DENISE MADALENA PALOMARI

= Bióloga =

PROTEINAS TOTAIS DE ESPÉCIES DE *Streptococcus* ORAIS. ASPECTOS DE ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental (Área de Microbiologia) da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

PIRACICABA - SP

= 1992 =

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

DENISE MADALENA PALOMARI

= Bióloga =

PROTEINAS TOTAIS DE ESPÉCIES DE *Streptococcus* ORAIS. ASPECTOS DE ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Orientador: Prof. Dr. JOSÉ FRANCISCO HÖFLING

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental (Área de Microbiologia) da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

PIRACICABA - SP

= 1992 =

Ao meu marido LUÍS CARLOS, pela compreensão, incentivo e amor transmitido a todo instante.

Ao meu filho FERNANDO, que desponta para a vida a qual, unidos, devemos palmilhar.

À meus pais **FRANCISCO** e **DALVICE**, meus grandes incentivadores, que com amor e orientação segura, foram fundamentais para a conquista de um ideal.

À minha irmã **EVANISI** e minha sobrinha **MAYTA**, pelo apoio e amor que sempre me proporcionaram.

Ao Prof. Dr. JOSÉ FRANCISCO HÖFLING,
Professor Titular do Departamento de Diagnóstico Oral da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pela orientação, apoio, amizade e elevado sentido de responsabilidade científica que procurou transmitir,

o meu respeito e gratidão.

AGRADECIMENTOS

À **FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA** - UNICAMP, pela oportunidade que me foi concedida para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Ao prof. Dr. **EDISON DUARTE**, pelo importante papel de educador, amigo e incentivador.

À Prof^a. **MÁRCIA P. A. MEYER**, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela gentileza em nos ceder as diversas cepas microbianas usadas, sem as quais não seria possível a realização deste trabalho, nossos atradecimentos.

Ao Prof. Dr. **JAIME APARECIDO CURY**, pela colaboração, incentivo e apoio técnico.

Ao Prof. Dr. **CELSO PAULINO DA COSTA**, pela amizade e apoio.

Ao colega **NILSON JOSÉ MORAL**, pela colaboração e amizade constantes.

À colega **ROSANGELA VERLENGIA**, pelo incentivo e amizade com que me distinguiu.

À **COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA E PATOLOGIA BUCO DENTAL** da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pelos ensinamentos recebidos.

Aos demais Professores do Curso de Mestrado em Biologia e Patologia Buco-Dental, pelos ensinamentos, boa vontade e compreensão durante o decorrer do referido curso.

Aos funcionários da Área de Microbiologia e Imunologia, **ELZA MARIA THOMAZINI**, **ANDERSON LAERTE TEIXEIRA** e **WILMA CORREA FERRAZ**, pela participação, apoio, amizade e colaboração na realização desta pesquisa.

À Sra. **MARISA DE JESUS CARLOS SOARES** e Sr. **WALDOMIRO VIEIRA FILHO**, pela colaboração técnica na realização deste trabalho.

Às Sras. **IVANI ODAS DEMETRIO**, **MARIA APARECIDA SANTIAGO VARELLA** e **ELIENE APARECIDA ORSINI** pela imensa amizade.

Ao Sr. **IVES ANTONIO CORAZZA**, pelo imprescindível trabalho de digitação.

Ao Prof. Dr. **MURILO DE MELLO**, do Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC) pela colaboração e apoio técnico.

Aos Sr. **LUÍS SPOLIDORIO**, Sra. **NAIR BETTIOL SPOLIDORIO** e **LUCILENE APARECIDA SPOLIDORIO**, pelo carinho constante que sempre demonstraram.

Ao **CNPq - CAPES** e **FAEP**, importantes instituições de apoio e fomento a pesquisa no País, nossos agradecimentos.

e a todos que colaboraram, direta ou indiretamente, na concretização deste trabalho,

o meu agradecimento.

