

10^o

FEPEG FÓRUM

ENSINO • PESQUISA
EXTENSÃO • GESTÃO
RESPONSABILIDADE SOCIAL: INDISSOCIABILIDADE
ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA



ISSN 1806-549 X

Autor(es): HANDRESSA MAGALHÃES FERREIRA, VITELHE FERREIRA DE ALMEIDA, RONIZE VIVIANE JORGE FARIA, FABIANA DA SILVA VIEIRA MATRANGOLO, SÉRGIO AVELINO MOTA NOBRE

Seleção de marcadores para caracterização genotípica de *Streptococcus* do grupo *mutans*

Introdução

Streptococcus do grupo *mutans* são considerados os principais agentes etiológicos da cárie dentária (NAPIMOGA et al., 2004). *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* são espécies de estreptococos grupo *mutans* implicadas na iniciação e progressão do processo de cárie dental.

Para estudos epidemiológicos da cárie necessita-se um método de identificação e diferenciação rápida, sensível e simples entre microrganismos orais (IGARASHI et al., 2001; AMOROSO et al., 2004). Técnicas moleculares fornecem ferramentas para evidenciar, e entender melhor, diversos aspectos relacionados diretamente ou indiretamente ao DNA. Desta forma, a análise dos ácidos nucleicos vem sendo amplamente utilizada na diferenciação de indivíduos e no esclarecimento filogenético dos organismos estudados (FERREIRA, 2000).

Na técnica de AP-PCR (*arbitrarily primed PCR*), segmentos de DNA do organismo estudado são amplificados utilizando-se um ou mais *primers* de seqüência arbitrária em condições de menor adstringência. A principal vantagem da técnica de AP-PCR é que não é necessário um conhecimento prévio da seqüência de DNA da espécie bacteriana em estudo. Esta técnica é relativamente fácil e rápida para ser realizada.

Em Microbiologia Bucal, a análise de DNA baseada em traços do genótipo oferece uma rápida e realista identificação das bactérias, comparada com métodos baseados em caracterização do fenótipo. Esse trabalho teve como objetivo selecionar marcadores moleculares para caracterização genotípica de *Streptococcus* do grupo *mutans*.

Material e métodos

A. Obtenção de biomassa

Para obter-se a biomassa necessária para a extração de DNA e reação de PCR, dez isolados de *Streptococcus* do grupo *mutans*, aleatoriamente selecionados, da coleção do Laboratório de Epidemiologia e Biocontrole de Microrganismos, juntamente com as cepas de referência de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, foram inoculados em placas de Petri contendo ágar BHI por 24 horas à 37°C em microanaerofilia (Tabela 1). Após o período de incubação, os isolados foram transferidos para três placas com ágar BHI e incubadas por mais 24 horas. Os isolados de duas placas foram transferidos para tubos Falcon com solução salina e armazenados a -20°C, enquanto que os isolados da outra placa foram transferidos para outras três placas e incubados por mais 48 horas. Em seguida, transferidos para tubos Falcon com solução salina e armazenados a -20°C.

B. Extração de DNA

As amostras foram centrifugadas à 3000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartados. Em seguida as amostras foram lavadas 2 vezes com 10 µL de tampão TE e submetidos a banho de fervura por 10 minutos.

Em seguida 10 µL do sobrenadante foi utilizado para a quantificação do DNA, para tal foram acrescentados 2 µL de tampão de amostra ao sobrenadante, analisado em gel de eletroforese em agarose à 1% e visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta.

Os sobrenadantes obtidos foram transferidos para tubos eppendorf sde 200 µL estéril.

C. Reação de PCR

Foi preparado um mix de PCR com 1,5 unidades de Taq DNA polimerase, 0,4 mM para cada dNTP, 4 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), 0,4 mM de primer, 10 mM de tampão da enzima 1X e 1 µL de DNA uma reação de 15 µL. Foram utilizados três primers: OPA-02, OPA-03 e OPA-13.

As condições de amplificação foram as descritas por MOREIRA (2006), 40 ciclos com as seguintes condições: 30 segundos a 94°C; 30 segundos a 36°C e um minuto a 72°C. Foram utilizados cinco minutos a 94°C para desnaturação inicial e três minutos a 72°C de extensão final. Os produtos da reação de PCR foram analisados em gel de eletroforese em agarose à 1% e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta.

Resultados e discussão



A. Extração de DNA

Ao analisar os sobrenadantes obtidos na extração de DNA no gel de agarose, notou-se uma quantidade satisfatória de DNA genômico, porém houve a presença de DNA degradado e RNA em algumas amostras (Fig. 1).

B. Amplificação de PCR

Os produtos de PCR obtidos com o primer OPA-02 não apresentaram bandas visíveis no gel de eletroforese (Fig. 2). O que indica que a metodologia usada na reação não foi adequada a este primer e implica em ajuste metodológicos. Este tem sido utilizados por outros autores com resposta positiva. Outra perspectiva é que o primer OPA-02 não possa ser utilizado para esse conjunto de isolados, caracterizando uma variabilidade genética em relação ao que está descrito por MOREIRA (2006). Nesse sentido estamos preparando reações que permitam o ajuste da metodologia. Ainda estamos testando outros primer com a mesma finalidade.

