

Detecção de periodontopatógenos em macaco aranha de cara branca (*Ateles marginatus*)

Periodontopathogens Detection in White-Cheeked Spider Monkey (*Ateles marginatus*)

Andresa de Cássia Martini¹, Lianna Ghisi Gomes¹, Fernanda Harumi Maruyama¹, Luciana Maria Curtio Soares¹, Sandra Helena Ramiro Corrêa², Valéria Dutra², Luciano Nakazato² & Roberto Lopes de Souza²

ABSTRACT

Background: Control of oral lesions contributes directly to the survival, and welfare of captive animals, and studies show that the genus *Ateles* has a higher prevalence of widespread periodontal disease compared to other genera. Anaerobic microbial species, considered as periodontal pathogens, are part of the biofilm community that contributes to the development of periodontitis. The present study aimed to detect periodontopathogens in the oral cavity of two captive white-cheeked spider monkeys (*Ateles marginatus*) submitted for assessment oral and subgingival curettage.

Case: We evaluated one pair of captive white-cheeked spider monkeys, one male (A) and one female (B), of 15 years of age with an average weight of 7 kg. Animals were fed daily with rations for primates, including fruit, vegetables, and raw eggs. The animals underwent oral evaluation, and following the charting of odontogram and photographic documentation, both were classified with periodontal disease stage III, according to the AVDC (American College of Veterinary Dentistry). They presented with moderate periodontitis, characterized by a loss of 25 to 50% of periodontal insertion and exposure of furcation degree 2, measured through clinical survey. During intraoral review, animals underwent subgingival curettage with curette of Gracey on the surface of the canine vestibular (C) and four top bilateral premolars (4PM). Antibiotics were not used at the time of collection, for dealing with routine procedures of clinical evaluation. The animals showed an increase in the volume of hemorrhagic features in the vestibular region between C and the second pre molar (2PM) on the upper right. Incisional biopsy was collected immediately at the end of the assessment, for the purpose of histopathological analyses. The samples from subgingival collection were immediately deposited in microtubes containing 500 µL of 0.9% saline solution and kept at -18°C until the time of genomic DNA extraction. The extracted DNA were subjected to polymerase chain reaction (PCR) for the detection of *Fusobacterium* spp., *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Tannerella forsythia*. All the samples detected in PCR were confirmed by partial sequencing of genes. *Fusobacterium* spp., *P. gingivalis*, and *T. forsythia* were detected in both individuals A and B. The identification of *P. intermedia* was exclusive to animal A and histopathological analysis of the gingival fragment showed severe and diffuse neutrophilic infiltrates, confirming the of gingivitis for this individual, with greater severity in the disease progression.

Discussion: Older animals in captivity have a higher incidence of periodontal disease and high expression of inflammatory cytokines and immune receptors involved in the induction of inflammation as compared to younger animals, as well as free-living animals. Gingivitis and periodontitis are associated with an increase in the frequency of anaerobic, gram-negative microorganisms, whereby the production of pigments and a variety of enzymes damages the periodontal tissues. Knowing that the presence of bacterial species directly affects the periodontal condition and that the participation of these microorganisms favors the installation and progression of the disease, this study describes the first molecular detection of periodontopathogens related to periodontal disease in white-cheeked spider monkeys. We concluded that these pathogens are present in the oral cavity of white-cheeked spider monkeys, highlighting the importance of routine and proper food handling in captive animals.

Keywords: biofilm, periodontal disease, subgingival.

Descritores: biofilme, doença periodontal, subgingival.

INTRODUÇÃO

O controle de lesões odontoestomatológicas contribui diretamente para o bem estar dos animais cativos, doenças orais severas podem levar à diminuição de ingestão de água e alimento, podendo ensejar em morte do animal. O gênero *Ateles* possui maior prevalência de doença periodontal (DP) generalizada quando comparado a outros primatas não humanos e indivíduos de vida livre [11].

Em macacos prego (*Cebus apella*), o cálculo dentário foi prevalente em 14/20 (70%) dos animais avaliados, concluindo que esses, não apresentavam saúde oral adequada [3]. Outras pesquisas com macacos- prego [6], afirmaram que a gengivite, periodontite e perda óssea estão associadas a um aumento na frequência de microrganismos anaeróbios gram-negativos como *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Tanerella forsythia* e *fusobactérias*.

