

ESTREPTOMICINA AUMENTA A ADERÊNCIA EM CÉLULAS EPITELIAIS DE *Bacteroides melaninogenicus* ASSOCIADO ÀS LESÕES PERIDENTÁRIAS DA “CARA INCHADA” DOS BOVINOS¹

Peter A. Kopp², Iveraldo S. Dutra³, Jürgen Döbereiner⁴, Martin Schmitt², Barbara Grassmann² e Hans Blobel²

ABSTRACT.- Kopp P.A., Dutra I.S., Döbereiner J., Schmitt M., Grassmann B. & Blobel H. 1996. [**Streptomycin increases the adherence on oral epithelial cells of *Bacteroides melaninogenicus* involved in the periodontal lesions of “cara inchada” in cattle.**] Estreptomicina aumenta a aderência em células epiteliais de *Bacteroides melaninogenicus* associado às lesões peridentárias da “cara inchada” dos bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 16(2/3):53-57. Projeto Saúde Animal Embrapa/UFRRJ, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23851-970, Brazil.

“Cara inchada” of cattle (CI) is a periodontitis which occurs in calves in several regions of Brazil. Its progressive lesions, caused mainly by *Bacteroides melaninogenicus* and *Actinomyces pyogenes*, could lead to loss of teeth, malnutrition and possibly death of affected animals. For further analysis of the pathogenesis of this disease the influence of streptomycin on the adherence of the causative bacteria to oral epithelial cells of cattle was determined. Production of streptomycin by soil bacteria (Actinomycetes) in Brazil had been suggested by several authors. In our studies, streptomycin in subinibitory concentrations increased tenfold the rate of adherence with *B. melaninogenicus* (from 0.4 to 4.0 bacteria per bovine epithelial cell). On the contrary, streptomycin did not influence significantly the adherence of *A. pyogenes* nor streptococci of the *viridans* group. Thus, streptomycin could be a contributing factor to the development of the periodontal infections with *B. melaninogenicus*.

INDEX TERMS: Streptomycin, adherence, oral epithelial cell, *Bacteroides melaninogenicus*, periodontitis, cattle, “cara inchada”.

SINOPSE.- A “cara inchada” dos bovinos (CI) é uma periodontite que afeta bezerros em várias regiões do Brasil. Constitui-se por lesões progressivas, causadas principalmente por *Bacteroides melaninogenicus* e *Actinomyces pyogenes*, podendo evoluir para a perda dos dentes,

emaciação e possivelmente morte dos animais afetados. Para prosseguimento dos estudos sobre a patogênese da doença foi determinada no presente trabalho a influência da estreptomicina sobre a aderência, em células epiteliais oral de bovinos, de duas das principais bactérias associadas à CI. Produção de estreptomicina por bactérias do solo (Actinomicetos) no Brasil tem sido sugerido por Baldani et al. (1982). Em concentrações subinibitórias a estreptomicina aumentou em dez vezes a taxa de aderência de *B. melaninogenicus* (de 0,4 para 4,0 bactérias por célula epitelial bovina). Por outro lado, a estreptomicina não influenciou significativamente a aderência de *A. pyogenes* ou de estreptococos do grupo *viridans*. Com base nesses resultados pode-se depreender que a estreptomicina seja um fator que contribua para o desenvolvimento da infecção peridentária característica da CI.

¹ Aceito para publicação em 5 de março de 1996.

Trabalho realizado com o auxílio da FAPESP/DAAD (Proc. nº 95/0169-5).

² Institut für Bakteriologie und Immunologie, Justus Liebig-Universität, Frankfurter Str. 107, D-35392 Giessen, Alemanha.

³ DAPSA, Universidade Estadual Paulista, Cx. Postal 533, Araçatuba, SP 16015-050; bolsista CNPq (305967/85-1).

⁴ Projeto Saúde Animal Embrapa/UFRRJ, Km 47, Seropédica, RJ 23851-970; bolsista CNPq (305294/88-1).

