

EFEITO NO CULTIVO *Moraxella bovis* UTILIZANDO MEIOS CONDICIONADOS

ALVARENGO, Marília da Costa^{1*}; STURBELLE, Régis T.²; CONCEIÇÃO, Rita de Cássia S.²; ROOS, Talita Bandeira³; LEITE, Fábio Pereira Leivas⁴

1- Bióloga, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, UFPel

2- Doutorando em Biotecnologia, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, UFPel

3- Bolsista PNPd, Programa de Pós Graduação em Parasitologia, UFPel

4- Professor Adjunto, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, UFPel

*Endereço para correspondência: alvarengobio@yahoo.com.br

1 INTRODUÇÃO

Ceratoconjuntivite infecciosa bovina (CIB) é a doença ocular de maior importância em bovinos, devido as significativas perdas econômicas que causa no mercado mundial de bovinos (KAKUDA et al., 2006).

O agente etiológico é a *Moraxella bovis*, uma bactéria gram-negativa pertencente à família Neisseriaceae. Os fatores primários de patogenicidade da *M. bovis* são a produção de toxina RTX, fosfolipases e fímbrias tipo IV (pili de aderência), cuja função é a fixação da bactéria a receptores específicos das células epiteliais da córnea conjuntiva (CHANDLER et al., 1979, TURNES, 1983, FARN et al., 2001; MARRION e RILEY, 2000). Estas fímbrias são essenciais para a colonização do hospedeiro e também importantes imunógenos (LEHR et al., 1985, MATTICK et al., 1996). A forma mais eficiente de controlar a CIB é através da utilização de vacinas que contenham antígenos de fímbria.

Quorum Sensing é um sistema de sinalização entre as bactérias, os quais produzem substâncias denominadas de auto-indutores (AI). Quando os auto-indutores alcançam uma determinada concentração, decorrente do aumento da produção de fatores de virulência como a fímbria (Lua et al., 2010; SURETTE et al., 1999; SPERANDIO et al., 2001). A presença de auto-indutores presentes nos meios condicionados e adicionados aos meios de cultura induzem a expressão de antígenos que normalmente são expressos "in vivo". Dessa maneira, nesse sistema de produção, será possível a obtenção de um melhor imunógeno.

Este estudo tem como objetivo utilizar os meios condicionados para induzir uma maior expressão de fímbria para ser utilizado como antígeno vacinal de *Moraxella bovis*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Bactéria

Foi utilizada uma cepa de *M. bovis* (NROA), cedida pelo professor Fabrício Rochedo Conceição da Universidade Federal de Pelotas.

2.2 Preparo de Meio Condicionado:

Moraxella bovis foi semeada em Ágar sangue por 24h a 37°C. Após colônias isoladas foram semeadas em Erlenmeyer com 10% do seu volume de meio e incubado em agitador orbital por 18h a 37°C a 130 rpm. Após este período, o cultivo foi centrifugado a 12.000 g por 15 min. e o sobrenadante filtrado (0,22 µm). O sobrenadante filtrado adicionado ao meio novo gerou o meio condicionado.

2.3 Avaliação do crescimento bacteriano:

O inóculo de *M. bovis* foi cultivado por 14h em BHI, após foi ajustada a densidade óptica (DO)=0,2 (A600). Foram utilizados seis tratamentos, (T1) Controle com o dobro de BHI; (T2) BHI com 10% de meio condicionado, (T3) BHI com 50% de meio condicionado. Foi utilizado 1 mL do pré inóculo no volume de 100 mL de meio do respectivo tratamento.

2.4 Hemoaglutinação

Com objetivo de verificar se ocorre maior produção de antígeno fimbrial foi utilizada a técnica de hemaglutinação proposta por Hovelius e Mardh (1979). As DO dos cultivos foram ajustadas para 1,0. Foram utilizadas placas em fundo em U onde adicionou-se 100 µL de solução salina 0,85% em cada cavidade. Após foram adicionados 100 µL dos cultivos e foram realizadas diluições logarítmicas base 2. Em seguida adicionou-se 100 µL de uma suspensão de hemácias ovinas a 0,5% em solução salina. Incubou-se por 4h a 4°C, a leitura foi realizada visualmente, foi considerado positivo quando formado uma rede de hemácias cobrindo o poço, e o resultado negativo foi considerado quando se formou um botão no centro do poço da placa.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

No presente estudo constatou-se que a adição de meio condicionado atua no crescimento de *M. bovis*, onde podemos observar que os tratamentos contendo meio condicionado nas concentrações de 10% e 50% mostraram um crescimento homogêneo até a quinta hora de cultivo e ao final das 10 horas de cultivo, os tratamentos com meio condicionado apresentaram um aumento 20 vezes maior que o controle. Estes resultados foram obtidos ao longo de 10h de crescimento onde a densidade óptica foi lida a cada 1h, encontra-se na figura 1. Nos tratamentos contendo meio condicionado sugere a presença de auto-indutores (AI-1, AI-2 e AI-3) sejam os responsáveis na indução do crescimento, não diferindo de outros estudos realizados por Sperandio et al. (2003).

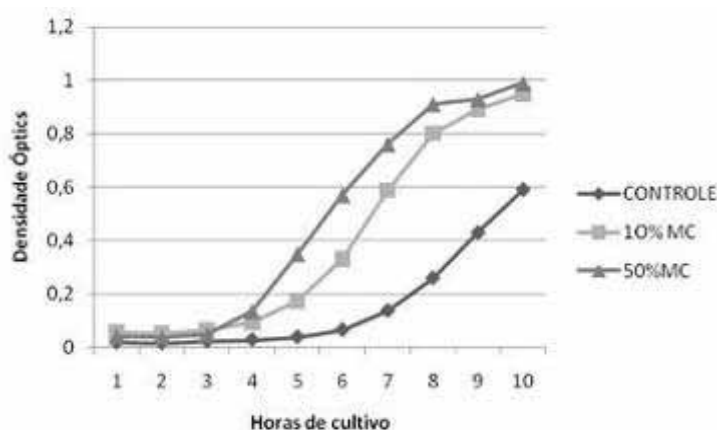


Figura 1: Curva de crescimento. Os dados apresentam as médias expressas em densidade óptica.