ÍNDICE

1 - INTRODUÇÃO 1

2 - REVISÃO DA LITERATURA. 3

3 - MATERIAL E MÉTODOS 24

4 - RESULTADOS 32

5 - DISCUSSÃO 58

6 - CONCLUSÕES 65

7 - RESUMO 67

8 - SUMMARY. 69

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 71

10 - APÊNDICE 86

INTRODUÇÃO

Os microrganismos pertencentes ao gênero *Streptococcus*, tem despertado o interesse de elevado número de pesquisadores, pelos vários processos patológicos que determinam no homem e nos animais. Tais microrganismos, usualmente alcançam lugares distantes do organismo via corrente sanguínea, podendo ser considerados patógenos oportunistas, promovendo doenças como endocardite bacteriana, lesões purulentas no cérebro e abdomem, bacteremia dentária e outros processos infecciosos da boca.

Do ponto de vista oral, a cárie dental, a mais comum das doenças humanas, é uma doença infecciosa de alta prevalência em âmbito praticamente mundial, e é caracterizada pela descalcificação e desintegração dos tecidos duros dos dentes. Esse processo, inicia-se pela desmineralização do esmalte por ácidos orgânicos que são produzidos localmente por bactérias anaeróbicas facultativas do gênero *Streptococcus*, espécie *mutans*, constituindo-se assim, em uma doença bacteriana. Embora tenha sido originalmente descrito em 1924 por **CLARKE**, somente a partir das últimas décadas ficou demonstrada a relação desse microrganismo com a cárie dental, através de estudos em animais gnotobiotos e também no homem.

Desde que se demonstrou a capacidade cariogênica do *S. mutans*, inúmeras pesquisas têm sido realizadas, sob os mais variados aspectos do ponto de vista microbiológico, bioquímico, genético, imunológico, etc.

No campo da Microbiologia Oral, ficou demonstrado que o grupo *mutans* do gênero *Streptococcus* é integrado pelas espécies *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. cricetus*, *S. rattus*, *S. ferus* e *S. macacae*, motivando dessa forma os pesquisadores a estudarem essas espécies de modo geral, e particularmente com ênfase na identificação e caracterização desses microrganismos, já que estes organismos são fenotipicamente semelhantes, mas que diferem em suas características biológicas, constituição genética e reações sorológicas. Nesse aspecto, a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, tem sido aplicada no estudo de proteínas bacterianas, envolvendo isolados de várias regiões da cavidade oral, como sulco gengival, saliva, placa dental, com o objetivo de identificar e caracterizar esses microrganismos.

Com o objetivo de dar uma contribuição aos estudos de identificação e caracterização de *Streptococcus* da cavidade oral, amostras de culturas do grupo *mutans* isoladas e identificadas bioquimicamente, foram analisadas através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, empregando-se metodologias distintas na obtenção de proteínas.

REVISÃO DA LITERATURA

Devido a grande diversidade de espécies, os *Streptococcus* são encontrados em vários habitats naturais, como na pele e mucosas da boca, trato respiratório, digestivo e genitourinário do homem e animais. Podem estar presentes no leite e seus derivados, em plantas, insetos, alimentos e águas contaminadas (**MUNDT**, 1982). Esses microrganismos, morfologicamente são cocos Gram-positivos, usualmente dispostos aos pares ou em cadeias, anaeróbios facultativos ou estritos, incluindo várias espécies no gênero. São fermentadores de glicose com formação de ácido láctico, geralmente são imóveis (**GRAUDAL**, 1982), não formam esporos e ocasionalmente exibem cápsula, como é o caso do chamado *Streptococcus epidemicus*, isolado por ocasião de uma epidemia de amigdalite relacionada ao uso de leite infectado (**BIER**, 1984). A presença de fímbrias foram observadas em *Streptococcus sanguis* (**HENRIKSEN & HENRICHSEN**, 1975) e em *Streptococcus salivarius* (**HANDLEY et al**,1984).

Os microrganismos pertencentes ao gênero *Streptococcus*, tem despertado o interesse de um elevado número de pesquisadores pelos numerosos processos patológicos que determinam nos animais e no homem, particularmente na cavidade oral. A revisão da literatura demonstra que esses microrganismos tem sido extensivamente estudados sob vários pontos de vista, inclusive taxonômico, morfo

lógico, bioquímico, genético, patológico, etc.