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Estreptomicina, aderência, célula epitelial oral, *Bacteroides melaninogenicus*, periodontite, bovinos, "cara inchada".

INTRODUÇÃO

No estágio atual do conhecimento sobre a "cara inchada" dos bovinos (CI) no Brasil não existe qualquer evidência de que suspeitas de tratar-se de doença de nutrição sejam verdadeiras. Desta forma, não podiam ser comprovadas as afirmações de que a CI seja uma enfermidade primária do esqueleto, determinada por fator nutricional, como ocorre com a osteodistrofia fibrosa dos equinos (Rosa & Döbereiner 1994). Mas desde o início do estudo da CI suspeita-se que a periodontite deve ser desencadeada por um fator determinante existente na alimentação (Döbereiner et al. 1974, 1975, 1976, Rosa et al. 1976).

É cada vez mais evidente o papel que bactérias têm no aparecimento e desenvolvimento dessa periodontite, em especial *Bacteroides melaninogenicus* associado a *Actinomyces pyogenes* (Blobel et al. 1984, 1987), com a produção de considerável número de enzimas e toxinas capazes de provocar em danos tissulares (Dutra et al. 1986); não há indicação de alteração primária do colágeno peridentário (Seifert et al. 1983). Uma importante questão nesse contexto é como estes microrganismos colonizam o espaço sublingual e desencadeiam uma periodontite purulenta com periostite ossificante secundária, considerando-se ainda que foram isolados em pequeno número de bovinos sadios (Blobel et al. 1984).

Por isso, Schmitt et al. (1996) investigaram as possíveis correlações entre a imunidade celular de bovinos e a CI. Verificaram que a aderência de *B. melaninogenicus* e a sua fagocitose por granulócitos polimorfonucleares eram diminuídas em bezerros com CI, porém a quimiotaxia não era afetada.

Numerosos estudos anteriores indicaram que importante fator desencadeante para a infecção peridentária deve estar relacionado com a modificação da microbiota do solo em virtude do desmatamento de florestas virgens e da vegetação natural do cerrado para a sua transformação em pastagens ou ainda posteriores reformas dessas (Döbereiner 1990, Dutra et al. 1993). Nesse contexto são de interesse as indicações indiretas obtidas por Baldani et al. (1982), de que em tais solos ocorre um significativo aumento do número de Acinomicetos produtores de estreptomicina.

O objetivo deste trabalho foi verificar o comportamento de bactérias (particularmente *Bacteroides melaninogenicus*, *Actinomyces pyogenes* e estreptococos do grupo *viridans*), quando tratadas com estreptomicina, frente à sua capacidade de aderência em células epiteliais oral de bovinos.

MATERIAL E MÉTODOS

Bactérias

As culturas bacterianas utilizadas no estudo foram isoladas de lesões peridentárias de bezerros com CI e mantidas na coleção do Instituto de Bacteriologia e Imunologia, da Universidade de

Giessen, Alemanha, de onde foi obtida também a amostra de *Streptococcus* do grupo *viridans*. Em razão da complexidade taxonômica, a amostra de *Bacteroides* pigmentado de negro utilizada foi denominada *Bacteroides melaninogenicus* (Blobel et al. 1984).

