

Aderência às células epiteliais bucais e hidrofobicidade de *Fusobacterium nucleatum* isolados de humanos e macacos *Cebus apella*

ELERSON GAETTI-JARDIM JÚNIOR*; LUÍS FERNANDO LANDUCCI**; MARIO JULIO AVILA-CAMPOS***

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar, em termos comparativos, a aderência às células epiteliais bucais e a determinação da hidrofobicidade celular de *Fusobacterium nucleatum* obtidos da cavidade bucal de humanos e de primatas *Cebus apella*. Foram testados 49 isolados de *F. nucleatum* de pacientes com doença periodontal; 21 isolados de indivíduos periodontalmente saudáveis e 10 isolados de macacos. A maioria dos isolados de *F. nucleatum*, independentemente da origem, aderiram moderadamente (30% a 50%), sendo que os isolados de pacientes com doença periodontal apresentaram maior capacidade de adesão às células epiteliais bucais. Os isolados mostraram-se, em sua grande maioria, hidrofílicos, não se observando diferença significativa entre os isolados de humanos e *C. apella* ($P=0,189$). Não houve correlação significativa entre hidrofobicidade celular e adesão às células epiteliais bucais.

UNITERMOS

Anaeróbia, bactéria; *Fusobacterium nucleatum*; aderência.

GAETTI-JARDIM JÚNIOR., E.; LANDUCCI, L. F.; AVILA-CAMPOS, M. J. Hydrophobicity and adherence of *Fusobacterium nucleatum* isolated from human and *Cebus apella* monkeys to oral epithelial cells. *Ciência Odontológica Brasileira*, v.5, n.3, p. 13-7, set./dez. 2002.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate and compare, the capacity of adhesion to oral epithelial cells and hydrophobicity of *Fusobacterium nucleatum* isolates recovered from oral cavity of humans and *Cebus apella* monkeys. Forty nine isolates of *F. nucleatum* from periodontitis patients, 21 isolates from healthy subjects and 10 from monkeys were tested. Most isolates were able to adhere to oral epithelial cells (30% - 50%), and isolates that presented high capacity of adherence were recovered from periodontal patients. Most of the isolates were

hydrophilic, and no statistically significant differences among isolates recovered from human and *Cebus apella* monkeys was observed ($\alpha=0,189$). Also, no correlation between cellular hydrophobicity and adhesion to oral epithelial cells, was observed.

UNITERMS

Anaerobic bacteria, *Fusobacterium nucleatum*, adherence.

INTRODUÇÃO

As doenças periodontais representam uma das principais causas da perda precoce dos dentes, agravando-se com a idade e, situando-se entre os principais problemas sócio-econômicos e de saúde pública mundiais, acometendo todas as classes sociais, sem diferenciação de sexo e raça¹⁷.

Bactérias do gênero *Fusobacterium* constituem o segundo grupo microbiano anaeróbio mais frequentemente isolado da microbiota humana e animal¹⁹, destacando-se *Fusobacterium nucleatum*, o qual tem sido envolvido em diferentes quadros clínicos como sinusites, infecções pélvicas, osteomielites, abscessos e nas doenças periodontais^{4, 6, 18}.

O potencial patogênico desse microrganismo pode ser devido a vários fatores de virulência, dentre os quais têm sido destacada a capacidade de adesão e coagregação, ou devido à sua participação no biofilme dental formando uma ponte de ligação entre os colonizadores primários e tardios, facultativos ou anaeróbios estritos. *F. nucleatum* tem mostrado capacidade de aderência a diferentes tipos celulares, como células epiteliais bucais

* Professor Adjunto da Disciplina de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica- Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP – 16021-240 Araçatuba – SP

** Aluno do Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Nível Doutorado) – Área de Biopatologia Bucal – Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP – 12245-000 - São José dos Campos – SP.

*** Departamento de Microbiologia – Instituto de Ciências Biomédicas -USP. Av. Prof. Lineu Prestes, 1374. Ed. Biomédicas, sala 53A.

⁸, fibroblastos, linfócitos, neutrófilos ²⁰ e a outras estruturas, como a membrana basal do epitélio, colágeno tipo IV e hidroxiapatita revestida por saliva ^{1, 5, 10, 16, 24}.

