9º FEPEG FÓRUM DE ENSINO, PESQUISA, EXTENSÃO E GESTÃO
TRABALHOS CIENTÍFICOS APRESENTAÇÕES ARTÍSTICAS E CULTURAIS DEBATES MINICURSOS E PALESTRAS
23 A 26 SETEMBRO DE 2015
Campus Universitário Professor Darcy Ribeiro
ISSN 1806-549X
A HUMANIZAÇÃO NA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO

ANÁLISE COMPARATIVA DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE *STREPTOCOCUS* GRUPO *MUTANS*

Vitelhe Ferreira de Almeida, Handressa Magalhães Ferreira, Jotta Junior Novaes, Thaís Tiemi Yoshinaga, Fabiana da Silva Vieira Matrangolo, Sérgio Avelino Mota Nobre

Introdução

Streptococcus é um gênero bacteriano polifilético cujas células são esféricas com arranjo catenulado, gram-positivas e frequentemente estão associadas com doenças. Espécies do agrupamento taxonômico denominado *mutans* vêm sendo relatadas como principais causadoras da carie dental em humanos, em especial a espécie tipo *Streptococcus mutans* que é considerada em maior prevalência [1]. Outras espécies como *S. sobrinus* também está relacionado com o surgimento dessa doença, porém com menos incidência, apesar de apresentar uma maior virulência que *S. mutans*. Esses microrganismos se estabelecem em diferentes localidades na cavidade bucal, em consequência de vários fatores como número de dentes irrompidos [1], higienização inadequada entre outros aspectos, assim levam a sérios danos causando desmineralização aos dentes, por consequência dos ácidos láticos que essas produzem em presença de glucose. [2]

A variabilidade genética de microrganismos pode ser detectada por testes bioquímicos e métodos genéticos moleculares sendo que cada um apresenta vantagens especificas. Considerando que *S. mutans* é a causa de doença que afeta um grande número de pessoas, á diversos estudos em torno de sua caraterização e variabilidade genética, com isso a analise de melhores métodos mais eficientes de extração de DNA se torna relevante. [3].

O trabalho com coleções biológicas é normalmente feito com várias amostras, obtidas em diferentes situações. O Laboratório de Epidemiologia e Biocontrole de Microrganismos da Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes), possui uma coleção de isolados de *Streptococcus* do grupo *mutans* em criopreservação à -80ºC. Os testes bioquímicos realizados não permitiram uma discriminação entre *S. mutans* e *S. sobrinus*. Fazendo-se necessário o uso de métodos moleculares para tal.

O objetivo desse trabalho foi selecionar métodos de extração de DNA de *Streptococcu*s grupo *mutans* descritos na literatura, buscando uma metodologia de extração de DNA que fosse rápida, eficiente, não utilizasse reagentes tóxicos e, ainda, fosse econômica.

Material e Métodos

Para a realização desse trabalho foram selecionados microrganismos viáveis e que cresceram em ágar *Mitis salivarius* acrescido de sacarose, bacitracina e telurito de potássio(Fig. 2B). Estes pertencentes à coleção do Laboratório de Epidemiologia e Biocontrole de Microrganismos da Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes), que se encontra em criopreservação à -80ºC.

O Meio de cultura usado para cultivo foi BHI. Foram inoculadas quatro cepas, sendo as cepas referencia de *S. mutans*, e *S. sobrinus* e dois isolados que tiveram comportamento divergente nos testes bioquímicos, C26VP e C26VB (Fig. 2A). Após 12h de cultivo em condições de microaerofilia à 37ºC as células foram coletadas das placas, centrifugadas, o meio de cultura foi retirado e os sedimentos foram utilizados para extração de DNA. Para todas as amostras foram aplicados 10 µL de solução em gel de agorose 1% corado com brometo de etídeo e analisado em transiluminador.