Determinação da concentração subinibitória de estreptomicina

A determinação da concentração subinibitória foi realizada segundo o método de diluição (Sutter 1985, Jones et al. 1985), com a verificação final do número de bactérias através de fotometria (Benchetrit et al. 1981). Concentrações crescentes (0,5-25/ μ g/ml) de estreptomicina (Sigma, Deisenhofen, Alemanha) foram adicionadas em meios de cultura líquidos (40 ml de THB para *A. pyogenes* e estreptococos e 40 ml de BHI, modificado segundo Eley et al. (1984), para *Bacteroides*). Os meios de cultura contendo o antibiótico foram inoculados com 2 ml de uma pré-cultura pura e densa dos respectivos microrganismos e finalmente incubados a 37°C de acordo com as respectivas características de crescimento (*A. pyogenes* e estreptococos 24 h, *Bacteroides* 5 dias em anaerobiose). A determinação da concentração subinibitória (inibição de 50% do crescimento) foi realizada em fotômetro (540nm). Como standard (= 0% de crescimento) foram utilizadas as mesmas culturas com estreptomicina e a pré-cultura, no entanto mantidas a 4°C; culturas bacterianas sem antibiótico e incubadas de acordo com os respectivos períodos de cultivo foram consideradas como 100% de crescimento. Para a utilização na pesquisa sobre aderência foram empregadas as culturas que demonstraram cerca de 50% de inibição do crescimento (concentração inibitória de 50%, IC₅₀). A concentração subinibitória de cada espécie de bactéria foi aferida através de 6 repetições idênticas. Os resultados obtidos foram os seguintes: 2/ μ g/ml e 15/ μ g/ml de estreptomicina para a IC₅₀ de *A. pyogenes* e *Bacteroides*, respectivamente (Fig. 1). Os estreptococos do grupo *viridans* foram resistentes à estreptomicina; desta maneira foram tratados previamente com 2 μ g/ml do antibiótico para excluir modificações na superfície das bactérias. As diferentes espécies de bactérias empregadas, tanto as não tratadas com estreptomicina como as tratadas com a concentração subinibitória foram cultivadas, com o auxílio de um fotômetro aferidas para 10% de transmissão ($\sim 10^9$ bactérias) e liofilizadas.

Células epiteliais

As células epiteliais de bovinos de diferentes idades e da raça zebú foram obtidas da mucosa da gengiva lingual maxilar, em áreas próximas dos Pd₂, Pd₃ (filogeneticamente, Pd₃, Pd₄) e eventualmente M₁, M₃, com o auxílio de uma espátula de madeira. As células foram várias vezes sistematicamente lavadas em PBS (pH 7,5) a 1.200 xg, aferidas para uma concentração de 10⁵/ml de PBS com o auxílio da câmara de Thoma, e mantidas a 4°C até a sua utilização.

Marcação das bactérias

As bactérias liofilizadas foram ressuspensas em água destilada e diluídas 1:10 em PBS. Para cada 1 ml da suspensão foi adicionado 1mg de FICT (Isotiocianato de fluoresceína, Sigma), que foram incubados a 37°C em banho-maria com agitação e finalmente lavados quantas vezes necessárias a 10.000 xg em PBS até a clarificação do sobrenadante. O pelete final foi ressuspendido em 1 ml de PBS.

Teste de aderência

Bactérias marcadas com FITC (0,5ml) foram incubadas por 60 min a 37°C em banho-maria sob agitação, juntamente com 0,5 ml de células epiteliais. Quando empregadas combinações de duas espécies diferentes de bactérias, as células epiteliais (0,5 ml) fo-

ram previamente incubadas por 30 min a 37°C com as bactérias não marcadas. Logo após, eram acrescentados 0,5 ml de bactérias marcadas e a mistura total então incubada a 37°C por 60 min. A separação das bactérias não ligadas das aderidas foi realizada através de centrifugação (8.000 xg por 2 min) por gradiente, com a utilização de Percoll (Sigma). As células epiteliais na camada de separação foram pipetadas, lavadas em PBS (4x a 1.200xg) e duas gotas do preparado levadas em lâmina para leitura em microscópio de fluorescência (Valentin-Weigand et al. 1987).

