram lavadas em água destilada, desidratadas, clarificadas em xilol e montadas com bálsamo sintético.

A técnica de IHQ para detecção de *Helicobacter pylori* foi a mesma utilizada para o PCV, com diferenças apenas no tipo, na diluição e no tempo de incubação do anticorpo primário e no tipo de cromógeno. A diluição do anticorpo anti-*Helicobacter pylori* (Rabbit anti-*H. pylori* antibody, DakoCytomation Inc, Carpinteria, Califórnia – USA) foi de 1:200. A incubação ocorreu por duas horas a 37°C. Como cromógeno foi utilizado o Vector NovaRED® Substrate Kit for Peroxidase (Vector Laboratories) por 5 a 10 minutos.

4. RESULTADOS

No período de março de 2006 a outubro de 2007 foram realizadas necropsias em grupos de suínos, das fases de crescimento/terminação e coletado material para a análise do presente estudo. Os suínos eram provenientes de granjas com diagnóstico prévio de infecção natural por PCV2. Nas granjas de origem, havia histórico de mortes súbitas, anemia e ulcerações gástricas.

Os principais sinais clínicos observados em suínos com úlceras foram apatia, palidez de mucosas, má condição corporal e fezes escuras. No momento da sangria era evidente a cor vermelha clara “aguada” do sangue (“vinho rose”) dos suínos com ulcerações gástricas hemorrágicas. No momento da coagulação do sangue destes suínos em tubos sem aditivos, era visível a pouca quantidade de coágulo cruórico formado (Figura 5). Nestes casos, a inspeção visual da carcaça e do trato gastrointestinal revelava a possível ulceração hemorrágica do estômago, pois a carcaça se apresentava pálida e o trato gastrointestinal indicava a coloração escura de seu conteúdo, principalmente quando da distensão das alças e estômago (Figura 6)

Nas ulcerações acentuadas era observado, antes da abertura da curvatura menor, o edema adjacente à região do cárdia, podendo-se palpar, na maioria das vezes, as margens fibrosadas do quadrilátero esofágico lesado com total ausência de epitélio queratinizado. O conteúdo variou de grumoso escuro levemente líquido, até a presença de um único coágulo cruórico de tamanho proporcional à luz do estômago em questão (Figura 7).

Em alguns casos, observou-se acentuação do padrão lobular hepático, resultantes da hipóxia tecidual decorrente da anemia (Figura 8).

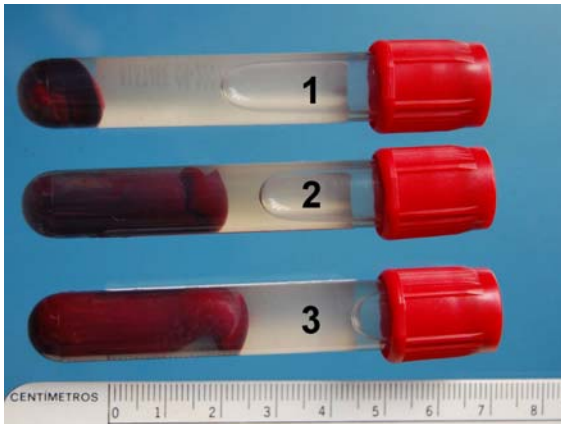


Figura 5 - Ulcerações gástricas em suínos. Sangue coagulado, com formação de coágulo cruórico. Tubo 1 - suíno com úlcera hemorrágica. Tubos 2 e 3 - Suínos controles. Observe o hematócrito diminuído no suíno afetado, quando comparado aos controles, devido à anemia provocada pela hemorragia na úlcera gástrica.



Figura 6 - Ulcerações gástricas em suínos. Observe o conteúdo gastrointestinal escuro, a palidez da carcaça e acentuação do padrão lobular hepático em um suíno com úlcera gastresofágica hemorrágica.



Figura 7 - Ulcerações gástricas em suínos. Ulceração acentuada do quadrilátero esofágico com ausência de epitélio queratinizado e grande quantidade de tecido de granulação. Conteúdo escuro grumoso (sangue) com milho particulado.

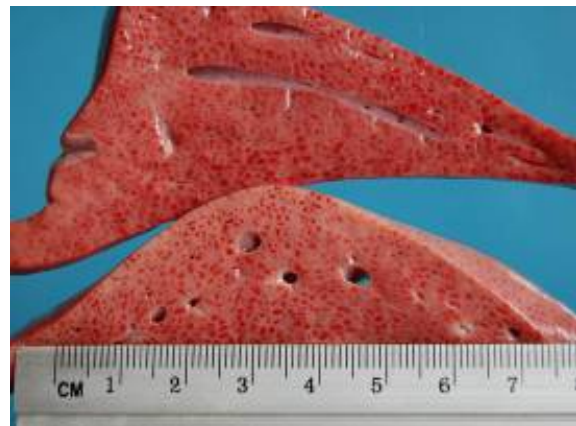


Figura 8 - Ulcerações gástricas em suínos. Superfície de corte do fígado mostrando acentuação do padrão lobular em casos de ulceração gastresofágica hemorrágica com anemia intensa.

Dentre os 63 estômagos processados, 30 não apresentavam ulcerações no quadrilátero, sendo que 12 deles não apresentavam algum tipo de marcação anti-PCV2 no estômago, porém apenas quatro desses não apresentavam marcação anti-PCV2 em qualquer dos tecidos testados.

Do total, tiveram marcação positiva anti-PCV2 em linfonodos 56 animais, sendo que em 28 destes houve reação positiva para PCV2 no tecido estomacal, local este não comumente descrito para a infecção viral (Figuras 9 e 10).

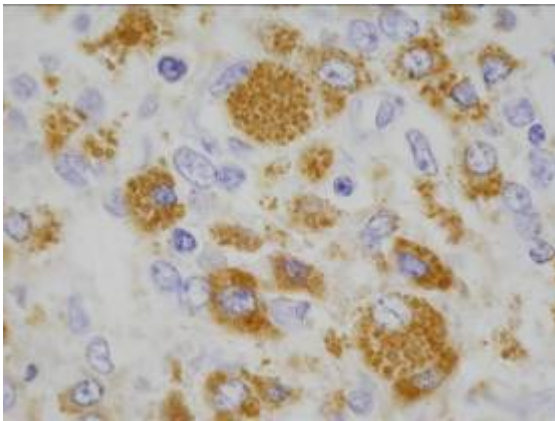


Figura 9 - Ulcerações gástricas em suínos. Marcação anti-PCV2 acentuada principalmente no citoplasma de histiócitos dos linfonodos gástricos. IHQ com DAB, obj 100x.

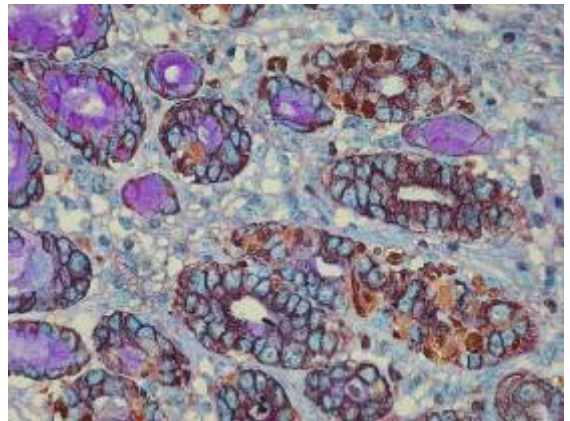


Figura 10 - Ulceração gastresofágica em suínos. Marcação anti-PCV2 no citoplasma das células das glândulas gástricas. IHQ com DAB, obj 40x

Em 27 estômagos foi observada a presença de *Helicobacter pylori* no muco superficial e nas fossetas gástricas através da técnica de IHQ. Em 20 casos, *Candida* sp. foi encontrada na porção do quadrilátero esofágico (figs 11 e 12).



Figura 11 - Ulcerações gástricas em suínos. Pseudomembranas brancas recobrem a área ulcerada da porção do quadrilátero esofágico.

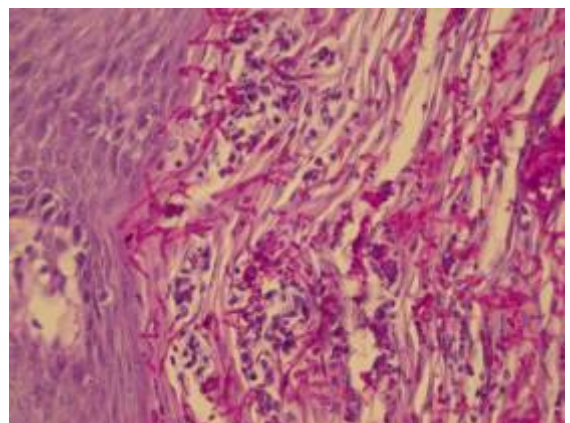


Figura 12 - Ulcerações gástricas em suínos. Coloração de PAS evidenciando leveduras e pseudo-hifas de *Candida* sp. na superfície do epitélio queratinizado do quadrilátero esofágico, obj 40x.

As principais alterações patológicas e marcação no estudo dos estômagos estão nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Resultados das análises patológicas dos 63 estômagos suínos analisados pelo SPV.