Por outro lado, interações inespecíficas, como forças iônicas e hidrofobicidade celular, também contribuem para as etapas iniciais da adesão bacteriana às células do hospedeiro, acompanhadas de interações mais específicas entre adesinas bacterianas e receptores teciduais ^{7, 8}. Dentre essas forças inespecíficas, destacam-se as forças hidrofóbicas, particularmente no ambiente bucal, onde as interações microbiota-hospedeiro ocorrem na presença de soluções aquosas.

A microbiologia comparada pode representar uma importante área para melhor conhecimento desse grupo microbiano anaeróbio, desde que isolados de origem animal comparados com os de humanos, poderão fornecer dados sobre a patogênese dos processos infecciosos em que esse organismo participa. Dessa forma, o presente estudo objetivou comparar a capacidade de adesão às células epiteliais bucais e determinar a hidrofobicidade celular de isolados de *F. nucleatum* obtidos de humanos e de macacos *Cebus apella*.

MATERIAL E MÉTODOS

1) Microrganismos

Foram testados 49 isolados de *F. nucleatum* oriundos de 30 pacientes com doença periodontal crônica, 21 obtidos de vinte indivíduos periodontalmente saudáveis e 10 de primatas da espécie *Cebus apella* mantidos em cativeiro pelo Centro Experimental de Procriação do Macaco Pregado da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba – UNESP.

A identificação dos isolados, em nível de espécie, foi realizada segundo critérios descritos por Bennett & Duerden ² (1985), Summanen et al. ²¹ (1993) e Holt et al. ⁹ (1994).

2) Avaliação da aderência a células epiteliais bucais (CEB)

A aderência às CEB foi realizada de acordo com metodologia descrita por Childs & Gibbons ³ (1988).

Os isolados de *F. nucleatum* foram cultivados em caldo BHI suplementado com extrato de levedura (0,5%) contendo 5mCi/mL de metil-timidina tritiada (Sigma Chemical Co., USA), e incubadas em dessecadores de vidro “Pyrex”, em condições de anaerobiose obtidas pelo sistema mecânico de gases (90%N₂ + 10%CO₂), a 37°C, por 48 horas. Em seguida, as células bacterianas foram concentradas, por centrifugação, a 3.000 x g, por 8 minutos, e ressuspendidas em PBS até a concentração de 10⁸ bactérias/mL, determinada através de espectrofotômetro (Beckman Instruments, USA) a 550nm.

As CEB foram obtidas de um único doador (sexo masculino, periodontalmente sadio, grupo sanguíneo A, Rh-positivo) através de raspagem do revestimento epitelial da região jugal, por meio de uma espátula esterilizada de madeira. As células epiteliais recuperadas foram ressuspendidas em PBS e lavadas a 1000 x g, por 5 minutos, por duas vezes, padronizando-se a suspensão para 2 x 10⁵ células/mL, pelo uso de câmara de Neubauer.

A avaliação da aderência bacteriana às CEB foi realizada misturando-se 75µL da suspensão bacteriana a 75mL da suspensão de células epiteliais. Essa mistura foi mantida em rotação de 6rpm por aproximadamente 2 horas, à temperatura ambiente, em rotador de tubos (Cole Parmer Instruments Co., USA). A seguir a mistura era transferida para tubos com 4mL de Percoll (Sigma Chemical Co., USA) a 50%, homogeneizada e submetida à centrifugação (31.000 x g, 4°C, 20 minutos) com rotor S W- 50.1 (Beckman Instruments, USA).

Em seguida, procedeu-se a remoção da banda formada próximo à abertura do tubo, dando um volume total aproximado de 1,0mL. A amostra foi diluída em 100mL de PBS e submetida à filtração em membranas de éster de celulose (Millipore, 47 mm, 0,65 µm). Posteriormente, as membranas foram transferidas para tubos Eppendorf com 1,2 mL de líquido de cintilação, os quais eram introduzidos em frascos apropriados (Beckman Instruments, USA) e submetidos à leitura, através de aparelho de cintilação LS-5000 TD (Beckman Instruments, USA).

Como controle, foi utilizado 75µL da suspensão bacteriana cultivada na presença de 5 mCi/mL de metil timidina tritiada e filtrada. Todos os testes foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos como o percentual de bactérias mar-

çadas, radioativamente, aderidas às células epiteliais bucais, em relação ao controle.