RESULTADOS

Os resultados da influência da estreptomicina sobre a aderência em células epiteliais de bactérias associadas à CI são apresentados no Quadro 1. Desta forma, a estreptomicina não apresentou clara influência sobre aderência de *A. pyogenes*. O mesmo não ocorreu com *Bacteroides*; após o tratamento prévio com 15 µg/ml de

Quadro 1. Ensaio da aderência com as bactérias associadas à "cara inchada", assim como com estreptococos do grupo *viridans*, tratados previamente e não tratados com estreptomicina

Preparado	Bactéria aderida/célula epitelial ^a
<i>A. pyogenes</i> (sem estreptomicina)	4,1
<i>A. pyogenes</i> (com estreptomicina)	4,8
<i>Bacteroides</i> sp. (sem estreptomicina)	0,4
<i>Bacteroides</i> sp. (com estreptomicina)	4,0
Estreptococos (sem estreptomicina)	4,1
Estreptococos (com estreptomicina)	1,8

^a Os números são valores médios calculados em 6 preparados idênticos, cada um com 50 células epiteliais contadas.

Quadro 2. Combinações na pesquisa sobre aderência, realizadas com as diferentes bactérias associadas à "cara inchada" e com estreptococos do grupo *viridans*^a

Preparado	Bactéria aderida/célula epitelial ^b
Estreptococos (sem estreptomicina)	
<i>A. pyogenes</i> (sem estreptomicina)	2,7
Estreptococos (com estreptomicina)	
<i>A. pyogenes</i> (sem estreptomicina)	2,7
Estreptococos (sem estreptomicina)	
<i>A. pyogenes</i> (com estreptomicina)	1,5
Estreptococos (com estreptomicina)	
<i>A. pyogenes</i> (com estreptomicina)	2,7
<i>Bacteroides</i> sp. (sem estreptomicina)	
<i>A. pyogenes</i> (sem estreptomicina)	3,1
<i>Bacteroides</i> sp. (com estreptomicina)	
<i>A. pyogenes</i> (sem estreptomicina)	2,4
<i>Bacteroides</i> sp. (sem estreptomicina)	
<i>A. pyogenes</i> (com estreptomicina)	4,0
<i>Bacteroides</i> sp. (com estreptomicina)	
<i>A. pyogenes</i> (com estreptomicina)	3,1

^a Nestes ensaios somente foram marcadas e contadas as bactérias (no caso, *A. pyogenes*) adicionadas no segundo passo.

^b Os números são valores médios calculados em 6 preparados idênticos, cada um com 50 células epiteliais contadas.

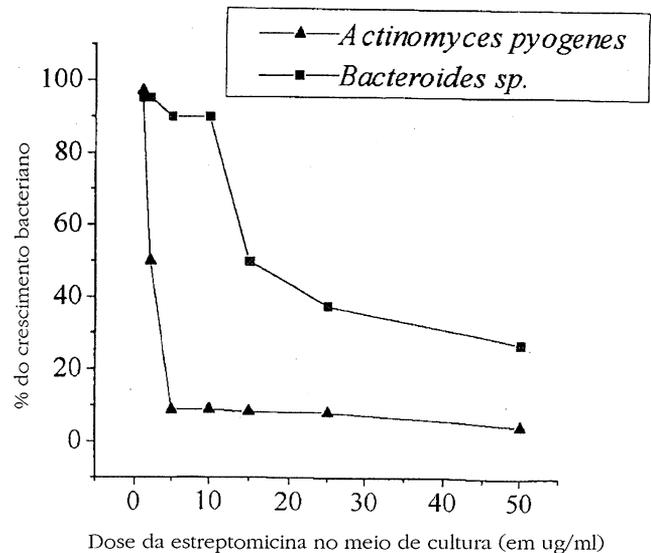


Fig. 1. Inibição do crescimento de *A. pyogenes* e *Bacteroides melaninogenicus* após a adição de estreptomicina, na dependência da concentração.

estreptomicina houve um aumento significativo da aderência nas células epiteliais (4,0/0,4) (Fig.2). A diminuição da aderência dos estreptococos do grupo *viridans* após o tratamento prévio com o antibiótico deveu-se à forte aglomeração dos mesmos.