Nº	Macroscopia		Imunoistoquímica						Microscopia			
	Ulceração 0-3	Queratose 0-3	IHQ linfonodo para PCV2 0-1	IHQ <i>H.pylori</i> 0-1	IHQ nas glândulas 0-3	IHQ na queratina 0-3	IHQ no estômago PD 0-3	PCV2 no estômago IHQ 0-3	<i>Candida albicans</i> 0-1	Grau de infiltrado mononuclear 0-3	Abscesso nas glândulas 0-1	Células gigantes 0-1
01	1	2	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0
02	1	3	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
03	0	3	1	1	0	0	0	0	0	2	0	1
04	3	3	1	0	0	0	0	0	1	2	0	0
05	2	3	1	0	0	0	0	0	0	2	1	0
06	2	3	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
07	0	3	3	0	0	0	3	1	0	3	1	0
08	1	3	2	1	0	0	1	1	1	1	1	0
09	1	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1	3	2	0	0	0	1	2	0	1	0	1
11	0	3	2	0	1	0	3	2	0	3	0	1
12	0	* ³	3	0	3	*	3	2	*	1	1	1
13	2	3	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0
14	1	3	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
15	2	3	2	0	2	2	3	3	0	2	1	0
16	0	3	3	0	0	0	2	1	0	2	1	1
17	0	3	3	0	1	1	3	2	0	2	1	1
18	3	3	3	0	0	0	1	1	1	2	0	1
19	2	3	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0
20	3	*	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0
21	0	3	2	0	1	1	3	1	1	2	1	1
22	0	3	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
23	3	3	1	1	0	0	0	0	0	2	0	1
24	0	3	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1
25	0	2	1	0	0	0	1	0	1	3	1	1
26	3	*	1	1	0	*	1	1	0	2	0	1
27	1	3	2	1	2	1	2	2	1	2	1	0
28	0	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
29	3	*	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
30	1	3	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
31	0	3	2	1	1	0	1	1	1	2	0	0
32	3	3	2	1	1	0	0	2	1	1	1	0
33	0	3	1	0	1	1	1	1	1	2	1	1

³ O asterisco (*) na tabela representa a ausência de epitélio queratinizado ou pela ausência do tecido nos casos de úlceras extensas ou por artefato de histologia.

34	3	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	0	3	1	0	3	1	1	3	0	2	1	0
36	2	3	1	0	0	0	0	1	1	2	1	0
37		3	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
38	3	3	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
39	0	2	3	0	0	1	1	1	1	2	0	1
40	1	2	1	1	0	0	0	0	1	3	1	0
41	1	3	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
42	0	3	3	0	1	1	1	1	1	1	0	1
43	1	3	2	1	0	0	1	1	0	2	0	0
44	0	1	3	1	2	2	2	2	0	2	0	1
45	0	3	1	0	0	1	0	0	0	2	0	0
46	0	2	1	1	0	0	1	1	1	2	1	0
47	0	2	2	0	0	0	0	0	0	2	1	0
48	0	3	1	0	0	0	0	0	0	2	1	0
49	2	2	1	1	0	0	0	0	0	3	1	0
50	0	2	1	0	0	0	1	1	0	3	1	0
51	1	3	1	1	0	0	0	1	0	2	0	0
52	1	3	3	1	0	0	0	0	0	3	1	0
53	0	2	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
54	0	2	3	0	3	2	2	2	0	3	1	0
55	0	3	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
56	1	3	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
57	0	3	3	1	1	1	2	2	0	2	1	1
58	0	3	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
59	0	3	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0
60	0	3	1	1	0	0	0	0	0	2	1	0
61	1	3	2	0	1	0	0	2	0	3	1	0
62	3	*	1	1	0	*	0	0	*	2	1	0
63	0	3	1	0	0	0	0	0	1	2	0	0

Tabela 3 - Resultados imunoistoquímicos contra PCV2 e *H. pylori* e resultados histológicos para a presença de *Candida* sp. relacionados com o grau de ulceração.

Grau de ulceração	IHQ PCV2 Linfonodo	IHQ PCV2 Estômago	IHQ <i>H. pylori</i>	Presença <i>Cândida</i> sp.
0	28/30	15/30	08/30	10/30
1	13/15	06/15	11/15	04/15
2	06/07	01/07	01/07	02/07
3	09/10	04/10	06/10	04/09

A marcação positiva anti-PCV2 na mucosa gástrica foi mais intensa e evidente na região das glândulas pilóricas e do cárdia e esta atingia uma profundidade maior nas fossetas (Figuras 13 e 14). Já na porção do fundo não foi comumente observada marcação IHQ-anti PCV2 de intensidade forte, e quando presente limitava-se às porções superiores das fossetas gástricas.

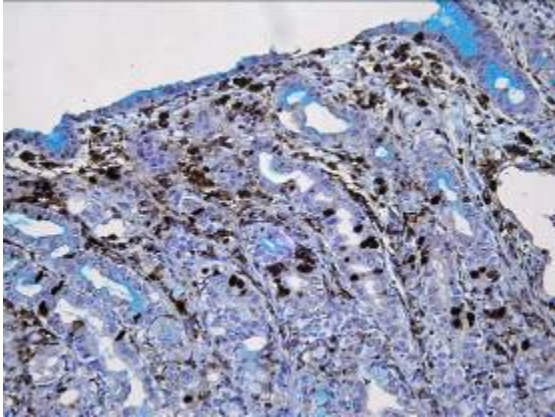


Figura 13 - Ulcerações gástricas em suínos. Marcação positiva para anti-PCV2 no citoplasma das glândulas gástricas. Diminuição da produção e secreção de muco na superfície da mucosa gástrica. IHQ com DAB + Azul Alciano + Hematoxilina, obj 20x.

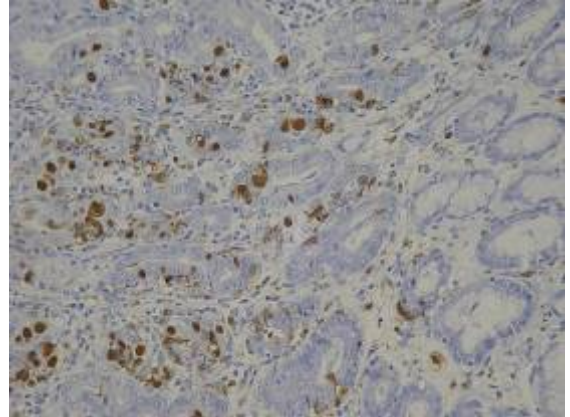


Figura 14 - Ulcerações gástricas em suínos. Marcação positiva anti-PCV2 no citoplasma das células das glândulas gástricas. IHQ com DAB, obj 20x.

Helicobacter pylori foi observado tanto na mucosa da região do piloro, como na mucosa da região do cárdia (Figuras 15 e 16).

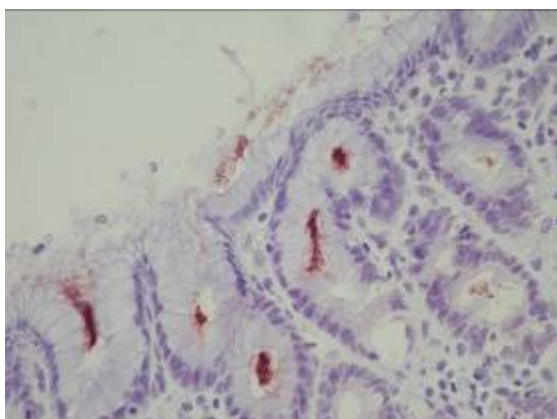


Figura 15 - Ulcerações gástricas em suínos. Marcação positiva Vector NovaRED positiva anti-*H. pylori* com múltiplos agregados de *H. pylori* no muco superficial e nas fossetas gástricas na altura do piloro. IHQ, obj 40x.

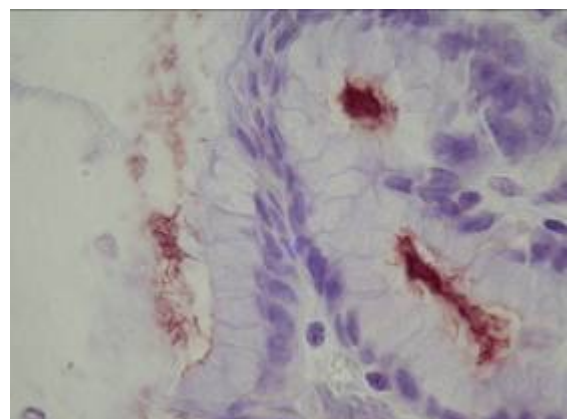


Figura 16 - Ulcerações gástricas em suínos.. Marcação IHQ Vector NovaRED positiva anti-*H. pylori* na superfície da mucosa gástrica na altura do piloro. Presença de bactérias *Helicobacter pylori* no muco superficial e nas fossetas gástricas, obj 100x.

O infiltrado mononuclear na mucosa foi um componente presente em graus variáveis em todos os estômagos analisados (Figuras 17 e 18).

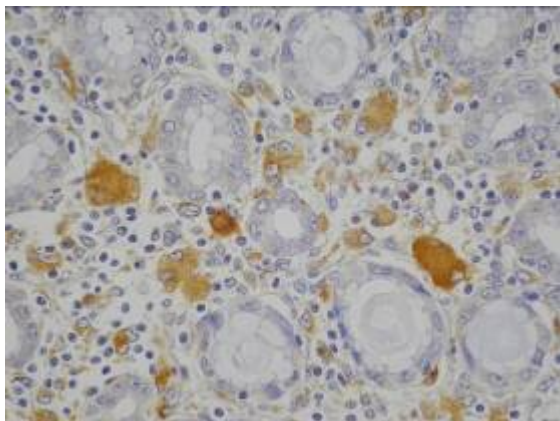


Figura 17 - Ulcerações gástricas em suínos. Células gigantes e histiócitos com marcação IHQ com DAB anti-PCV2 positiva expandindo a lâmina própria da mucosa gástrica, obj 40x.