De modo geral, a sistemática tem função de resolver duas questões de interesse, isto é, coordenar em grupos a enorme variedade de formas observadas na natureza e classificar esses grupos de maneira a permitir o reconhecimento de suas múltiplas relações de afinidade.

A sistemática das bactérias está ainda muito longe de atingir a fase em que se encontra a sistemática dos animais e plantas superiores. Esse fato se explica, em parte, pela circunstância de que, a maioria dos bacteriologistas, mais interessa o estudo do comportamento das bactérias do que o da sua natureza, sob o ponto de vista botânico. Por outro lado, deve-se considerar uma série de dificuldades intrínsecas que embaraçam a definição de espécie em Bacteriologia e, conseqüentemente, a taxonomia bacteriana, tais como a escassez de dados morfológicos e conseqüente necessidade de investigar caracteres fisiológicos mais ou menos complexos, como fermentação de açúcares, reações sorológicas, patogenicidade, etc. Uma vez verificada qual a associação de caracteres que mais freqüentemente se apresenta para uma determinada espécie bacteriana, deve o bacteriologista certificar-se de que tais caracteres são efetivamente estáveis, pois dada a grande rapidez com que se sucedem as gerações bacterianas, é compreensível que as forças de variação e de seleção atuem muito mais intensamente sobre as bactérias do que sobre os animais e vegetais (BIER, 1984).

A classificação para o estudo dos estreptococos, origi-

nalmente está baseada na placa de agar sangue. Desse modo, pode-se diferenciar 4 tipos de estreptococos, de acordo com o seu comportamento nas placas de agar sangue, ou seja, o tipo alfa ou viridante, que produz em torno das colônias halo de hemólise parcial de cor verde; o tipo beta ou hemolítico, que produz área de clareamento por hemólise total; o tipo alfa-primo, intermediário entre os precedentes exibindo halo interno do tipo alfa e halo externo tipo beta (**PARKER**, 1983); e por último, o tipo gama ou inerte, que não produz coloração verde, nem halo de hemólise. Além do comportamento em agar sangue, tem sido utilizado para a classificação desses microrganismos, provas bioquímicas como fermentação de carboidrato, e provas sorológicas (**LANCEFIELD**, 1933), obtidas através de reações de precipitação com soros específicos.

Devido a grande diversidade do grupo dos estreptococos, vários estudos foram realizados para organizar esses microrganismos dentro de certos grupos. Assim, **SHERMAN** (1937), propôs 4 divisões para o grupo: piogênico, viridans, láctico e enterococo. Posteriormente, **BRIDGE & SNEATH** (1983), em estudos numéricos com *Streptococcus*, propuseram uma divisão em 7 grandes grupos designados por enterococos, paraviridantes, láctico, termofílico, viridantes, piogênico e parapiogênico.

Os estreptococos piogênicos - que quase invariavelmente são beta hemolíticos - atraem grandemente o interesse da comunidade científica pelo seu potencial patogênico, sendo freqüentemente observado em infecções como faringites, tonsilites, escarlatina e febre reumática. Não menos importante, estão os estreptococos do

grupo viridantes, que ocorrem na microbiota da boca e intestino, podendo passar para o sangue e localizar-se em válvulas previamente lesadas, dando origem à condição clínica denominada endocardite bacteriana subaguda. Três são as espécies de estreptococos viridantes que têm sido isoladas de casos de endocardite: *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus mitis*.

A microbiota oral se apresenta como um complexo ecossistema, contendo uma grande variedade de espécies microbianas (**HAMADA & SLADE**, 1980). Os principais tipos de microrganismos encontrados na cavidade oral, são os estreptococos que compreendem proporções significantes da microbiota apresentando 45% do total da superfície dorsal da língua, 46% da saliva, 28% da placa dentária e 29% da fenda gengival (**MEJARE & EDWARDSSON**, 1975). Nas últimas décadas, esses microrganismos têm chamado a atenção dos pesquisadores, como um microrganismo específico da cárie dentária, estando entre os primeiros colonizadores da cavidade oral após o nascimento, sendo que, algumas espécies como *S. sanguis* e *S. mutans*, somente fazem parte dessa flora após a erupção dos primeiros dentes decíduos (**MC CARTHY et al**, 1965; **CARLSSON et al**, 1975). Esses últimos mostram-se indutores de cárie no homem e nos animais. Outras espécies de estreptococos encontrados na boca, estão presentes em algumas infecções sistêmicas como a endocardite bacteriana, infecções purulentas do fígado, cérebro e outras (**COYKENDALL**, 1989).