Nos ensaios com diferentes combinações os resultados foram bastante adversos (Quadro 2). Após a incubação prévia com *Bacteroides* e finalmente com *A. pyogenes*, ocorreram diferentes níveis de aderência de *Bacteroides* tratados com estreptomicina. Assim, ocorreu uma diminuição da aderência de *A. pyogenes* nas células epiteliais após a incubação prévia com *Bacteroides* tratados (2,4/3,1 - 3,1/4,0). Tão logo *Bacteroides* ocupam as células epiteliais, aparentemente estas não estão mais em condições de se ligarem a *A. pyogenes*, como nas células livres. Eventualmente ocorre uma concorrência nos locais de ligação na superfície celular. De qualquer forma comprova-se, de uma maneira indireta, a capacidade de ligação de *Bacteroides* tratados com estreptomicina. A combinação de estreptococos do grupo *viridans* e *A. pyogenes* demonstra que *A. pyogenes* neste ensaio não se liga mais que os cocos Gram-positivos na superfície celular; pelo contrário, observa-se uma ligeira diminuição da aderência.

Em razão dos resultados inéditos com *Bacteroides* não tratados e tratados (IC₅₀) nos ensaios de aderência sobre as células epiteliais (0,4/4,0), foi realizada a relação dose-dependência de estreptomicina no incremento da aderência do mesmo (Fig. 3). Os resultados da dependência da concentração de estreptomicina sobre a aderência de *Bacteroides* em células epiteliais demonstraram que já em pequenas concentrações do antibiótico, abaixo dos µg/ml empregados na pesquisa preliminar, ocorreram influências positivas.

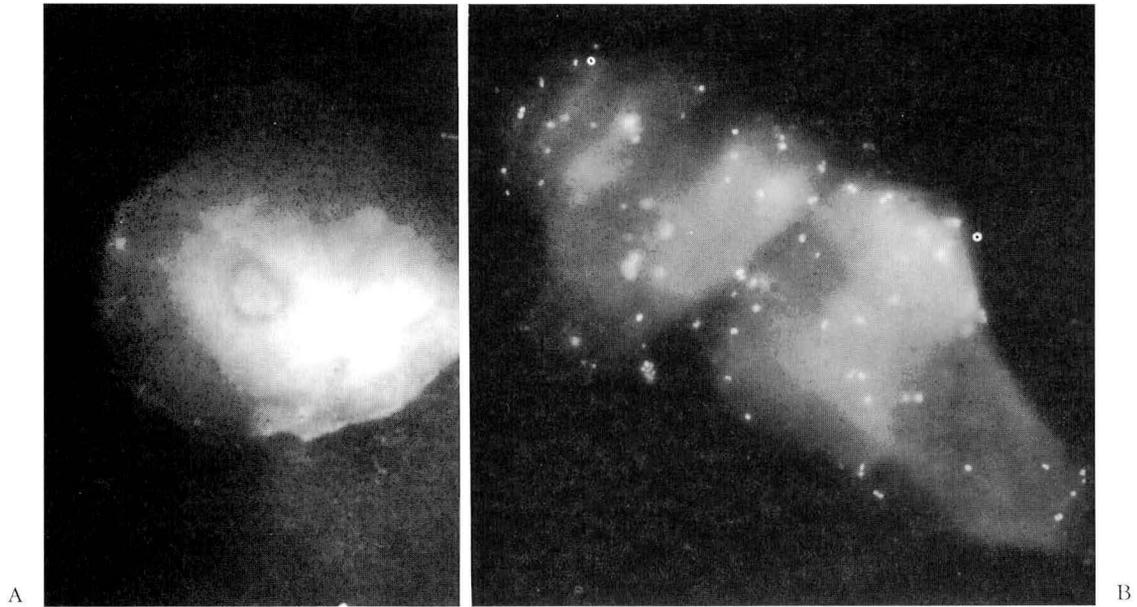


Fig 2. Resultado de experimento de aderência de *Bacteroides melaninogenicus*, previamente tratados com doses subinibitórias de estreptomicina, a células epiteliais da mucosa da gengiva maxilar lingual de bovinos: (A) ausência da aderência de *B. melaninogenicus* não tratados com estreptomicina, e (B) nítida aderência de *B. melaninogenicus* tratados com estreptomicina, às células epiteliais. Marcação com isocianato de fluoresceína, obj. 100.