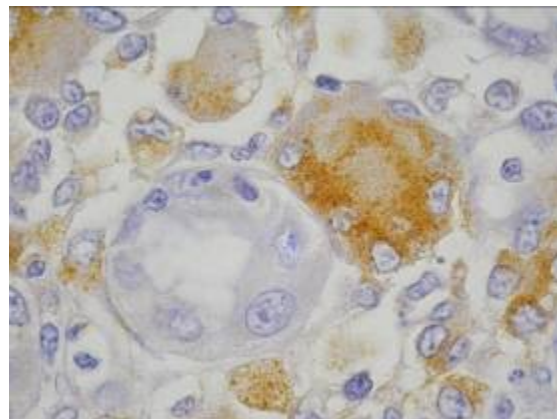


Figura 18 - Ulcerações gástricas em suínos. Célula gigante associada a glândula gástrica na lâmina própria. IHQ com DAB, obj 100x.

As marcações anti-PCV2 foram verificadas no estômago, dentro dos agregados linfóides, glândulas, histiócitos e em raros casos na queratina. A presença de células gigantes em 17 dos casos indica uma infecção relativamente crônica pelo PCV2 e desconhecemos, até então, na rotina a presença de outros agentes que recrute tal tipo de infiltrado na mucosa estomacal em suínos. Necrose das células epiteliais da glândulas gástricas, foram associadas com fortes marcações anti-PCV2 tanto nas células viáveis como nos restos necróticos presentes no seu lúmen (Figuras 19 e 20). Marcação positiva para PCV2 também foi observada no parênquima dos linfonodos.

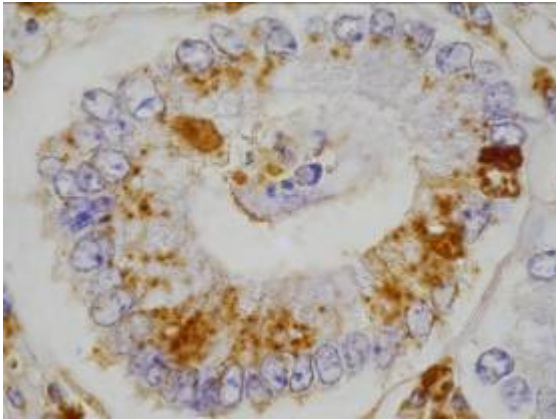


Figura 19 – Ulcerações gástricas em suínos. Marcação IHQ anti-PCV2 no citoplasma e núcleo das células das glândulas gástricas. Restos necróticos no lúmen. IHQ com DAB obj 100x.

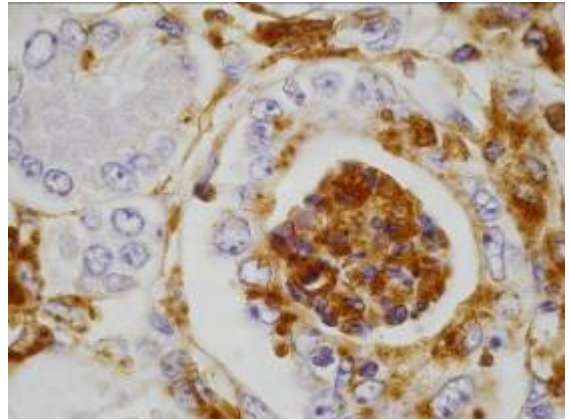


Figura 20 – Ulcerações gástricas em suínos. Marcação IHQ anti-PCV2 no citoplasma e núcleos das células das glândulas gástricas e nos debris necróticos do lúmen. IHQ com DAB obj 100x.

5. ARTIGO I

Cópia do original do trabalho publicado na Acta Scientiae Veterinariae
ISSN 1679-9216



Úlceras gástricas em suínos

André Mendes Ribeiro Corrêa^{1*}, Adriana da Silva Santos¹, Fábio de Souza Guagnini¹, Paulo Mota Bandarra¹, Saulo Petinatti Pavarini¹, David Driemeier¹, David Emílio Santos Neves de Barcellos²

¹Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Setor de Patologia Veterinária.

²Departamento de Medicina Animal, Setor de Suínos.

*Autor para correspondência: amrcorrea@hotmail.com

Faculdade de Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Avenida Bento Gonçalves, nº 9090, CEP 91540-000 Porto Alegre RS, Brasil.

1 – INTRODUÇÃO

A ulceração do quadrilátero esofágico (*pars oesophagea*), ou ulceração gastroesofágica, é sem dúvida alguma a mais comum e importante patologia observada nos estômagos suínos (EMBAYE *et al.*, 1990; FRIENDSHIP 1999). A incidência de casos de ulcerações da porção esofágica aumentou muito nos últimos anos com a intensificação do sistema de produção, mudanças na dieta e condições de confinamento (KOWALCZYK 1969). Essa região do estômago suíno, revestida por um epitélio escamoso estratificado, é desprovida de células secretoras de muco e tampouco apresenta uma camada extracelular de muco, nem um mecanismo local produtor de bicarbonato necessário para neutralizar a acidez gástrica (FRIENDSHIP 1999).

A etiologia da ulceração gastroesofágica é considerada multifatorial e tem como principais responsáveis aspectos fisiológicos da espécie, componentes nutricionais e estruturais da dieta, microbiota residente e inúmeros fatores de manejo que contribuem de alguma forma para uma condição de estresse social aos animais, tais como o tipo e a frequência do arraçamento, superlotação, enfermidades, contaminação ambiental com poeira ou amônia, entre outros (EMBAYE *et al.*, 1990; FRIENDSHIP, 1999; AMORY *et al.*, 2006).

Em um recente trabalho, Krakowka *et al.*, (2005), reproduziram ulcerações gastroesofágicas em suínos com bactérias do gênero de *Helicobacter pylori*-like isoladas previamente de animais com casos clínicos de ulceração. Nos últimos anos, com o surgimento da infecção pelo circovírus suíno 2, síndromes e doenças associadas, a constatação clínica do aumento do número de casos clínicos e patológicos de ulceração do quadrilátero esofágico teve um aumento significativo (SEGALÉS, 2002; BARCELLOS & DRIEMEIER, 2003). O objetivo deste trabalho é de fazer uma breve revisão sobre os aspectos clínico-patológicos dos casos de ulcerações gastroesofágicas em suínos.

2 – DESENVOLVIMENTO

Animais de recria-terminação com idade entre três e seis meses são mais comumente afetados pela ulceração, porém suínos adultos também podem ser acometidos (FRIENDSHIP, 1999). Em fêmeas de descarte foram encontradas prevalências entre 32 a 65%, sendo que em 15% destes casos apresentava algum grau de ulceração (AYLES *et al.*, 1996). Em suínos de abate as lesões gástricas podem ser verificadas em até 65% dos animais (FRIENDSHIP, 1999).

O primeiro passo para um bom monitoramento é reconhecer os sinais clínicos de ulceração gástrica. A perda sangue para o trato gastrointestinal, principal sinal clínico, normalmente cursa com anemia e melena. A anemia severa resulta na palidez, fraqueza e respiração acelerada do animal afetado. Há diminuição de volume fecal e as fezes são escuras, com consistência até levemente pastosa, fato esse que difere do quadro de hemorragias entéricas causadas por agentes infecciosos como *Lawsonia intracellularis* e *Brachyspira hyodysenteriae*, que sempre cursam com quadros de diarreia (FRIENDSHIP, 2004).

Suínos com ulcerações extensas e profundas podem parecer saudáveis se a hemorragia gástrica for mínima. Quando a abertura do esôfago no estômago é parcialmente obstruída pelo tecido cicatricial, os animais podem ser

vistos comendo e vomitando logo em seguida. Esse processo costuma se repetir algumas vezes e estes animais normalmente tem um desenvolvimento retardado em comparação aos companheiros de baia (FRIENDSHIP, 2004). Frequentemente, a perda de sangue é tão acentuada e aguda que os animais são encontrados mortos sem prévia visualização de sinais clínicos (Friendship 2004).

A patogenia das ulcerações gástricas ainda não é totalmente conhecida. Elas ocorrem principalmente na região do quadrilátero esofágico, enquanto que as ulcerações da região fúndica e pilórica são raras e normalmente associadas com infecções sistêmicas (DUFRESNE, 1998).

O quadrilátero esofágico é exposto a uma nova ingesta com pH aproximado de 5.0. Diferentemente do resto do estômago, esta porção não é protegida por uma camada fina de muco e bicarbonato. Enquanto a diferença de pH é mantida entre as regiões esofágica e pilórica o estômago não desenvolve lesões. No entanto, quando ocorre a mistura do conteúdo estomacal e o gradiente (ou diferença) do pH não é mantido, existe um aumento da exposição do quadrilátero esofágico ao material ácido, enquanto a região pilórica é exposta a um conteúdo relativamente mais básico. A região pilórica, uma vez exposta a uma ingesta mais alcalina, tentará compensar este desequilíbrio com uma maior produção de ácido. Este mecanismo de compensação expõe o quadrilátero esofágico a um alto nível de acidez, resultando na hiperqueratose e erosão que, subsequentemente, pode se tornar uma ulceração extensa. Todos os fatores que contribuem para uma mistura irregular do conteúdo estomacal e perda do gradiente do pH aumentam o risco do surgimento de ulcerações gástricas (DUFRESNE, 1999). Qualquer condição que curse um período relativamente longo de anorexia pode ocasionar mortalidades por hemorragia intragástrica ou aumento da intensidade das lesões gastroesofágicas situadas na mucosa não glandular (STRAW *et al.*, 1992).