Foram selecionados da literatura três métodos que atendiam aos critérios de rapidez, eficiência e economia descritos por Nascimento *et al*.,[3].
No primeiro método os sedimentos obtidos foram lavados duas vezes e resuspensos em 100 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCI, 1 mM EDTA, pH 8,0), e submetidos a um banho de fervura por dez minutos. Foram usados 10 µL do sobrenadante para eletroforese em gel de agarose.

No segundo método de extração, os sedimentos foram resuspensos em uma solução contendo 100 µL de tampão TE e 50 µL de dodecilssulfato de sódio (SDS) a 10%. Foram colocadas em banho-maria a 65°C por 30 minutos. As suspensões foram centrifugadas a 6000 rpm por 5 minutos e os sobrenadantes descartados. Em forno de microondas os sedimentos foram aquecidos por dois minutos e trintas segundos. Os sedimentos foram dissolvidos em 180µl de água

Milli-Q e armazenados a -20°C. Foram usados 10 µL da solução resultante para eletroforese em gel de agarose como no primeiro teste.
A terceira metodologia testada foi a sugerida por OHO *et* a/. [4] e também testado por Nascimento et al., [3]. Os sedimentos foram resuspendidos em 200 µL de uma solução de lise (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, pH 8,0) e aquecidas durante dez minutos. Em seguida, foram centrifugados e 10 µL do sobrenadante usados na eletroforese em gel de agarose.

Resultados e Discussões

Muitas técnicas para extração de DNA de *Streptococcus* do grupo *mutans* foram encontradas descritas na literatura, no entanto, muitas delas não são viáveis. Algumas metodologias não apresentam resultados satisfatórios, outras preconizam o uso de agentes tóxicos, como fenol e clorofórmio, que pretendemos evitar [5]. Foi considerado ainda o tempo, quando mais rápido melhor. Os resultados estão sumarizados na tabela 1.

Dentre os três testes analisados o que mostrou maior grau de eficiência, nos itens rapidez, presença de DNA, em boa quantidade e qualidade, e ainda, de baixo custo foi o primeiro teste. Utilizando apenas o tampão TE (Tris-EDTA), podemos observar que houve presença de bandas de DNA de maior intensidade, em todas as amostras submetidas a esse método de extração (Fig. 1). Em relação aos outros métodos, observamos que no segundo método testado (TE + SDS) a quantidade e a qualidade do DNA variou com a amostra, não apresentando resultado uniforme e que as várias bandas presentes na sétima canaleta, amostra C26PB, podem indicar a degradação do DNA durante o aquecimento em microondas.

Vale resaltar que a ausência de bandas nas quatro amostras em que foi utilizada a terceira metodologia (TE + Triton), como mostrado na tabela 1, não significa, necessariamente, que não há presença de DNA nas amostras e sim que a concentração foi baixa, uma vez que o limite de detecção do brometo de etídeo é de 50 ng. Aplicando-se uma maior quantidade de amostra ou concentrando poderíamos ter um resultado positivo. Os resultados corroboram com os trabalhos já realizados onde também concluíram que o primeiro método (TE) é realmente mais eficiente na extração de DNA de *Streptococcus* do grupo *mutans*, apresentando melhores resultados como rapidez e economia [3].

Conclusão

A diversidade de metodologias disponíveis e grande variação entre elas, com relação ao tempo de execução e ao tipo de reagentes usados levou a busca de um método que pudesse atender a necessidade de extrair DNA de um grande número de isolados de *Streptococcus* Grupos *Mutans* com rapidez, economia e eficiência.

Concluímos que técnica mais eficiente e econômica, em que o resultado foi mais uniforme para cepas diferentes, com excelente relação custo benefício, levando em consideração a simplicidade da técnica e rapidez foi a primeira metodologia testada. Com uso apenas de tampão TE e fervura conseguimos obter DNA com uma boa quantidade e qualidade, em relação à quantidade de células de partida. Essa será a metodologia escolhida para prosseguirmos os estudos da coleção biológica.

Referências

[1] CAUFIELD, P.W; CUTTER, G.R; DASANAYAKE, AP. lnilial acquisition of mutans streptococcí by infants: evidence for a díscrete window of infectívíty,J Dent Res, Washington, v. 72, n.1, p.37 -45, Jan. 1993.