3) Determinação da hidrofobicidade celular

A determinação da hidrofobicidade celular foi realizada de acordo com metodologia descrita por Gibbons & Etherden ⁷ (1983). Os isolados foram cultivados em caldo BHI suplementado com extrato de levedura (0,5%), em condições de anaerobiose, a 37°C, por 48 horas. A seguir, as células foram sedimentadas, por meio de centrifugação a 3000 x g, durante 8 minutos, e, em seguida, lavadas três vezes em solução tampão fosfato de uréia magnésio (PUM) e ressuspensas, no mesmo tampão, até atingir a concentração de 10⁹ bactérias/mL, determinada por espectrofotometria (Beckman Instruments, USA) a 550nm.

Alíquotas de 3,0mL das suspensões bacterianas foram transferidas para tubos (10 x 100 mm) e, em seguida, adicionou-se 400µL de n-hexadecano (Sigma Chemical Co., USA). Essa mistura permanecia incubada em banho-maria, a 30°C, por 10 minutos. A seguir, era homogeneizada em agitador de tubos, por dois intervalos de 30 segundos, com 5 segundos de repouso entre eles.

Após a separação das duas fases, a absorbância era determinada em espectrofotômetro (Beckman Instruments, USA) a 550nm. Todos os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como o percentual de bactérias adsorvidas ao n-hexadecano. Os isolados eram considerados hidrofóbicos quando mais de 50% das células bacterianas migravam do tampão PUM para o n-hexadecano e hidrofílicos quando mais de 50% das bactérias permaneciam no tampão ¹⁴.

RESULTADOS

Todos os isolados de *F. nucleatum* avaliados, aderiram moderadamente às células epiteliais (Tabela 1).

Os isolados de *F. nucleatum* testados mostraram-se, em sua grande maioria, hidrofílicos, não se observando diferenças estatisticamente significantes entre os obtidos de humanos e de macacos *C. apella*. Contudo, a ocorrência de cepas hidrofóbicas somente foi verificada entre os isolados de *F. nucleatum* obtidos de pacientes com doença periodontal e de macacos, como apresentado na Tabela 2.

Tabela 1 - Valores em porcentagem da aderência às células epiteliais bucais de 80 isolados de *F. nucleatum*, obtidos de humanos e *Cebus apella*

Isolados (n)	% de adesão		
	Mínimo	Médio	Máximo
PCDP ¹ (49)	15,9	41,1	81,9
IPS ² (21)	9,1	33,8	55,9
CA ³ (10)	32,9	42,9	67,5

¹Pacientes com doença periodontal

²Indivíduos periodontalmente saudáveis

³Primates *Cebus apella*

Tabela 2 - Hidrofobicidade da superfície celular de 80 isolados de *F. nucleatum* de primatas humanos e não humanos.

Característica da superfície celular	Origem bacteriana		
	PCDP1 (49)	IPS2 (21)	CA3 (10)
Hidrofóbica	7 (14,29)*	0 (0,0)	1 (10,0)
Hidrofílica	42 (85,71)	21 (100,0)	9 (90,0)

¹Pacientes com doença periodontal

²Indivíduos periodontalmente saudáveis

³Primates *Cebus apella*

*n (%) de isolados

DISCUSSÃO

Estudos sobre a aderência às CEB e hidrofobicidade celular de *F. nucleatum*, são escassos na literatura, embora esse microrganismo seja considerado importante no desenvolvimento do biofilme dentário¹² e no desencadeamento de processos patológicos periodontais¹¹.

O processo de adesão de *F. nucleatum* às CEB é de grande importância para colonização do sulco gengival ou bolsa periodontal por esse e outros periodontopatógenos, já que esse microrganismo atua como ponte entre os colonizadores iniciais e finais do biofilme dentário, fornecendo condições necessárias para o estabelecimento de *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* e *S. sputigena*, entre outros¹².

Não foi observada diferença significativa na adesão às células epiteliais entre os isolados de *F. nucleatum* obtidos de humanos e primatas não humanos, como mostrado na Tabela 1 ($P = 0,181$), embora os isolados com maior capacidade de adesão tenham sido obtidos de pacientes com doença periodontal.