O manejo alimentar e a composição da dieta são fatores de risco já bem documentados para o surgimento de ulcerações gástricas. Rações com alta porcentagem de partículas finas (menores que 500 μ) promovem uma homogeneização e menor tempo de permanência do bolo alimentar no estômago. Possivelmente o gradiente de pH entre a *pars oesophagea* e a região pilórica desaparece permitindo assim o contato do ácido e enzimas com o epitélio desprotegido e sensível do quadrilátero esofágico (MAXWELL *et al.*, 1970).

A ração peletizada promove lesões ulcerativas mais facilmente que rações fareladas e, em boa parte, isso se deve ao fato de que para formar um pellet de qualidade é necessário que a moagem inicial dos grãos utilizados seja fina (GRIFFING, 1963; POTKINS *et al.*, 1989b). A utilização do calor na fabricação da ração peletizada, atingindo aproximadamente a temperatura de 80°C, provavelmente promove a gelatinização do amido e contribui para a formação de úlceras (FRIENDSHIP, 1999). A aveia e a cevada são consideradas menos ulcerogênicas do que o milho e o trigo e isso em parte pode ser explicado pela composição destes cereais (REESE *et al.*, 1966; SMITH & EDWARDS 1996). A adição de fibra vegetal bruta na dieta de suínos alimentados com ração finamente moída mostrou ser eficaz na diminuição do desenvolvimento de lesões gástricas. A porção fibrosa da dieta serviria como uma barreira física contra a acidez do conteúdo finamente granulado do bolo alimentar, prevenindo a ulceração do quadrilátero esofágico (POTKINS *et al.*, 1989a). A presença ou produção de ácidos graxos de cadeia curta também teria uma contribuição considerável na formação de lesões ulcerativas.

Interrupções e quebras no manejo alimentar influenciam diretamente o desenvolvimento de úlceras. Problemas com o fluxo de ração no cocho, interrupção no fornecimento de água, competição e hierarquização na hora da alimentação, doenças e calor excessivo associado com um padrão irregular de fornecimento de ração contribuem negativamente para a manutenção da integridade do quadrilátero esofágico (FRIENDSHIP, 1999). Segundo o resultado estatístico do trabalho de Amory e colaboradores (2006), a ração peletizada teve uma menor relevância do que o piso ripado no desenvolvimento e predisposição às úlceras gástricas.

Foi também descrita a associação de ulcerações com a deficiência de Vitamina E e Selênio e a utilização de gordura rancificada, aumentando tanto a formação de peróxidos como a produção de ácido clorídrico (VAN VLEET *et al.*, 1970; NAFSTAD *et al.*, 1967).

Assim como na medicina humana, a colonização do estômago por organismos do gênero *Helicobacter* está atualmente sendo mais aceita e relacionada com o desenvolvimento de lesões gástricas. Este organismo pode ser detectado na mucosa glandular do estômago através de técnicas histológicas com coloração de prata e técnica imunoistoquímica, utilizando-se anticorpo policlonal anti-*Helicobacter pylori* (KRAKOWKA *et al.*, 2005). Um teste rápido de seleção pode ser realizado com indicadores de pH, considerando que bactérias do tipo *Helicobacter* quebram uréia em amônia, produzindo mudanças de coloração no meio (MELNICHOUK *et al.*, 1999). Aspectos adicionais devem ser estudados para comprovar a real participação desta bactéria na gênese das ulcerações gástricas em suínos.

Outro agente infeccioso encontrado em associação com úlceras gástricas foi o circovírus (PCV2), detectado através da técnica de PCR, sempre no interior de histiócitos, célula em que o vírus tem sido mais comumente encontrado (PASTOR *et al.*, 1998).

Em um recente estudo, suínos criados em um ambiente socialmente enriquecido não apresentaram nenhum caso de ulceração gástrica. Já o grupo controle, criado em condições padrões de confinamento, com o piso parcialmente ripado, teve uma prevalência de 17.5 % de ulcerações gastroesofágicas (RAMIS *et al.*, 2005).

A utilização de diversas formulações contendo antiácidos tem sido geralmente ineficaz na prevenção do desenvolvimento e na redução de mortes causadas pelas ulcerações gástricas (FRIENDSHIP, 1997).

3 – CONCLUSÕES

Considerando o aspecto multifatorial do desenvolvimento da ulceração gastroesofágica, todas as medidas para reduzir o impacto das variáveis predisponentes já identificadas deveriam ser aplicadas. Essas ações devem ser tomadas em conjunto e uma monitoria sobre o seu resultado deve ser freqüente e criteriosa. Algumas mudanças não são economicamente aplicáveis, porém muitas outras são simples como, por exemplo, pequenas adequações de manejo. É de fundamental importância a correção da granulometria da ração e a diminuição de fatores estressantes durante todo o processo de criação. Mais estudos no campo do enriquecimento sócio-ambiental suíno devem ser feitos buscando técnicas simples e baratas a serem aplicadas nas granjas.

O aprofundamento das pesquisas sobre a participação dos fatores de risco e a busca de novos conhecimentos sobre a etiopatogenia do quadro devem ser intensificadas e contínuas. Além do enorme prejuízo econômico causado pelas ulcerações gástricas, devemos também pensar na questão do bem estar animal e de que maneira queremos que a nossa suinocultura seja rotulada pelo mercado.

Agradecimentos: Os pesquisadores têm suporte financeiro oferecido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil.

4 – REFERÊNCIAS

- 1 Amory, J.R., Mackenzie, A.M., Pearce, G.P. 2006 Factors in the housing environment of finisher pigs associated with the development of gastric ulcers. *Veterinary Record*, 158:260-264.
- 2 Argenzio, R. A., Eisemann, S. 1996. Mechanisms of acid injury in porcine gastroesophageal mucosa. *American Journal of Veterinary Research*. 57:564-573.
- 3 Ayles, H.L., Friendship, R.M., Ball, R.O. 1996. Effect of dietary particle size on gastric ulcers, assessed by endoscopic examination and relationship between ulcer severity and growth performance of individually fed pigs. *Swine Health and Production*. 4:211-216.
- 4 Barcellos, D.E.S.N. & Dreimeler, D. 2003. Comunicação pessoal.
- 5 Dufresne, L. 1998. Alimentary Disorders of Growing pigs. *Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress*. pp71-77.
- 6 Dufresne, L. 1999. Enteric Disease or Production Syndrome of the Growing Pig. *ISU Swine Disease Conference for Swine Practitioners Proceedings*. Nov, pp. 170-180.
- 7 Embaye, H., Thomlinson, J.R., Lawrence, T.L.J. 1990 Histopathology of oesophagogastric lesions in pigs. *Journal of Comparative Pathology*, 103:253-264.
- 8 Friendship, R.M., Deen, J. 1997. Treatment and control of gastric ulcers. *Compendium on Continuing Education of the Practicing Veterinarian*. 19 (suppl.9):S234-S237.
- 9 Friendship, R.M. 1999. Gastric ulcers. In: Straw BE, Mengeling WL, D'Alaire S, Taylor DJ, eds. *Diseases of Swine*. 8th ed. Ames, Iowa State University Press, pp 685-694.
- 10 Friendship, R.M. 2004. Gastric ulcers in swine. *Journal of Swine Health and Production*; 12(1):34-35.
- 11 Griffing, W.J. (1963). A study of etiology and pathology of gastric ulcers in swine. *Dissertation Abstract* 24:1581-1582.
- 12 Kowalczyk, T. 1969) Etiologic factors of gastric ulcers in swine. *American Journal of Veterinary Research*. 30:393-400.
- 13 Krakowka, S., Ring, D.M., Ellis, J.A. 2005. Experimental reproduction of bacterial gastritis and gastric ulcer disease with swine-origin gastric *Helicobacter* species. *American Journal of Veterinary Research*. 66:945-952.
- 14 Maxwell, C.V., Reimann, E.M., Hoekstra, W.G., Kowal-Czyk, T., Benevenga, N.J., Grummer, R.H. 1970. The effect of dietary particle size on lesion development and on the contents of various regions of the stomach. *Journal of Animal Science*. 30:911-922.
- 15 Melnichouk, S.L., Friendship, R.M., Dewey, C.E., Bildfell, R.J., Smart, N.L. 1999. *Helicobacter*-like organisms in the stomach of pigs with and without gastric ulceration. *Swine and Health Production*. 7:201-205.

- 16 Nafstad, I., Tolerstud, S., Baustad, B. 1967. Gastric ulcers in swine: Effects of different proteins and fats on their development. *Pathologia Veterinaria* 4:23-30.
- 17 Pastor, J., Segales, J., Cuenca, R., Balasch, M. 1998. Gastric ulcers and hematological disorders in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected pigs. *Proceedings of the International Pig Society Congress*. 397.
- 18 Potkins, Z. V., Lawrence, T. L. J., Thomlinson, J. R. 1989a. Oesophagogastric parakeratosis in the growing-pig-effects of the physical form of barley-based diets and added fibre. *Research in Veterinary Science*. 47:60-67.
- 19 Potkins, Z. V., Lawrence, T. L. J., Thomlinson, J. R. 1989b. Rate of development of oesophagogastric parakeratosis in the growing pig: Some effects of finely ground barley diets, genotype, and the previous husbandry. *Research in Veterinary Science*. 47:68-74.
- 20 Ramis, G., Gomez, S., Pallares, F.J., Monhoz, A. 2005. Comparison of the severity of esophagogastric, lung and limb lesions at slaughter in pigs reared under standard and enriched conditions. *Animal Welfare*. 14:27-34.
- 21 Reese, N.A., Muggenburg, B.A., Kowalczyk, T., Grummer, R. H., And Hoekstra, W.G. 1966. Nutritional and environmental factors influencing gastric ulcers in swine. *Journal of Animal Science*. 25:14-20.
- 22 Segalés, J. 2002. Update on postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome diagnosis. *Journal of Swine Health and Production*. v. 10, n.6, p. 277-281.
- 23 Smith, W.J., Edwards, S.A. 1996. Ulceration of the pars oesophagea – The role of a factor in wheat. *Proceedings of the International Pig Society Congress*. 14:693.
- 24 Straw, B., Henry, S., Nelissen, J., Doster, A., Moxley, R., Rogers, D., Webb, D., Hogg, A. 1992. Prevalence of lesions in the pars oesophagea of normal and sick pigs. *Proceedings of the International Pig Society Congress*. p 386.
- 25 Van Vleet, J.F., Cariton, W., Olander, H.J. 1970. Hepatosis dietetica and mulberry heart disease associated with selenium deficiency in Indiana swine. *Journal of Veterinary Medicine Association*. 157:1208-1219.