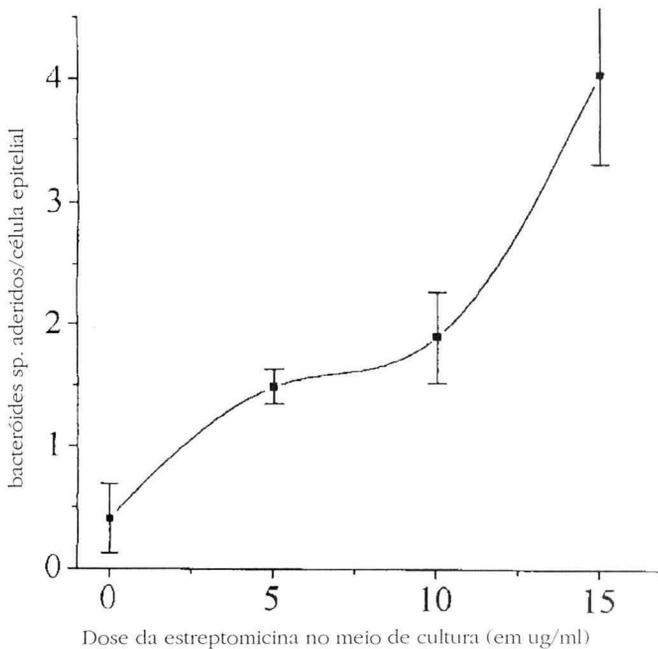


Fig. 3. Aumento da aderência após adição de estreptomicina no meio de cultura. Os valores são resultados de 6 repetições idênticas.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a estreptomicina possui atividade influenciando positivamente a aderência de *Bacteroides* pigmentados de negro. pos-

sivelmente este fenômeno tenha relação com a CI. Observa-se um paralelo entre um aumento do número de Actinomicetos produtores de estreptomicina em solos recém-cultivados de floresta ou cerrado virgens e a prevalência da CI. Nesta linha de raciocínio, os *Bacteroides*, sob a influência da estreptomicina, teriam melhores condições de aderirem a células epiteliais da mucosa oral. Em conjunto com *A. pyogenes* teriam então condições de provocarem danos tissulares diretos e indiretos na gengiva e no osso alveolar.

Nesse contexto, poderia ser de interesse também a ocorrência de CI em bezerros com idade de 2 a 3 meses, descrita por Döbereiner et al. (1974, 1987, 1990), onde o possível "fator desencadeante" estaria também no leite das mães. Assim, vacas que não são mais susceptíveis à CI, por ter completada a dentição, estariam ingerindo estreptomicina através da alimentação e eliminando-a pelo leite. Através da ingestão de leite contendo estreptomicina e sua influência positiva sobre a aderência de *Bacteroides*, poderia então ocorrer o desencadeamento da periodontite da CI nos bezerros.

REFERÊNCIAS

- Baldani J.L., Baldani V.L.D., Xavier D.F., Body R.M. & Döbereiner Joh. 1982. Efeito da calagem no número de actinomicetos e na percentagem de bactérias resistentes à estreptomicina na rizosfera de milho, trigo e feijão. *Revta Microbiol., S.Paulo*, 13(3):250-263.
- Benchetrit L.C., Avelino C.C. & Oliveira C.M. 1981. Effect of subminimal concentrations of penicillin on hyaluronidase production by group A streptococci. *Zbl. Bakt. Hyg., I.Abt. Orig.A* 251:152-156.
- Blobel H., Döbereiner J., Lima F.G.F. & Rosa I.V. 1984. Bacterial isolations from "cara inchada"-lesions of cattle. *Pesq. Vet. Bras.* 4(2):73-77.