Do ponto de vista patogênico, a cárie dental humana, é uma doença infecciosa de alta prevalência em âmbito praticamente

mundial, e é caracterizada pela descalcificação e desintegração dos tecidos duros dos dentes. Esse processo, inicia-se pela desmineralização do esmalte por ácidos orgânicos que são produzidos localmente por bactérias, constituindo-se assim, em uma doença bacteriana. As bactérias que estão primariamente associadas à decomposição dental do homem, são estreptococos anaeróbios facultativos do gênero *Streptococcus*, espécie *mutans*.

Os *S. mutans* caracterizam-se como alfa (α) ou gama (γ) hemolíticos em agar sangue (**FACKLAM**, 1977). A ocorrência do tipo beta (β) hemólise em *S. mutans*, tem recebido pequena atenção na literatura, e somente tem sido mencionada acidentalmente em poucos estudos como os de **FACKLAM** (1974, 1977), **PERCH et al** (1974), **PARKER & BALL** (1976) e **WOLFF & LILJEMARK** (1978). A existência de estreptococos beta hemolíticos na cavidade oral é de considerável interesse pela sua possível virulência (**WOLFF & LILJEMARK**, 1978; **WOLTJES et al**, 1979). O comportamento desses microrganismos em relação ao oxigênio, foram descritos por **WOLTJES et al** (1981), os quais estudando a produção de beta hemólise em *S. mutans*, mostraram ser a anaerobiose estrita, uma condição indispensável para a expressão da beta hemólise em *S. mutans*, confirmando a observação de **FACKLAM** (1976) de que condições de anaerobiose estimulam a expressão de beta hemólise em estreptococos piogênicos.

A maioria dos estreptococos da cavidade oral pertencem ao grupo viridantes (**BRIDGE & SNEATH**, 1983). O interesse por esses microrganismos aumentou significantemente, devido a algumas espécies serem importantes patógenos da microbiota bucal, além de

estarem associados com a cárie dental. Nas últimas décadas, a classificação desse grupo de microrganismos, sofreu grandes alterações graças aos estudos de **COLMAN & WILLIAMS** (1972), **COLMAN** (1976), **HARDIE & BOWDEN** (1976).

Segundo o Manual de **BERGEY'S** (1986), as espécies de *Streptococcus* facilmente encontrados na cavidade oral são *S. salivarius*, *S. sanguis*, *S. mitior*, *S. milleri*, *S. mutans*, *S. rattus*, *S. cricetus*, *S. sobrinus* e *S. ferus*. As características fisiológicas das colônias desses microrganismos, de modo geral, podem ser diferenciadas pela habilidade de fermentar certos açúcares (especialmente manitol e sorbitol) e aderir à superfícies lisas na presença de sacarose (**HARDIE & BOWDEN**, 1976), demonstrando, portanto, diferenças em suas características físico-químicas e bioquímicas, quando comparadas.

Streptococcus salivarius

Cepas de *S. salivarius* (**SHERMAN et al**, 1943), produzem levano quando crescidas em sacarose e conseqüentemente formam grandes colônias côncavas em agar *mitis salivarius* (**NIVEN et al**, 1941). Não fermentam sorbitol e manitol. As colônias de *S. salivarius* não são hemolíticas em agar sangue. A hemólise por algumas cepas depende do uso de sangue de cavalo como base contendo amido (**SAUNDERS & BALL**, 1980). A sorologia desta espécie ainda não ficou completamente esclarecida. Cepas designadas sorotipo I (**SHERMAN et al**, 1943) reage com antisoro do grupo I (**WILLIAMS**,

1956; **MONTAGNE & KNOX**, 1968) e possui reação cruzada com antisoro de *Streptococus* MG (*S. anginosus* ou *S. milleri*) de acordo com **MIRICK et al** (1944). Aproximadamente, 50% de cepas de *S. salivarius* estudadas de isolados clínicos pertencem ao grupo K positivo (**PARKER & BALL**, 1976; **FACKLAN**, 1977). Esses microrganismos são comumente encontrados na cavidade oral do homem e animais, associados com língua e saliva. São ocasionalmente isolados do sangue em casos de endocardite (**HARDIE et al**, 1982).