6. ARTIGO II

Neste item está incluso a cópia do trabalho encaminhado para a publicação na revista Pesquisa Veterinária Brasileira, no formato de artigo completo.

Gastric ulcers in pigs affected with postweaning multisystemic wasting syndrome⁴

André Mendes Ribeiro Corrêa⁵, Priscila Zlotowsk², David Emilio Santos Neves de Barcellos⁶, Cláudio Estêvão Farias da Cruz² and David Driemeier^{2*}

ABSTRACT.- Corrêa A.M.R., Zlotowski P., Barcellos D.E.S.N., Cruz C.E.F. & Driemeier D. 2008. **Gastric ulcers in pigs affected with postweaning multisystemic wasting syndrome.** *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: davetpat@ufrgs.br

Samples of gastric lymph nodes and the stomachs from 24 pigs selected from herds affected by postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and sudden death associated with gastric ulcers were studied. Pigs were selected on the basis of unthriftiness, decreased feed intake, and wasting. The stomachs were opened, inverted, and scored into 0-3 according the severity of the gross lesions present in *Pars oesophagica*. Selected samples were processed for paraffin embedding and stained with hematoxylin and eosin. Immunohistochemistry using anti-PCV2 (porcine circovirus type 2) antibody, anti-*Helicobacter pylori* antibody and a wide-spectrum anti-cytokeratin antibody was performed. Gross changes in *pars oesophagea* were classified according to the severity of lesions as score 3, 2, and 1 in 8, 6, 5 stomachs respectively. Microscopically, hyperplastic lymphoid follicles, lymphohistiocytic inflammatory infiltrates and foci of cellular necrosis in the gastric mucosae were common findings. Large amounts of PCV2 antigen were observed in the cytoplasm and nuclei from intralesional cells and debris from the gastric glandular mucosal zone; however, in the fundus, anti-PCV2 immunostaining was restricted to the surface mucosal cells and foveolar compartment. All gastric lymph nodes were positive for PCV2 antigen. Anti-*H. pylori* immunostaining was seen in eleven cases, mainly in the antrum, on the mucosal surface and foveolar compartment. The association of the anti-PCV2

⁴ Received on May 19, 2008.

Accepted for publication on

⁵ Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. *Corresponding author: davetpat@ufrgs.br

⁶ Setor de Suínos, Favet - UFRGS, Porto Alegre, RS.

immunostaining with the glandular mucus-producing cells suggests a role for PCV2 as an additional factor for the swine ulcer development.

INDEX TERMS: Gastric ulcer, PMWS, PCV2, *Helicobacter pylori*, swine.

RESUMO.- [Úlceras gástricas em suínos afetados pela síndrome multissistêmica do definhamento.] Amostras de linfonodos gástricos e os estômagos de 24 leitões selecionados de rebanhos afetados pela síndrome multissistêmica do definhamento suíno e mortes súbitas por úlceras gástricas foram estudados. Os animais foram selecionados por baixa performance, baixo consumo de alimento e desnutrição. Os estômagos foram abertos, invertidos e classificados, conforme a severidade das lesões presentes na *Pars oesophagica*. Amostras selecionadas foram processadas por método histológico convencional para coloração de hematoxilina-eosina. Imunoistoquímica utilizando anticorpos anti-PCV2 (circovírus suíno tipo 2), anti-*Helicobacter pylori* e anti-citoqueratina de largo espectro foram feitas. As alterações macroscópicas na *Pars oesophagica* foram classificadas como de escore 3, 2 e 1 respectivamente em 8, 6 e 5 estômagos. Microscopicamente, foram notados folículos linfóides hiperplásicos, infiltrados linfocitários e focos de necrose na mucosa gástrica. Grandes quantidades de antígeno do PCV2 foram observadas no citoplasma, núcleo e restos necróticos de células intralesionais das glândulas gástricas nas regiões do antro e cárdia; entretanto, na região do fundo, a marcação anti-PCV2 foi restrita às células da superfície mucosa e fossetas gástricas. Todos os linfonodos gástricos foram positivos para PCV2. Marcação anti-*H. pylori* foi identificada em 11 casos, principalmente, na superfície mucosa e fossetas gástricas no antro. A associação de antígenos PCV2 com células produtoras de muco lesadas na zona glandular gástrica sugere o envolvimento de PCV2 como um fator adicional para o desenvolvimento da úlcera gástrica suína.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Úlcera gástrica, SMDS, PCV2, *Helicobacter pylori*, suínos.

INTRODUCTION

Porcine circovirus type 2 (PCV2) is widespread in the commercial swine population and has been associated with several disease complexes (Allan & Ellis 2000, Segalés & Domingo 2002, Ellis et al. 2004, Segalés et al. 2004). PCV2 is the essential infectious component of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) (Allan et al. 2000, Meehan et al. 2001, Krakowka et al. 2005), which is an economically important disease of piglets

characterized by wasting and multisystemic dysfunction, including granulomatous lymphadenitis with lymphoid depletion, hepatitis, pneumonia, and myocarditis (Allan & Ellis 2000, Chae 2004). The demonstration of a moderate to high amount of PCV2 antigen or nucleic acids in close association with characteristic microscopic lesions confirms the diagnosis of PMWS (Sorden 2000). PCV2 antigens have been detected by immunohistochemistry in a wide range of cells from pigs naturally or experimentally infected with PCV2 (Rosell et al. 1999, Kennedy et al. 2000, Opriessnig et al. 2007, Pérez-Martín et al. 2007).

Gastric ulceration is an important disease entity in pigs (Embaye et al. 1990, Friendship 2006). Ulceration of the *Pars oesophagica* can affect pigs of any age but the highest rate of ulceration occurs in pigs 3-6 months of age. The exact cause of ulceration is not completely understood, but many of the risk factors are well known and include management, nutrition, infectious agents and others (Friendship 2006). The stratified squamous epithelium of the *Pars oesophagica* of the stomach is devoid of mucous-producing glands and lacks the sodium bicarbonate buffering system characteristic of the gastric glandular mucosa. As a consequence, the *Pars oesophagica* is subjected to damage by the acidic contents of the stomach. Others have described this pathogenesis in gastric ulcers lesions (Embaye et al. 1990, Krakowka et al. 1995, Argenzio & Eisemann 1996, Friendship 2006). In addition, Krakowka et al. (2005) suggested that the porcine gastric ulcer disease complex may involve gastric colonization with *Helicobacter pylori*-like bacteria, but additional studies would help to clarify the association of the bacteria with the gastric ulcers development.

Experimental infections of gnotobiotic pigs with various viral pathogens, including porcine reproductive and respiratory syndrome virus, has not resulted in gastric ulceration; however, experimental infection with porcine circovirus type 2 (PCV2) has caused multisystemic lesions, including gastric lesions (Harms et al. 2001). Although gastric ulceration of the *Pars oesophagica* has been reported in PMWS-affected pigs (Segalés et al. 2000), no direct relationship between these lesions and PCV2 has been established (Segalés et al. 2005). The aim of the present study was to establish an association between PCV2 infection and the development of gastric ulcers in PMWS affected pigs.

MATERIALS AND METHODS

The study included 24 3- to 5-month-old pigs from three different herds, which had been experiencing cases of PMWS and sudden death associated with gastric ulcers. Animals were selected on the basis of unthriftiness, decreased feed intake, and wasting. The stomachs and samples of gastric lymph nodes

were analyzed. The stomachs were opened along the greater curvature, inverted, and scored into 0-3 according to the severity of the gross lesions (Embaye et al. 1990) present in *Pars oesophagica*. Classification of lesions was performed using a scoring system. In it, score 1 lesions were limited in extent, occurring mainly near the oesophageal opening or at the margin adjacent to the cardiac portion. Lesions designated as score 3 severely affected the entire non-glandular area and score 2 lesions had intermediate severity. Samples of the formalin-fixed gastric lymph nodes, transitional *Pars oesophagica*-glandular cardiac mucosa, glandular antral mucosa, and fundic mucosa were processed for routine HE slides and immunohistochemical (IHC) staining. A polyclonal antibody against PCV2⁷ at 1:1.000 dilution in the streptavidin–biotin–immunoperoxidase⁸ technique, and with diaminobenzidine⁵ as chromogen was applied (Sorden et al. 1999). Anti-*Helicobacter pylori* IHC staining was performed in the cardiac and antral sections similarly as in anti-PCV2 IHC, but at 1:200 dilution and with a rabbit anti-*H. pylori* antibody⁵. Anti-cytokeratin IHC studies were performed using the avidin-biotin-peroxidase complex detection system (Mills 1992) and a wide-spectrum polyclonal bovine anti-cytokeratin⁵ antibody at 1:100 dilution. Alcian blue counterstaining was applied in selected sections.