- Blobel H., Döbereiner J., Rosa I.V., Lima F.G.F. & Dutra I.S. 1987. Bakteriologische Untersuchungen an der "cara inchada", einer periodontalen Erkrankung bei Rindern in Brasilien. Tierärztl. Umschau 42:152-157.
- Döbereiner J. 1990. Zur Ätiologie der "cara inchada", einer periodontalen Erkrankung der Jungrinder in Brasilien [Towards the etiology of "cara inchada", a periodontal disease of young cattle in Brazil]. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 97(11):482-490.
- Döbereiner J., Inada J.T. & Tokarnia C.H. 1974. "Cara inchada", doença peridentária em bovinos. Pesq. Agropec. Bras., Sér. Vet. 9:63-85.
- Döbereiner J., Chaves J.A., Rosa I.V. & Houser R.H. 1975. Efeito da transferência de bovinos com "cara inchada" (doença peridentária) para pastos de região indene. Pesq. Agropec. Bras., Sér. Vet. 10:99-103.
- Döbereiner J., Rosa I.V. & Lazzari A.A. 1976. "Cara inchada" (doença peridentária) em bezerros mantidos em pastos de *Panicum maximum*. Pesq. Agropec. Bras., Sér. Vet. 11:43-47.
- Döbereiner J., Rosa I.V. & Lazzari A.A. 1987. Efeito do leite materno sobre as lesões peridentárias da "cara inchada" em bezerros. Pesq. Vet. Bras. 7:97-99.
- Dutra I.S., Kanoë M. & Blobel H. 1986. Atividades enzimáticas e endotóxicas de bactérias isoladas de lesões peridentárias da "cara inchada" dos bovinos. Pesq. Vet. Bras. 6:59-63.
- Dutra I.S., Matsumoto T. & Döbereiner J. 1993. Surtos de periodontite em bezerros ("cara inchada") associados ao manejo do solo, Pesq. Vet. Bras. 13(1/2):1-4.
- Eley A.D., Greenwood D. & O'Grady F. 1984. Comparative growth of *Bacteroides* species in various anaerobic culture media. J. Med. Microbiol. 19:195-201.
- Jones R.N., Barry A.L., Gavan T.L. & Washington II J.A. 1985. Susceptibility tests: Microdilution and macrodilution broth procedures, p. 972-977. In: Lenette E.H., Balows A., Hausser Jr. W.J. & Shadomy H.J. (ed) Manual of Clinical Microbiology. 4th ed. ASM Press, Washington, D.C. 1149 p.
- Rosa I.V. & Döbereiner J. 1994. "Cara inchada" dos bovinos e deficiências minerais. Pesq. Vet. Bras. 14(1):43-48.
- Rosa I.V., Carvalho J.C., Houser R.H. & Döbereiner J. 1976. Influência de ração balanceada sobre a "cara inchada" (doença peridentária) de bezerros. Pesq. Agropec. Bras., Sér. Vet. 11:59-63.
- Schmitt M., Dutra I.S., Döbereiner J., Kopp P.A. & Blobel H. 1996. "Cara inchada" and cellular immunity in cattle. Pesq. Vet. Bras. 16(1):1-3.
- Seifert K., Walter P., Döbereiner J. & Rüsse I. 1983. Histological investigations of "cara inchada" in cattle. Pesq. Vet. Bras. 3(2):67-70.
- Sutter V.L. 1985. Susceptibility testing of anaerobes, p. 988-990. In: Lenette E. H., Balows A., Hausser Jr. W.J. & Shadomy H.J. (ed.) Manual of Clinical Microbiology. 4th ed. ASM Press, Washington, D.C. 1149 p.
- Valentin-Weigand P., Chhatwal G.S. & Blobel H. 1987. A simple method for quantitative determination of bacterial adherence to human and animal epithelial cells. Microbiol. Immunol. 31(10):1017-1023.