Streptococcus sanguis

O nome desta espécie foi dado por **WHITE & NIVEN** (1946) a estreptococos alfa hemolíticos, isolados do sangue de pacientes com encocardite bacteriana, os quais hidrolizam, arginina e esculina, produzem peróxido de hidrogênio e formam glucano, quando crescidas em presença de sacarose. **CARLSSON** (1965), demonstrou que o habitat principal do *S. sanguis* em humanos é a cavidade oral, especialmente na placa dentária. O aparecimento deste microrganismo na cavidade oral humana se dá aos 6 meses de idade, o que corresponde com o aparecimento dos primeiros dentes (**CARLSSON** 1970), e parece ser um dos primeiros colonizadores da superfície dos dentes limpos (**TINANOFF et al**, 1976; **SOCRANSKY et al**, 1977). Níveis baixos de *S. sanguis* foram encontrados em material fecal humano (**VAN HOUTE et al**, 1971) e em isolados de solo (**GLEDHILL & CASIDA**, 1969).

Estudos sorológicos de cepas de *S. sanguis* demonstraram

a presença de 3 sorotipos diferentes designados I, II e I/II (**WASHBURN et al**, 1946). **PARKER & BALL** (1976), demonstraram que 37% das cepas de *S. sanguis* reagem com antisoro no grupo H de Lancefield e relataram os nomes *S. sanguis* e *S. mitior* para descrever os dois grupos (I e II) de organismos, enquanto **FACKLAM** (1977), prefere os termos *S. sanguis*, biotipos I e II.

Streptococcus mitior

O nome *S. mitior* foi introduzido por **SCHOTTMÜLLER** (1903) para estreptococos alfa hemolíticos isolados do trato respiratório humano e endocardite bacteriana. Esse microrganismo não produz amônia de arginina e esculina e não fermenta sorbitol e manitol. Algumas cepas produzem glucano extracelular quando crescidas em sacarose e desenvolvem colônias que são indistinguíveis dos demais estreptococos, como por exemplo *S. sanguis*. **COYKENDALL & SPECHT** (1975), em estudos com DNA, mostraram que cepas de *S. mitior* são geneticamente distintas de *S. sanguis* e que os dois grupos homólogos podem ser distinguídos dentro de *S. mitior* (**COYKENDALL & MUNZENMAIER**, 1978). Com base em estudos recentes, **MURRAY et al** (1984), descreveram uma propriedade que pode ser útil para distinguir essa bactéria do *S. sanguis*, através de uma associação da célula com neuraminidase. Esse microrganismo é amplamente distribuído na cavidade oral humana, tendo sido isolado de saliva, placa dental, fezes e infecções clínicas, particularmente endocardite bacteriana, sendo também encontrados na cavida-

de oral de animais (**DENT et al**, 1978).

Streptococcus milleri

Este nome foi originalmente proposto por **GUTHOF** (1956), para estreptococos isolados de abcessos dentários. Cepas desse microrganismo produzem ácido quando crescidos em glucose, sacarose e maltose. Usualmente não fermentam manitol, sorbitol e glicerol, embora, algumas cepas designadas de *S. milleri*, foram descritas fermentando manitol, entre outros carboidratos (**BALL & PARKER**, 1979; **RUOFF & KUNZ**, 1982). Estas cepas são geralmente sensíveis à penicilina, porém resistentes a sulfamidas e bacitracina (**MEJARE & EDWARDSSON**, 1975) e algumas à tetraciclina (**POOLE & WILSON**, 1976).