RESULTS

Gross findings

In eight stomachs, the *Pars oesophagica* damage was scored 3 with extensive and severe erosive lesions affecting its entire area, leaving a deep ridge at the margin with the cardiac mucosal portion of the stomach. Extensive granulation tissue was observed on the affected areas and in 4 cases, erosions reached the muscular layer. Two of the eight stomachs were filled with clotted or partially digested blood and gastric mucus. All of these eight stomachs showed focal edema of the gastric serosa in the lesser curvature. Six stomachs were classified score 2, and the ulcerative lesions reached more than half of the *Pars oesophagica*. In five cases, the *Pars oesophagica* was graduated as score 1, when the epithelial lesions did not exceed a half part of the region of stratified squamous epithelial tissue. Five stomachs did not present gross lesions (score 0) in the *Pars oesophagica*, whose squamous epithelium was smooth, white and glistening, and the junction with the cardiac glandular zone was abrupt and distinct. No ulceration lesions were observed in the glandular mucosa.

⁷ Department of Veterinary Diagnostic and Production Animal Medicine, ISU, Ames, IA, USA.

⁸ DakoCytomation Inc., Carpinteria, California, USA.

Histological findings

The presence of hyperplastic lymphoid follicles embedded in the gastric mucosa was a common finding in the stomachs with any degree of gross lesions. In score 3 gastric lesions on the *Pars oesophagica*, there was extensive granulation tissue. Lymphohistiocytic inflammatory infiltrates were common in the lamina propria and, in one case scored 3, giant cells were also detected. Areas of cellular necrosis in the gastric glands were often seen with cellular debris within the glands, frequently more conspicuous in the glandular zones (cardia and antrum) of the gastric mucosa.

Immunohistochemical findings

The most remarkable findings were observed in the gastric glandular mucosal zone (cardia and antrum), where large amounts of PCV2 antigen were observed in the cytoplasm and nuclei from intralesional cells and debris. In the fundus, IHC staining was observed exclusively on the surface mucosal cells and foveolar compartment. No IHC staining was seen in the oxyntic glands. While no anti-PCV2 immunostaining could be detected in the gastric tissues from six stomachs, all gastric lymph nodes were positive for PCV2 antigen. Anti-*H. pylori* immunostaining was positive in eleven cases, mainly in the antrum, on the mucosal surface and foveolar compartment. The *Pars oesophagica* lesions and the IHC results are summarized in Table 1. Double immunostaining for simultaneous demonstration of PCV2 and cytokeratin confirmed the presence of PCV2 within epithelial cells of gastric glandular mucosa.

DISCUSSION

A number of risk factors have been described in association with gastric ulcers in swine, including PCV2 infection, but the role of PCV2 infection in the ulcer development is not yet clarified (Friendship 2006). Among the methods used to detect PCV2 in tissues and to correlate it with lesions, the *in situ* hybridization (ISH) and immunohistochemistry are the most widely used (McNeilly et al. 1999, Rosell et al. 1999, Segalés et al. 2005).

Considering the hypothesis in which the mucus-producing cells of the gastric glandular zones are targets for the PCV2 infection in the stomach of pigs, the necrosis induced by PCV2 in these cells may be associated with the decreased stomachal pH by the imbalance of the sodium bicarbonate buffering system and subsequently, with the ulceration of the *pars oesophagea*. The main target cell for PCV2 replication in the swine stomach mucosa may have not been established in this study; however, the association of the anti-

PCV2 immunostaining with the glandular mucus-producing cells indicates that PCV2 should be considered as an additional factor for the swine ulcer development.

The lack of anti-PCV2 staining in stomachs from six pigs, mostly of them with score 3 gastric ulcers samples, could be explained by a decreased PCV2 viremia in chronic cases. Initial or terminal stages of diseases may be associated with mild or even absence of PCV2 antigen (Segalés et al. 2004). In some PCV2 infected pigs, it is possible that the viremia has to reach high systemic levels to infect others cell lines, and then to develop its full expression of ulcerogenic potential. This hypothesis or individual resistance may explain why 5 pigs had no gastric ulcers.

We can not discard the participation of others risk factors in the development of the ulcers seen in these cases, but a strong link between histopathological lesions and anti-PCV2 immunostaining at the glandular mucus-producing cells may help us to understand the pathogenic role of PCV2 infection and gastric ulcer development in pigs.

Although *Helicobacter pylori* may occasionally cause gastric ulcers (Krakowka et al. 1995), we could neither find a significant relationship between *H. pylori* and gastric ulcers scores nor between *H. pylori* and PCV2, but this finding does not exclude *H. pylori* as a significant agent in the development of swine gastric ulcers.

Acknowledgements.- This study was supported by grants from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil.

REFERENCES

- Allan G.M. & Ellis J.A. 2000. Porcine circoviruses: a review. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12:3-14.
- Allan G.M., McNeilly E., Kennedy S., Meehan B., Moffett D., Malone F., Ellis J. & Krakowka S. 2000. PCV-2- associated PDNS in Northern Ireland in 1990. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Vet. Rec.* 146:711-712.
- Argenzio R.A. & Eisemann J. 1996. Mechanisms of acid injury in pig gastroesophageal mucosa. *Am. J. Vet. Res.* 57:564-573.
- Chae C. 2004. Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. *Vet. J.* 168:41-49.
- Ellis J., Clark E., Haines D., West K., Krakowka S., Kennedy S. & Allan G.M. 2004. Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. *Vet. Microbiol.* 98:159-163.

- Embaye H., Thomlinson J.R. & Lawrence T.L.J. 1990. Histopathology of oesophagogastric lesions in pigs. *J. Comp. Pathol.* 103:253-264.
- Friendship R.M. 2006. Gastric ulcers, p.891-899. In: Straw BE, Zimmerman J., D'Allaire S. & Taylor D.J. (ed.), *Diseases of Swine*. 9th ed. Blackwell Publishing, Ames, Iowa.
- Harms P.A., Sorden S.D., Halbur P.G., Bolin S.R., Lager K.M., Morozov I. & Paul O.S. 2001. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Pathol.* 38:528-39.
- Kennedy S., Moffett D., McNeilly F., Meehan B., Ellis J., Krakowka S. & Allan G.M. 2000. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus. *J. Comp. Pathol.* 122:9-24.
- Krakowka S., Eaton K.A. & Rings D.M. 1995. Occurrence of gastric ulcers in gnotobiotic piglets colonized by *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 63:2352-2355.
- Krakowka S., Ellis J.A., McNeilly F., Gilpin D., Meehan B., McCullough K. & Allan G. 2002. Immunologic features of porcine circovirus type 2 infection. *Viral. Immunol.* 15:567-582.
- Krakowka S., Ringler S.S., Flores J., Kearns R., Eaton K.A. & Ellis J. 2005. Isolation and preliminary characterization of novel *Helicobacter* species from swine. *Am. J. Vet. Res.* 66:938-944.
- McNeilly F., Kennedy S., Moffett D., Meehan B.M., Foster J.C., Clarke E.G., Ellis J.A., Haines D.M., Adair B.M. & Allan G.M. 1999. A comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J. Virol. Methods.* 80:123-128.
- Meehan B.M., McNeilly F., McNair I., Walker I., Ellis J.A., Krakowka S. & Allan G.M. 2001. Isolation and characterization of porcine circovirus 2 from cases of sow abortion and porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Arch. Virol.* 146:835-842.
- Mills, B. 1992. Immunohistochemistry. In: E.B. Prophet, B. Mills, J.B. Arrington & Sobin L.H. (ed.), *Laboratory Methods in Histochemistry*. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, p.247-256.
- Opriessnig T., Meng X.J. & Halbur P.G. 2007. Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19:591-615.
- Pérez-Martín E., Rovira A., Calsamiglia M., Mankertz A., Rodríguez F. & Segalés J. 2007. A new method to identify cell types that support porcine circovirus type 2 replication in formalin-fixed, paraffin-embedded swine tissues. *J. Virol. Methods.* 146:86-95.
- Rosell C., Segalés J., Plana-Durán J., Balasch M., Rodríguez-Arrijo G.M., Kennedy S., Allan G.M., McNeilly F., Latimer K.S. & Domingo M. 1999. Pathological, immunohistochemical, and in situ

- hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J. Comp. Pathol.* 120:59-78.
- Segalés J., Pastor J., Cuenca R. & Domingo M. 2000. Haematological parameters in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. *Vet. Rec.* 146:675-676.
- Segalés J. & Domingo M. 2002 Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs: A review. *Vet. Q.* 24:109-124.
- Segalés J., Rosell C. & Domingo M. 2004. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. *Vet. Microbiol.* 98:137-149.
- Segalés J., Allan G. & Domingo M. 2005. Porcine circovirus diseases. *Anim. Health. Res. Rev.* 6:119-42.
- Sorden S.D., Harms P.A., Nawagitgul P., Cavanaugh D. & Paul P.S. 1999. Development of a polyclonal-antibody-based Immunohistochemical method for the detection of type 2 porcine circovirus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1:528-530.
- Sorden S.D. 2000. Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Health. Prod.* 8:133-136.