[2] MAKAYA, NÁDIA ISABEL DA COSTA. Avaliação do crescimento de culturas de Streptococcus mutans e de atividade de glucosiltransferase. Faculdade de Ciencias da Universidade de Lisboa. Departamento de Química e Bioquímica, Jul. 2007.

[3] NASCIMENTO MM, Höfling JF, Gonçalves RB. Streptococcus mutans genotypes isolated from root and coronal caries. Caries Res. 2004;38:454-63.

[4] OHO, *et ai.* Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* ín human saliva by polymerase reaction. *Oral Microbiol* v. 15, Aug 2000.

[5] AMOROSO P., Franco e Franco, Marin, Avilar, Avaliação da PCR e fenotipagem de Streptococcus sobrinus e streptococcus Mutans e estudo da transmissão. Retriwved on: 20 july 2015.

Tabela 1. Comparação da eficiência da extração de DNA de diferentes amostras de *Streptococcus* Grupos *mutans* utilizando-se três metodologias diferentes.

Nº	Amostras	Tratamentos	Resultados
1	*S. Sobrinus*	TE	+ ++
2	*S. Mutans*	TE	+ + +
3	C26PB	TE	+ + +
4	C26VB	TE	+ + + +
5	*S. Sobrinus*	TE + SDS	- - -
6	*S. Mutans*	TE + SDS	+ - -
7	C26PB	TE + SDS	+ + +
8	C26VB	TE + SDS	- - -
9	*S. Sobrinus*	TE + Triton	- - -
10	*S. Mutans*	TE + Triton	- - -
11	C26PB	TE + Triton	- - -
12	C26VB	TE + Triton	- - -

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 1% de amostras de DNA extraídas por diferentes métodos. Metodologia TE, amostras 1,2,3 e 4; Metodologia TE+ SDS, amostras 5, 6, 7 e 8; Metodologia TE+ Triton, amostras 9,10, 11 e 12 (sendo que as duas últimas canaletas foram omitidas). As setas indicam a presença de DNA.

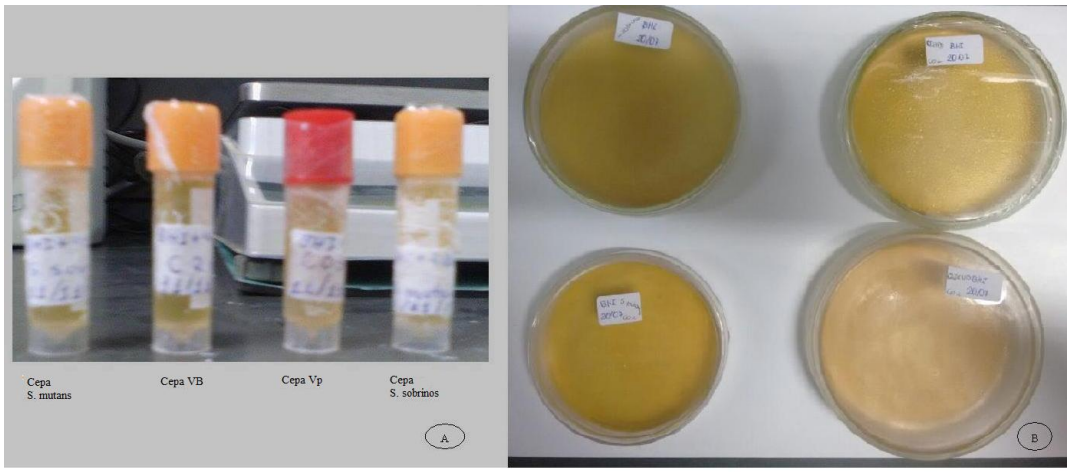

Figura 2. Na Figura 2A as cepas escolhidas da coleção de isolados de *Streptococcus* do grupo *mutans* que estavam em criopreservação à -80ºC. Figura 2B bactérias crescidas em meio de cultura BHI.