Dada a importância do envolvimento desses microrganismos na evolução da DP e a falta de informações para a espécie, objetivou-se detectar através da reação em cadeia de polimerase (PCR) e confirmação através do sequenciamento parcial dos genes os periodontopatógenos *Fusobacterium* spp., *Porphyromonas gingivalis* (PG), *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) e *Tanerella forsythia* (*T. forsythia*).

CASO

Avaliou-se um casal de macacos aranha de cara branca, sendo o macho A e a fêmea (B), cativos, idade e peso médios de 15 anos e 7 kg respectivamente, alimentados diariamente com ração para primatas, frutas, legumes e ovos com casca. Foram contidos quimicamente com cetamina 10% (Quetamina Injetável Vetnil)¹ [10 mg/kg] e midazolam 5%² (0,4 mg/kg) e administrados por via intramuscular, para avaliação odontoestomatológica.

Procedeu-se a inspeção da cavidade oral conforme descrito na literatura [1], e ao final de cada avaliação realizou-se o preenchimento de odontograma para primatas e documentação fotográfica. Durante avaliação intra-oral realizou-se a curetagem subgingival com cureta de Gracey na face vestibular dos caninos (C) e 4 pré molares (4PM) superiores bilaterais. Ambos foram classificados com DP estágio III, segundo o AVDC (Colégio Americano de Odontologia Veterinária), onde apresentavam periodontite moderada, caracterizada pela perda de 25 a 50% da inserção periodontal e pela exposição de furca grau 2, avaliados através da sondagem clínica.

O animal A, apresentava aumento de volume de característica hemorrágica, na região vestibular entre C e 2° pré molar (2PM) superior direito. Imediatamente ao final da avaliação, foi realizada biópsia incisiva, e o fragmento encaminhado para exame histopatológico, sendo realizado para o procedimento indução com propofol³ (5 mg/kg) por via intravenosa, intubação orotraqueal e manutenção anestésica com isoflurano³, vaporizado em oxigênio 100% em um fluxo de 22-44 mL/kg/min em circuito semiaberto.

A extração de DNA genômico, que foi realizada segundo outro estudo [12]. A composição das reações e amplificação estão descritas (Tabela 1).

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0%, corado com Gel Red^{®4} a 10 V/cm e visualizados em foto documentador Chemi-Doc[®] XRS utilizando o software Image Lab[®]. O marcador de massa molecular empregado foi o Ladder 100pb⁵.

Posteriormente, o produto da PCR foi purificado utilizando o ExoStar 1 step⁶ e utilizado na reação de sequenciamento, juntamente com o BigDye Terminator Ready Reaction Cycle Sequencing⁷ no sequenciador automático ABI 3500 Genetic Analyzer⁷. As sequências foram confrontadas com o banco de dados do GenBank usando o BLAST no servidor NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Os resultados da PCR detectaram a presença de PG, *Fusobacterium* spp. e *T. forsythia* em A e B, e *P. intermedia* foi exclusiva ao animal A (Tabela 2).

A análise histológica do fragmento gengival coletado do exemplar A, evidenciou severo e difuso infiltrado neutrofílico, observado também, extensa área hemorrágica, sugestivo de gengivite neutrofílica difusa (Figura 1).

DISCUSSÃO

A identificação de periodontopatógenos nesse estudo, corrobora com outros dados já relatados [6], onde afirmaram que a gengivite, periodontite estão associadas a um aumento na frequência de microrganismos anaeróbios gram negativos como PG, *Prevotella*, *T. forsythia*, e *fusobactérias* em macacos-prego (*Cebus apella*).

Sabe-se que a presença de espécies bacterianas reflete diretamente a condição periodontal e a participação destes microrganismos favorece a instalação e progressão da doença [4]. De acordo com dados observados em outro estudo [10], *P. intermedia* está fortemente associada ao quadro de DP, e a uma variedade de enzimas que favorecem danos aos tecidos periodontais, justificando a detecção de *P. intermedia* em A, já que

Tabela 1. Microorganismo, sequência de oligonucleotídeos, temperatura de anelamento, referência bibliográfica, utilizados na detecção por PCR em macacos- aranha de cara branca (*Ateles marginatus*).