Table 1: Gastric ulcers scores and immunohistochemical results^b observed in stomachs from 24 PMWS confirmed pigs

Stomach	Lesion score ^a	IHC PCV2 Lymphonode	IHC PCV2 Antrum mucosa	IHC PCV2 Cardia mucosa	IHC PCV2 Fundus mucosa	IHC <i>H. pylori</i>
01	2	+++	++	++	+	Ø
02	0	++	+	Ø	Ø	+
03	3	+	Ø	Ø	Ø	++
04	3	++	+	+	+	Ø
05	2	+++	++	+	+	+
06	3	+	Ø	Ø	Ø	Ø
07	0	++	Ø	Ø	Ø	Ø
08	1	+++	+++	+++	+	Ø
09	2	+++	++	+	+	+
10	2	++	+	+	+	Ø
11	3	+	+	+	Ø	+++
12	3	+	Ø	Ø	Ø	Ø
13	0	+++	Ø	Ø	Ø	++
14	1	++	+	++	Ø	++
15	3	+	+	Ø	Ø	Ø
16	0	+	++	+	+	+
17	1	+++	++	++	+	Ø
18	1	++	++	++	+	Ø
19	3	+	Ø	Ø	Ø	++
20	2	+++	++	++	+	+
21	0	+	+	+	Ø	Ø
22	1	++	++	+	+	+
23	3	+	+	+	+	Ø
24	2	++	+	+	+	Ø

^a Lesion score: 0 = no lesions; 1 = mild; 2 = moderate; 3 = accentuated.

^b IHC staining: Ø = negative; + = slight; ++ = moderate; +++ = marked.

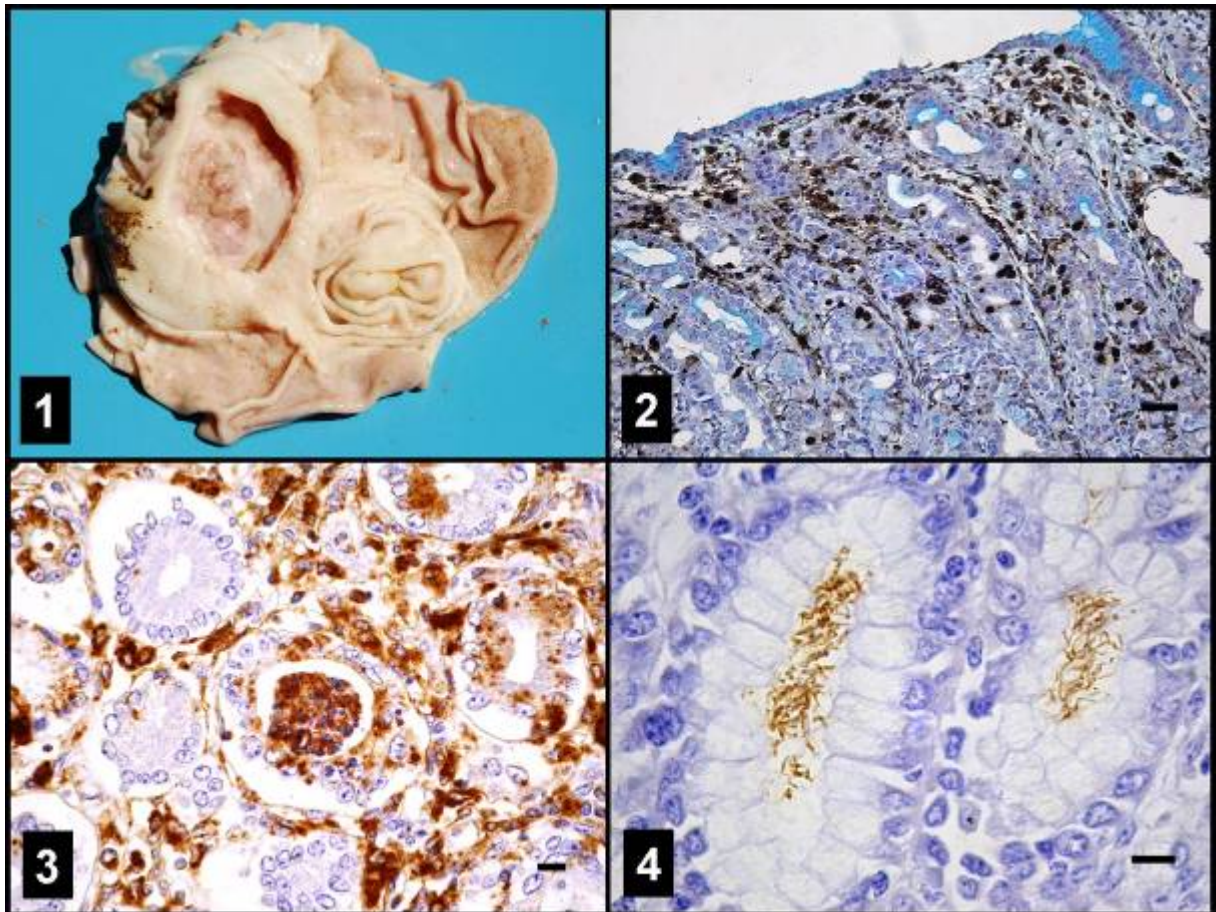
Legends of figures

Fig.1. Score 3 gastric ulcer. Extensive and severe erosive lesion affecting the entire area of the *Pars oesophagica* (Swine stomach n° 4).

Fig.2. Anti-PCV2 immunostaining in the gastric mucosa, which also shows cellular necrosis and decreased number of mucus-producing cells (Swine stomach n° 10). Anti-PCV2 immunostaining counterstained with Alcian blue and hematoxylin, obj.20x. Bar: 100µm.

Fig.3. Intense anti-PCV2 immunostaining in the cytoplasm, cellular debris, and lymphohistiocytic infiltrates in the lamina propria of the gastric glands at the cardia zone (Swine stomach n° 5). Anti-PCV2 immunostaining counterstained with hematoxylin, obj.40. Bar: 20µm.

Fig.4. Anti-*Helicobacter pylori* immunostaining in the foveolar compartment (Swine stomach n° 14). Anti-*H. pylori* immunostaining counterstained with hematoxylin. Obj.100x. Bar: 10µm.



7. DISCUSSÃO

No nosso conhecimento, a associação da infecção viral com morte celular, principalmente das células produtoras de muco na mucosa gástrica, pode acarretar em um aumento progressivo da acidez geral do estômago, levando à lesão direta do quadrilátero esofágico e conseqüente ulceração. Essa seria uma possível explicação da participação do PCV2 como um dos fatores relacionados ao desenvolvimento de úlceras gástricas em suínos.

A ausência de marcação positiva anti-PCV2 em estômagos com grau acentuado de ulceração pode ser explicada pela diminuição do antígeno viral em casos crônicos da doença. Casos iniciais ou terminais da doença podem estar associados com quantidades discretas ou mesmo ausência de antígenos de PCV2 (Segalés et al., 2004).

É possível que em alguns animais infectados, a viremia tenha que atingir níveis sistêmicos altos para conseguir infectar outros tipos celulares não linfóides. Não podemos descartar a participação de outros agentes no desenvolvimento das ulcerações gástricas nestes casos, porém a associação direta das lesões histológicas com a marcação anti-PCV2 positiva nas glândulas gástricas produtoras de muco podem auxiliar no entendimento da patogenia do PCV2 associada ao desenvolvimento das úlceras em suínos.

Embora a presença de *H. pylori* seja associada com a formação de úlceras em seres humanos, neste estudo não conseguimos estipular uma relação direta entre essas bactérias e o grau de ulceração e PCV2, mas este fato não diminui a importância da *H. pylori* na formação de úlceras em suínos.

Analisando o aspecto multifatorial do desenvolvimento da ulceração gastresofágica, todas as medidas para reduzir o impacto das variáveis predisponentes já identificadas deveriam ser aplicadas. Essas ações devem ser tomadas em conjunto, e uma monitoria sobre o seu resultado deve ser freqüente e criteriosa.

Algumas mudanças não são economicamente aplicáveis, porém muitas outras são simples como, por exemplo, pequenas adequações de manejo. É importante a correção da granulometria da ração e a diminuição de fatores estressantes durante todo o processo de criação. Mais estudos no campo do enriquecimento sócio-ambiental suíno devem ser feitos buscando técnicas simples e baratas a serem aplicadas nas granjas.

O aprofundamento das pesquisas sobre a participação dos fatores de risco e a busca de novos conhecimentos sobre a etiopatogenia do quadro devem ser intensificadas e contínuas. Além do enorme prejuízo econômico causado pelas ulcerações gástricas, deve-se pensar na questão do bem estar-animal e de que maneira queremos que a nossa suinocultura seja rotulada pelo mercado.

8. REFERÊNCIAS

- ALLAN. G., MEEHAN. B., TODD. D., KENNEDY, S., McNEILLY, F., CLARK E.G., HARDING, J., ESPUNA, E., BOTNER, A., CHARREYRE, C. (1998) **Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes.** Vet Rec.142(17):467-8.
- ALLAN, G.M., ELLIS, J.A. (2000) **Porcine circoviruses: a review.** J. Vet. Diagn. Invest. 12(1):3-14.
- AMORY, J.R., MACKENZIE, A.M., PEARCE, G.P. (2006) **Factors in the housing environment of finisher pigs associated with the development of gastric ulcers.** Vet. Rec. 158(8):260-4.
- ARGENZIO, R.A., EISEMANN, S. (1996) **Mechanisms of acid injury in porcine gastroesophageal mucosa.** Am. J. Vet. Res. 57(4):564-73.
- AYLES, H.L., FRIENDSHIP, R.M., BALL, R.O. (1996). **Effect of dietary particle size on gastric ulcers, assessed by endoscopic examination and relationship between ulcer severity and growth performance of individually fed pigs.** J. Swine Health and Prod. 4:211-216.
- BIVIN, W.S., de BARROS, C.L., de BARROS S.S., dos SANTOS M.N. (1974). **Gastric ulcers in Brazilian Swine.** J. Am. Vet. Med. Assoc. 164:405-407
- CLARK, E.G., ELLIS, J.A., ALLAN, G.M., KRAKOWKA, S. (2004) **Postweaning multi-systemic wasting syndrome in swine.** In: Infectious diseases of livestock, eds. Coetzer JAW, Tustin RC, 2nd ed., pp. 1374–1386. Oxford University Press, Oxford, UK.
- CORRÊA, A.M.R., SANTOS, A.S., GUAGNINI, F.S., BANDARRA, P.M., PAVARINI, S.V., DRIEMEIER, D., BARCELLOS, D.E.S.N. (2007) **Úlceras gástricas em suínos.** Acta Scientiae Veterinariae. 35: 101-104.