A existência de várias adesinas capazes de mediar a adesão de *F. nucleatum* às células e estruturas teciduais do hospedeiro vêm sendo confirmada. Esse anaeróbio anfíbio da microbiota bucal tem se mostrado capaz de aderir às CEB^{5, 8, 24}, células mononucleadas do sangue periférico¹⁰, fibroblastos gengivais^{5, 16}, linfócitos, eritrócitos^{5, 22}, neutrófilos^{16, 20}, células neoplásicas¹⁶, hidroxapatita revestida por saliva ou estaterina, colágeno tipo IV²⁴ e a membranas orgânicas semelhantes à membrana basal do epitélio do sulco gengival²³.

Embora a maioria dos isolados de *F. nucleatum* testados tenha apresentado entre 30% a 50% de adesão às CEB, alguns o fizeram com maior eficiência, atingindo valores máximos de 81% (Tabela 1), concordando com Xie et al.²⁴ (1991).

De acordo com a literatura^{7, 13}, interações inespecíficas, como forças iônicas e hidrofobicidade

celular, contribuem para as etapas iniciais da adesão bacteriana às células do hospedeiro, acompanhadas de interações mais específicas entre adesinas bacterianas e receptores nas células do hospedeiro.

Os resultados apresentados na Tabela 2, mostram que a maioria de *F. nucleatum* foi hidrofílico, independentemente da origem dos espécimes ($P = 0,189$). Estes resultados estão de acordo com Tuttle et al.²² (1992), que também observaram o caráter hidrofílico desse anaeróbio bucal.

Sabe-se que nas enterobactérias, *Streptococcus* spp. e outros grupos microbianos, existe estreita correlação entre a hidrofobicidade e a adesão a células do hospedeiro. Contudo, no presente estudo não foi observada essa correlação. Em adição, a ausência dessa correlação (hidrofobicidade celular - adesão a células do hospedeiro), para *F. nucleatum*, foi relatada por Okuda et al.¹⁵ (1991), que mostraram que o LPS desse organismo, além de aglutinar eritrócitos e de aderir à hidroxapatita recoberta por saliva, não se adsorvia ao n-hexadecano. Segundo esses autores, a porção hidrofóbica do LPS bacteriano poderia ser encoberta pela porção hidrofílica.

Esses resultados sugerem a necessidade de maiores estudos para avaliar a real importância da hidrofobicidade celular sobre a adesão de *F. nucleatum* às células e tecidos do hospedeiro, para melhor conhecimento da sua colonização na cavidade bucal.

CONCLUSÕES

Os resultados permitiram concluir que:

- Todos os isolados de *F. nucleatum*, independentemente da origem, aderiram às células epiteliais bucais;
- a maioria dos isolados mostrou-se hidrofílica e;
- a hidrofobicidade celular não afetou o processo de adesão às células do hospedeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BABU, J. P.; DEAN, J. W.; PABST, M. J. Attachment of *Fusobacterium nucleatum* to fibronectin immobilized on gingival epithelial cells or glass cover slips. **J Periodontol**, v.66, n.4, p.285-90, Apr. 1995.
2. BENNETT, K. W.; DUERDEN, B. I. Identification of fusobacteria in a routine diagnostic laboratory. **J Appl Bacteriol**, v.59, n.2, p.171-81, Aug. 1985.
3. CHILDS 3rd., W. C.; GIBBONS, R. J. Use of Percoll density gradients for studying the attachment of bacteria to oral epithelial cells. **J Dent Res**, v.67, n.5, p.826-30, May 1988.
4. CHOI, B. K. et al. Detection of major putative periodontopathogens in Korean advanced adult periodontitis patients using a nucleic acid-based approach. **J Periodontol**, v.71, n.9, p.1387-94, Sept. 2000.
5. FALKLER JÚNIOR, W. A.; SMOOT, C. N.; MONGIELLO, J. R. Attachment of cell fragments of *Fusobacterium nucleatum* to oral epithelial cells, gingival fibroblasts and white blood cells. **Arch Oral Biol**, v.27, n.7, p.553-9, July. 1982.
6. FINEGOLD, S. M. **Anaerobic bacteria in human disease**. New York: Academic Press, 1977. 710p.
7. GIBBONS, R. J.; ETHERDEN, I. Comparative hydrophobicities of oral bacteria and their adherence to salivary pellicles. **Infect Immun**, v.41, n.3, p.1190-6, Sept. 1983.
8. HAN-YIPING, W. et al. Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: *Fusobacterium nucleatum* adheres to and invades epithelial cells. **Infect Immun**, v.68, n.6, p.3140-6, June 2000.
9. HOLT, J. G. et al. Genus *Fusobacterium*. In: BERGEY, D. H.; HOLT, J. G. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p.269.
10. KINDER-HAAKE, S.; LINDEMANN, R. A. *Fusobacterium nucleatum* T18 aggregate human mononuclear cells and inhibits their PHA-stimulated proliferation. **J Periodontol**, v.68, n.1, p.39-44, Jan. 1997.
11. KLEINFELDER, J. V. V.; MULLER, R. F.; LANGE, D. E. Antibiotic susceptibility of putative periodontal pathogens in advanced periodontitis patients. **J Clin Periodontol**, v.26, n.6, p.347-51, June 1999.
12. KOLENBRANDER, P. E.; LONDON, J. Adhere today, here tomorrow; oral bacterial adherence. **J Bacteriol**, v.175, n.11, p.3247-52, June 1993.
13. LACHICA, R. V. Significance of hydrophobicity in adhesiveness of pathogenic Gram-negative bacteria. In: DOYLE, R. J.; ROSENBERG, M. **Microbial cell surface hydrophobicity**. Washington: American Society for Microbiology, 1990. p. 297-313.
14. NAMAVAR, F.; VERWEIJ-VAN VUGHT, M. A. J. J.; MACLAREN, D. M. A study of the candidate virulence factors of *Bacteroides fragilis*. **J Gen Microbiol**, v.137, pt.6, p.1431-35, June 1991.
15. OKUDA, K. et al. Adherence to experimental pellicle of rough-type lipopolysaccharides from subgingival plaque bacteria. **Oral Microbiol Immunol**, v.6, n.4, p.241-5, Aug. 1991.
16. OZAKI, M. et al. Binding specificity of *Fusobacterium nucleatum* to human erythrocytes, polymorphonuclear leukocytes, fibroblasts, and HeLa cells. **J Periodontol Res**, v.25, n.3, p.129-34, May 1990.
17. PAPAPANOU, P. N. Periodontal diseases: epidemiology. **Ann Periodontol**, v.1, n.1, p.1-36, Nov. 1996.
18. ROCHFORD, J. C. Pleuropulmonary infection associated with *Eubacterium brachy*, a new species of *Eubacterium*. **J Clin Microbiol**, v.12, n.5, p.722-3, Nov. 1980.
19. ROWLAND, M. D.; DEL BENE, V. E.; LEWIS, J. W. Factors affecting antimicrobial susceptibility of *Fusobacterium* species. **J Clin Microbiol**, v.25, n.3, p.476-9, Mar. 1987.
20. SHEIKHI, M.; GUSTAFSSON, A.; JARSTRAND, C. Cytokine, elastase and oxygen radical release by *Fusobacterium nucleatum* activated leukocytes: a possible pathogenic factor in periodontitis. **J Clin Periodontol**, v.27, n.10, p.758-762, Oct. 2000.
21. SUMMANEN, P. H. et al. **Wadsworth anaerobic bacteriology manual**. 5th. ed. Singapore: Star, 1993. 230p.
22. TUTTLE, R. S. et al. A non-lectin-like mechanism by which *Fusobacterium nucleatum* 10953 adheres to and activates human lymphocytes. **Oral Microbiol Immunol**, v.7, n.2, p.78-83, Apr. 1992.
23. WINKLER, J. R. et al. An in vitro model to study bacterial invasion of periodontal tissues. **J Periodontol**, v.59, n.1, p.40-5, Jan. 1988.
24. XIE, H.; GIBBONS, R. J.; HAY, D. I. Adhesive properties of strains of *Fusobacterium nucleatum* of the subspecies *nucleatum*, *vincentii* and *polymorphum*. **Oral Microbiol Immunol**, v.6, n.5, p.257-63, Oct. 1991.