Microorganismo	Sequência de oligonucleotídeos	Temperatura*	Referência
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	5'GAGGAACCTTACCCGGGAT3' 5' ATGCAGCACCTACATAGAAGC3'	55°	[9]
<i>Fusobacterium</i> spp.	5'CGCAGAAGGTGAAAGTCCTGTAT3' 5'TGGTCCTCACTGATTCACACAGA3'	60°	[14]
<i>Tannerella forsythia</i>	5'GCGTATGTAACCTGCCCGCA3' 5'TGCTTCAGTGTCAGTTATACCT3'	60°	[13]
<i>Prevotella intermedia</i>	5'TTTGTTGGGGAGTAAAGCGGG3' 5'TCAACATCTCTGTATCCTGCGT3'	55°	[2]

*Temperatura de anelamento.

Tabela 2. Resultados das detecções por PCR da cavidade oral de macacos- aranha de cara branca (*Ateles marginatus*).

Microorganismo	A	B
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	+	+
<i>Fusobacterium</i> spp.	+	+
<i>Tannerella forsythia</i>	+	+
<i>Prevotella intermedia</i>	+	-

(+) animais positivos na PCR; (-) animais negativos na PCR.

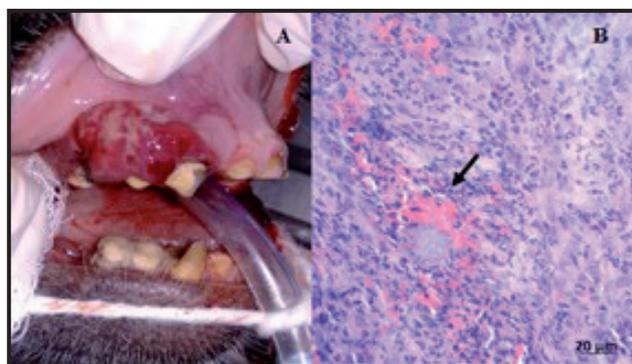


Figura 1. Cavidade oral de macaco aranha de cara branca (*Ateles marginatus*). A- Aumento de volume na região vestibular entre canino (C) e 2° pré molar (2PM) superiores direito. B- Gingiva, hematoxilina e eosina, severo infiltrado neutrofílico e difuso em mucosa, com focos de hemorragia, seta preta (40x).

esse exemplar além da DP, apresentava aumento de volume gengival, com severo dano tecidual.

A análise histológica do fragmento gengival de A, evidenciou severo infiltrado neutrofílico e extensa área hemorrágica, sugestiva de gengivite neutrofílica difusa (Figura 1). Esse estudo corrobora com dados já descritos em literatura [5,8], onde observaram que animais mais velhos e cativos, possuem maior incidência de DP, expressão elevada de citocinas inflamatórias e receptores imunes envolvidos na indução da inflamação, em relação aos mais jovens e de vida livre.

A fim de prevenir a DP, a idade é um fator importante e a orientação sobre escovação da cavidade oral deve ser para prevenir o aparecimento da periodontite [7].

Sabe-se que essa prática a animais selvagens e cativos não é recomendada, devido à alta periculosidade. Acreditamos que para prevenção e controle da DP, as dietas de animais cativos devem se assemelhar a observações anteriores [1], onde indicam alimentos com maiores texturas, proporcionando a limpeza do periodonto durante a mastigação.

O status da saúde oral de 20 macacos-prego (*Cebus apella*) foi avaliado por outro grupo de pesquisa [3], onde 18 (90%) apresentaram alterações orais, concluindo que esses, não possuíam saúde oral adequada, e que a necessidade de avaliação oral com fins de prevenção, controle, diagnóstico e tratamento se faz necessária, a exemplo desse estudo que identificou alterações orais a partir de avaliações clínicas de rotina, e pode instituir diagnóstico, tratamento e medidas de controle, além da identificação e descrição desses periodontopatógenos pela primeira vez na espécie.

Conclui-se que periodontopatógenos relacionados com o grau de severidade da DP estão presentes na cavidade oral de macacos aranha de cara branca, acentuando a importância da rotina odontostomatológica e manejo alimentar adequados em animais de cativeiro.

MANUFACTURERS

¹Vetnil-Indústria e Comércio de Produtos Veterinários Ltda. Louveira, SP, Brazil.

²União Química - Farmacêutica Nacional S/A. São Paulo, SP, Brazil.

³Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. Itapira, SP, Brazil.

⁴Biotium Corporate Headquarters. Hayward, CA, USA.

⁵Ludwig Biotecnologia Ltda. Alvorada, RS, Brazil.

⁶GE Healthcare. Little Chalfont, UK.

⁷Applied Biosystem. Foster City, CA, USA.