Conclusão

A fonte imediata destas bactérias é o ambiente porque é a mais plausível fonte de bactéria bucal, pois as crianças adquirem, durante seu desenvolvimento, seus microrganismos da microbiota primitiva (OLIVEIRA JR., VIANNA, 2004). A importância do conhecimento sobre a experiência de cárie na dentição decídua deve-se ao fato desta ser considerada o mais forte preditor de cárie na dentição permanente (GAVAZZI et al., 1995). Os marcadores moleculares, baseados em PCR, podem ser utilizados no estudo de evolução molecular, na detecção de infecções microbianas através da amplificação do DNA do patógeno com oligonucleotídeos iniciadores específicos ao seu genoma (NEIVA, 2007). No entanto, precisamos buscar os melhores marcadores e ajustes metodológicos.

Agradecimentos

Agradecimentos mais que especiais a toda equipe do Laboratório de Epidemiologia e Biocontrole de Microrganismos por todo apoio e ajuda durante o processo.

Referências bibliográficas

- AMOROSO, P.; et al. **Avaliação Comparativa da PCR e fenotipagem na detecção de Streptococcus sobrinus e Streptococcus mutans e estudo da transmissão.** Cienc Odontol Bras 7 (2). p. 30-40. 2004.
- FERREIRA, L. F.; et al. **Paleoparasitology of Chagas disease revealed by infected tissues of Chilean mummies.** Acta Tropica 75. p. 79-84. 2000.
- IGARASHI, T.; et al. **Identification of Streptococcus salivarius by PCR and DNA probe.** Letters in Applied Microbiology, 32. p. 394-397. 2001.
- MOREIRA, M. **Variabilidade genética de Streptococcus mutans em isolados intrafamiliares, por meio de marcadores RAPD.** Curitiba, 2006. 107p. (Dissertação de Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia). Setor de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Paraná. 2006.
- NAPIMOGA, M. H.; et al. **Genotypic diversity and virulence traits of Streptococcus mutans in caries-free and caries-active individuals.** J Med Microbiol.53. p. 697-703.
- NEIVA, I. F. **Caracterização molecular de biosorotipos selvagens de Streptococcus mutans isolados de crianças com diferentes históricos da doença cárie.** Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.



Tabela 1. Isolados de *Streptococcus* do grupo *mutans* originários de biofilmes, posicionados nas faces vestibular e palatina, da cavidade oral de crianças em fase de escolarização.

| Isolado |
|---------|
| C04PA |
| C04PD |
| C04VB |
| C12PA |
| C12PD |
| C12VA |
| C16P |
| C16VB |
| C61P |
| C61V |

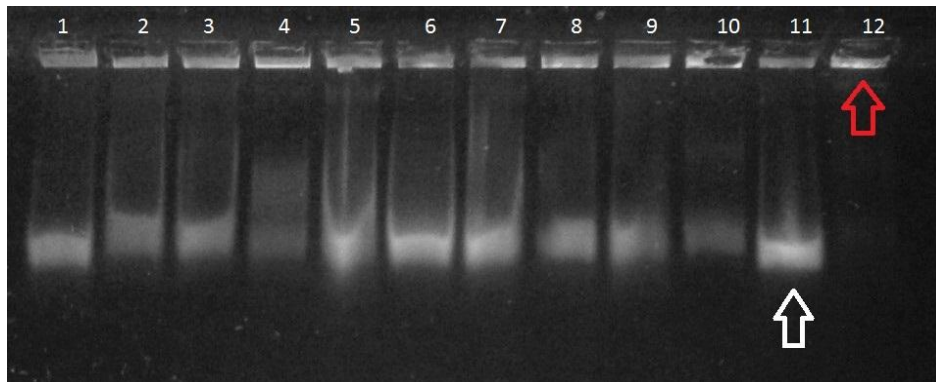


Figura 1. Gel de eletroforese em agarose obtido na extração de DNA, onde é possível observar os DNAs genômicos (seta vermelha) e RNAs (seta branca). Os arrastes indicam degradação de DNA. A amostra 12 (Cepa de referência *Streptococcus mutans*) é a que apresenta menos arraste.

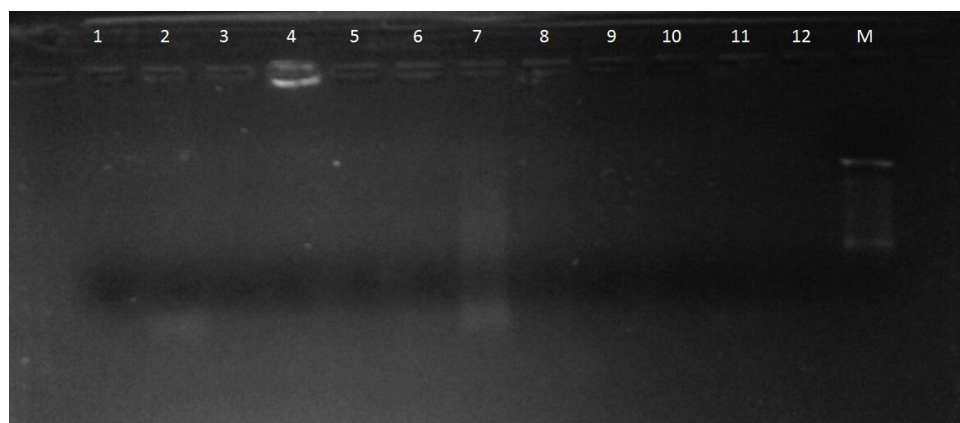


Figura 2. Gel de eletroforese obtido com a reação de PCR. É possível observar que no poço 7 (C12VA) houve um leve arraste, mas nos demais poços não houve o surgimento de bandas.