- DUFRESNE, L. (1998) **Alimentary Disorders of Growing Pigs**. Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress. pp71-77.
- DUFRESNE, L. (1999) **Enteric Disease or Production Syndrome of the Growing Pig**. ISU Swine Disease Conference for Swine Practitioners Proceedings. Nov, pp. 170-180.
- EMBAYE, H., THOMLINSON, J.R., LAWRENCE, T.L.J. (1990) **Histopathology of oesophagogastric lesions in pigs**. J. Comp. Pathol. 103(3):253-64.
- FRIENDSHIP, R.M. (1999) **Gastric Ulcers**. In: Straw, B.E., Mengeling, W.L., D'Allaire, S., Taylor, D.J., eds. Diseases of Swine. 8th ed. Ames, Iowa State University Press, pp 685-694.
- FRIENDSHIP, R.M. (2004) **Gastric ulcers in swine**. J Swine Health and Prod. 12(1):34-35.
- FRIENDSHIP, R.M. & DEEN, J. (1997) **Treatment and control of gastric ulcers**. Comp. Cont. Educ. Practic. Veterin. 19 (suppl.9):234-237.
- GRIFFING, W.J. (1963) **A study of etiology and pathology of gastric ulcers in swine**. Dissertation Abstract 24:1581-1582.
- JOSENHANS, C., BEIER, D., LINZ, B., MEYER, T.F., SUERBAUM, S. (2007) **Pathogenomics of *Helicobacter***. Int. J. Med. Microbiol. 297(7-8):589-600.
- KIM, J., CHUNG, H.K., CHAE, C. (2003) **Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex**. Vet. J. 166:251–256.
- KOWALCZYK, T. (1969) **Etiologic factors of gastric ulcers in swine**. Am. J. Vet. Res. 30(3):393-400.
- KRAKOWKA, S., EATON, K.A., RINGS, D.M. (1995) **Occurrence of gastric ulcers in gnotobiotic piglets colonized by *Helicobacter pylori***. Infect Immun. 63:2352–2355.
- KRAKOWKA, S., RING, D.M., ELLIS, J.A. (2005) **Experimental reproduction of bacterial gastritis and gastric ulcer disease with swine-origin gastric *Helicobacter* species**. Am J Vet Res. 66:945-952.

- KRAKOWKA, S. & ELLIS, J. (2006) **Reproduction of severe gastroesophageal ulcers (GEU) in gnotobiotic swine infected with porcine *Helicobacter pylori*-like bacteria.** Vet. Pathol. 43:956–962.
- MAXWELL, C.V., REIMANN, E.M., HOEKSTRA, W.G., KOWAL-CZYK, T., BENEVENGA, N.J., GRUMMER, R.H. (1970). **The effect of dietary particle size on lesion development and on the contents of various regions of the stomach.** J. Anim. Sci. 30(6):911-22.
- MELNICHOUK, S.L., FRIENDSHIP, R.M., DEWEY, C.E., BILDFELL, R.J., SMART, N.L. (1999). ***Helicobacter*-like organisms in the stomach of pigs with and without gastric ulceration.** J. Swine Health Prod. 7:201-205.
- NAFSTAD, I., TOLERSTUD, S., BAUSTAD, B. (1967) **Gastric ulcers in swine: effects of different proteins and fats on their development.** Pathol Vet. 4(1):23-30.
- O'BRIEN, J.J. (1986). **Gastric ulcers.** In: Diseases of Swine, ed. Leman AD, 6th ed. pp. 680–691. Iowa State University Press, Ames, IA,
- PASTOR, J., SEGALES, J., CUENCA, R., BALASCH, M. (1998) **Gastric ulcers and hematological disorders in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected pigs.** Proceedings of the International Pig Society Congress.p397.
- PÉREZ-MARTÍN, E., ROVIRA, A., CALSAMIGLIA, M., MANKERTZ, A., RODRÍGUEZ, F., SEGALÉS, J. (2007) **A new method to identify cell types that support porcine circovirus type 2 replication in formalin-fixed, paraffin-embedded swine tissues.** J Virol Methods. 146(1-2):86-95.
- POTKINS, Z.V., LAWRENCE, T.L.J., THOMLINSON, J.R. (1989a). **Rate of development of oesophagogastric parakeratosis in the growing pig: Some effects of finely ground barley diets, genotype, and the previous husbandry.** Res Vet Sci. 47(1):68-74.

- POTKINS, Z.V., LAWRENCE, T.L.J., THOMLINSON, J.R. (1989b). **Oesophagogastric parakeratosis in the growing-pig-effects of the physical form of barley-based diets and added fibre.** Res Vet Sci. 47(1):60-7.
- RAMIS, G., GOMEZ, S., PALLARES, F.J., MONHOZ, A. (2005). **Comparison of the severity of esophagogastric, lung and limb lesions at slaughter in pigs reared under standard and enriched conditions.** Animal Welfare. 14:27-34.
- REESE, N.A., MUGGENBURG, B.A., KOWALCZYK, T., GRUMMER, R.H., HOEKSTRA, W.G. (1966). **Nutritional and environmental factors influencing gastric ulcers in swine.** J Anim Sci. 25(1):14-20.
- SEGALÉS, J. (2002) **Update on postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome diagnosis.** J Swine Health and Prod. 10(6)277-81.
- SEGALÉS, J. & DOMINGO, M. (2002) **Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review.** Vet Q. 24:109–124.
- SEGALÉS, J., ROSELL, C., DOMINGO, M. (2004) **Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease.** Vet Microbiol. 98:137–149.
- SEGALÉS, J., ALLAN, G.M., DOMINGO, M. (2005) **Porcine circovirus diseases.** Anim Health Res Rev. 6(2):119-42
- SMITH, W.J., EDWARDS, S.A. (1996). **Ulceration of the pars oesophagea - The role of a factor in wheat.** Proceedings of the International Pig Society Congress. 14:693.
- SORDEN, S.D., HARMS, P.A., NAWAGITGUL, P., CAVANAUGH D., PAUL, P.S. (1999) **Development of a polyclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of type 2 porcine circovirus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue.** J. Vet.Diagn. Invest. 11(6):528-30

- STRAW, B., HENRY, S., NELSSSEN, J., DOSTER, A., MOXLEY, R., ROGERS, D.,
WEBB, D., HOGG, A. (1992) **Prevalence of lesions in the pars esophagea of normal
and sick pigs.** Proceedings of the International Pig Society Congress. p 386.
- SUERBAUM, S. & MICHETTI, P. (2002) ***Helicobacter pylori* infection.** N. Engl. J. Med.
347, 1175–1186.
- VAN VLEET, J.F., CARLTON, W., OLANDER, H.J. (1970) **Hepatositis dietetica and
mulberry heart disease associated with selenium deficiency in Indiana swine.** J. Am.
Vet. Med. Assoc. 1;157(9):1208-19.

ANEXO I

PROTOCOLO DAS LÂMINAS DE POLY-L-LYSINE PARA IMUNOISTOQUÍMICA

A) SOLUÇÃO DE POLY-L-LYSINE 10%:

10 mL de poly-L-lysine (SIGMA P 8920)

90 mL de água destilada

Diluir a poly-L-lysine na de água destilada. Armazenar a solução na geladeira.

* Se estiver turva jogar fora *

B) SOLUÇÃO DE ÁLCOOL-ÁCIDO:

1 mL ácido clorídrico

99 mL álcool 70%

Diluir o ácido clorídrico no álcool 70%.

C) PROCEDIMENTO:

- 1- Submergir as lâminas em solução de álcool-ácido e colocar no agitador por 5 minutos;
- 2- Retirar as lâminas do álcool-ácido e escorrer o excesso;
- 3- Passar no Álcool 96 ou absoluto e colocar no agitador por 5 minutos;
- 4- Escorrer o excesso;
- 5- Mergulhar na solução de Poly-L-Lysine 10% (temp. amb.) por 5 minutos;
- 6- Secá-las em estufa 60°C por seis horas no mínimo.
- 7- Depois de secas colocar a lápis um " P " na base da porção fosca e guardá-las nas caixas devidamente identificadas e com um saquinho de sílica dentro.

Obs 1: Quando guardadas ainda úmidas as lâminas ficam grudadas e sua utilidade comprometida;

Obs 2: Para fixar o corte, antes de pescar o corte, pingar uma gota da solução de poly-L-lysine 10% na lâmina e espalhar com o dedo. (item não obrigatório);

Obs 3: Na teoria as lâminas podem ficar armazenadas por até seis meses em ambiente seco. "Teme umidade".

Arquivo salvo na pasta "SPV 1"