Acknowledgements. Agradecimentos ao CNPq pela bolsa de produtividade concedida a Luciano Nakazato e Valéria Dutra.

Ethical approval. Aprovação do Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), número N° 23108.017917/12-0.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest.

REFERENCES

- 1 Andrade P.M.M., Morgado T.O., Mallmann P.R., Spiller P.R., Gomes L.G., Stocco M.B., Martini A.C., Schroder D.C., Correa S.H.R. & Souza R.L. 2015. Occurrence of oral diseases in neotropical wild carnivores kept in captivity at the zoo from Federal University of Mato Grosso Cuiabá. *Semina: Ciências Agrárias*. 36(4): 2633-2640.
- 2 Ashimoto A., Chen C., Bakker I. & Slots J. 1996. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival Plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral microbiology and immunology*. 11: 266-273.
- 3 Costa R.C.S., Botteon R.C.C.M., Neves D.M., Valladares M.C.M. & Scherer P.O. 2012. Saúde oral de primatas da espécie *Cebus apella* (Linnaeus, 1758) mantidos no Centro de triagem de animais silvestres-IBAMA no estado do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*. 34(2): 86-90.
- 4 Eto F.S., Raslan S.A. & Cortelli J.R. 2003. Características microbianas na saúde e doença periodontal. *Revista Biociências de Taubaté*. 9(2): 45-51.
- 5 Fonseca A.S., Galera P.D., Brito D.L., Perecmanis S., Silva A.S., Cardoso L.B., Marçola T.G., Drummond V.O. & Pimental C.M. 2011. Análise microbiológica da placa bacteriana da doença periodontal em cães e o efeito da antibioticoterapia sobre ela. *Ciência Rural*. 41(8): 1424-1429.
- 6 Gaetti-Jardim Jr. E., Monti L.M., Nicolas Ciesielski F.I., Gaetti-Jardim E.C., Okamoto A.C., Schweitzer C.M. & Avila-Campos M.J. 2012. Subgingival microbiota from *Cebus apella* (capuchin monkey) with different periodontal conditions. *Anaerobe*. 18: 263-269.
- 7 Hirai N., Shirai M., Kato Y., Murakami M., Nomura R., Yamasaki Y., Takahashi S., Kondo C., Matsumoto-Nakano M., Nakano K. & Asai F. 2013. Correlation of age with distribution of periodontitis-related bacteria in Japanese dogs. *The Journal of veterinary medical*. 75(7): 999-1001.
- 8 Liang S., Krauss J.L., Domon H., McIntosh M.L., Hosur K.B., Qu H., Li F., Tzekou A., Lambris J.D. & Hajishengallis G. 2011. The C5a receptor impairs IL-12-dependent clearance of *Porphyromonas gingivalis* and is required for induction of periodontal bone loss. *The Journal of immunology*. 186(2): 869-877.
- 9 Martini A.C., Gomes L.G., Pitchenin L.C., Pizzinatto F.D., Sônego D.A., Almeida E.D.B., Spiller P.R., Costa M.S.M., Nakazato L. & Souza R.L. 2017. *Porphyromonas gingivalis* na cavidade oral de neonatos da raça Bulldog Inglês. *Acta Scientiae Veterinariae*. 45: 1454.
- 10 Munchow E.A., Albuquerque M.T., Zero B., Kamocki K., Piva E., Gregory R.L. & Bottino M.C. 2015. Development and characterization of novel ZnO-loaded electrospun membranes for periodontal regeneration. *Dental materials*. 31(9): 1038-1051.
- 11 Rossi Jr. J.L., Gioso M.A. & Falqueiro L.M.F. 2007. Estudo comparativo sobre prevalência de doença periodontal em *Panthera onca* mantida em cativeiro e em indivíduos de natureza. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 27(5): 209-214.
- 12 Sambrook J. & Russel D.W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp.565-567.
- 13 Slots J., Ashimoto A., Flynn M.J., Li G. & Chen C. 1995. Detection of Putative Periodontal Pathogens in Subgingival Specimens by 16S Ribosomal DNA Amplification with the Polymerase Chain Reaction. *Clinical infectious diseases*. 20(2): 304-307.
- 14 Suzuki N., Yoshida A., Toshiyuki S., Kawada M. & Nakano Y. 2004. Quantitative Microbiological Study of Subgingival Plaque by Real-Time PCR Shows Correlation between Levels of *Tannerella forsythensis* and *Fusobacterium* spp. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(5): 2255-2257.