Quorum Sensing é uma ferramenta utilizada pela bactéria para acessar a população de sua própria espécie, intra-espécies e entre reinos. Este sistema de sinalização tem sido utilizado para estudar a ativação de genes de virulência, dentre estes a expressão da fímbria (Schauder & Bassler, 2001). Nos ensaios de hemoaglutinação, observamos um título maior nos cultivos com meio condicionado,

demonstrando uma maior expressão de fímbria do que o tratamento controle, novamente mostrando que os tratamentos contendo meio condicionado demonstram ter a presença de auto-indutores, aumentando a expressão de fímbria (Figura 2).

Segundo De Graff; Mool (1986), quando maior o título hemoaglutinante, maior será o número de fímbrias por bactérias. Deste que foi comprovada a participação das fímbrias como fator de patogenicidade, tem sido utilizado como imunógeno para induzir à síntese de anticorpos que vão bloquear a aderência bacteriana.

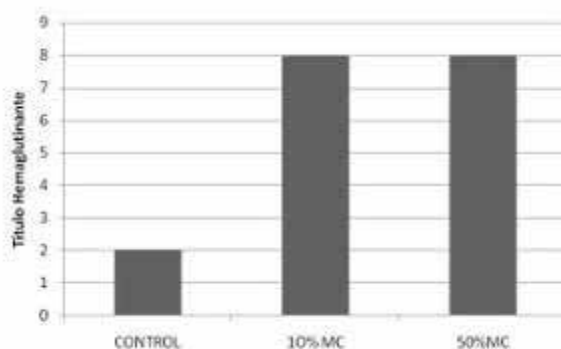


Figura 2: Título hemaglutinante. Os dados representam as médias em escala logarítmica em base 2.

4 CONCLUSÕES

Podemos inferir destes resultados que os meios condicionados induziram uma maior expressão de fímbria de *Moraxella bovis* e um melhor crescimento. Com este estudo, podemos concluir que a utilização de meio condicionado apresenta auto-indutores induzindo um maior crescimento e expressão de fímbria.

5 REFERÊNCIAS

CHANDLER, R.L.; BAPTISTA, P.J.H.P.; TURFREY, B. Studies on the pathogenicity of *Moraxella bovis* in relation to infectious bovine keratoconjunctivitis. **Journal of Comparative Pathology**, v.89, p.441-448, 1979.

FARN, J.L. et al. Molecular characterization of a secreted enzyme with phospholipase B activity from *Moraxella bovis*. **Journal of Bacteriology**, v.183, n.22, p.6717-6720, 2001.

TURNES, G.C. Hemagglutination, autoagglutination and pathogenicity of *Moraxella bovis* strains. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.47, p.503-504, 1983.

TURNES G,C. Ceratoconjuntivite infecciosa bovina. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, MÉNDEZ, A.L. et al. **Doenças de ruminantes e eqüinos**. Pelotas : Universitária/UFPel, 1998. p.180-191.

HOVELIUS, B; MARDH, P.A. Haemagglutination by *S. saprophiticus* and other Staphylococcal species. **Acta pathologica microbiologica immunologica**, v. 87, p. 45-50, 1975.

ANGELOS, J.A.; BALL L.M.; HESS J.F. Identification and characterization of complete RTX operons in *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis*. **Veterinary Microbiology** v.125, p. 73–79, 2007.

LEHR, C.; JAYAPPA, H.G.; GOODNOW, R.A. Serologic and protective characterization of *Moraxella bovis* pili. **Cornell Veterinary**, v.75, p.484-492, 1985.

MARRION, R.M.; RILEY, L.K. Detection of cell detachment activity induced by *Moraxella bovis*. **American Journal of Veterinary Research**, v.9, p.1145-1149, 2000.

MATTICK, J.S.; WHITCHURCH, C.B.; ALM, R.A. **The molecular genetics** of type 4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa* – a review. **Gene**, v.179, p.147-155, 1996.

PUNCH, P.; GERHARDT, R.; ALLEN, J. The role of face flies in a episode of infectious bovine keratoconjunctivitis. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.180, p.156-159, 1982.

LUA, Q.; YUA, J.; XIQIANG, Y.; WANGA, J.; WANGB, L.; LINA, Y.; LINA, L. Ambroxol interferes with *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. **International Journal of Antimicrobial Agents** v.36, p211–215,2010.

SCHAUDER, S.; BASSLER, B.L. The languages of bacteria. **Genes Development**, v.15, p.1468-80, 2001.

SPERANDIO, V.; TORRES, A. G.; GIRON, J. A.; KAPER, J. B. Quorum sensing is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7. **Journal Bacteriol** v. 183, p. 5187–5197, 2001.

SPERANDIO, V.; TORRES, A.G.; JARVIS, B.; NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Bactéria – host communication: the language of hormones. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.100, n.15, p.8951- 56, 2003.

SURETTE, M. G.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 95, p. 7046–7050, 1998.

KAKUDA T.A.; SARATAPHAN N.B; TANAKA T.A.; TAKAI S. Filamentous-haemagglutinin-like protein genes encoded on a plasmid of *Moraxella bovis*. **Veterinary Microbiology** v.118, p. 141–147,2006.