Cepas de *S. milleri* foram isoladas de várias infecções humanas, particularmente abcessos de várias partes do corpo humano. Diversos locais podem ser infectados, como boca, fígado, cérebro, aparelho genital feminino e apêndice (**POOLE & WILSON**,1976, 1979; **BALL & PARKER**, 1979). Algumas cepas mostraram ser capazes de induzir cárie dental em ratos gnotobiotos (**DRUCKER & GREEN**, 1978). Esses microrganismos são encontrados na cavidade oral de indivíduos saudáveis, predominantemente na superfície dental e fenda gengival (**MEJARE & EDWARDSSON**, 1975), nasofaringe (**HARE**, 1935) e fezes (**POOLE & WILSON**, 1979).

Streptococcus mutans

O microrganismo designado *S. mutans*, foi primeiramente isolado de lesões cariosas humanas por **CLARKE** (1924). Durante as décadas que sucederam a este achado, nenhum novo relato foi acrescido à literatura. Todavia, a partir de 1956, através de várias comunicações, esses microrganismos foram "redescobertos". Essas bactérias demonstraram causar cárie dental em ratos gnotobiotos (**FITZGERALD et al**, 1960; **GIBBONS et al**, 1966) e em hamsters convencionais (**FITZGERALD & KEYES**, 1960; **ZINNER et al**, 1965; **KRASSE**, 1966). Posteriormente, alguns estudos demonstraram que os estreptococos cariogênicos condiziam com a descrição do *S. mutans* (**CARLSSON**, 1968; **GUGGENHEIM**, 1968; **EDWARDSSON**, 1968). Várias das cepas eram de origem humana (**ZINNER et al**, 1965; **KRASSE**, 1966; **GIBBONS et al**, 1966; **GUGGENHEIM**, 1968; **EDWARDSSON**, 1968). Sendo assim, *S. mutans* permaneceu relacionado à cárie dental como o principal agente etiológico (**HOERMAN et al**, 1972; **SHKLAIR et al**, 1972).

Cepas de *S. mutans* são normalmente alfa hemolíticas, embora sejam encontrados ocasionais cepas beta hemolíticas (**PERCH et al**, 1974; **WOLFF & LILJEMARK**, 1978). A maior parte das cepas podem se desenvolver um pouco em aerobiose, porém, o desenvolvimento é aumentado em condições anaeróbicas. A glicose é utilizada por fermentação homolática, sem formação de gás. Sob condições limitadas de glicose, são produzidas quantidades significantes de formiato, acetato e etanol (**CARLSSON & GRIFFITH**, 1974; **ELLWOOD et**

al, 1979). Esses microrganismos também sintetizam polissacarídeos extra e intracelulares (**HAMADA & SLADE**, 1980). Estas cepas demonstram sensibilidade a vários anbitióticos como penicilina, ampicilina, eritromicina e outros agentes antimicrobianos. O habitat natural de *S. mutans* é a cavidade oral e a sua localização na superfície dos dentes é favorecida por dietas com altos níveis de sacarose.

Os estreptococos da cavidade oral, particularmente *S. mutans*, tem sido objeto de vários estudos morfológicos, bioquímicos, genéticos, etc., com ênfase em sistemática, originando inúmeros trabalhos que envolvem a identificação e caracterização desses microrganismos. Estudos taxonômicos realizados com várias amostras dessas espécies, demonstraram variedades correspondentes a *S. mutans* (**CARLSSON**, 1968; **COLMAN**, 1968; **DRUCKER & MELVILLE**, 1971). Nesse sentido, a existência de diferenças sorológicas entre cepas de *S. mutans* foi primeiramente observada por **ZINNER & JABLON** (1968), que demonstraram um certo grau de heterogeneidade entre as mesmas. Posteriormente, **BRATTHALL** (1970) estudando cepas de *S. mutans*, dividiu-as em 5 grupos baseados na presença de 5 diferentes antígenos específicos. Essa classificação foi baseada em reação de precipitação obtida pela difusão em gel. O autor estabeleceu os grupos sorológicos a, b, c, d, e um quinto grupo, designado por e. Os primeiros quatro tipos (a, b, c, d) possuíam antígenos específicos para *S. mutans*, enquanto que extratos do tipo e, reagiam com antisoro do tipo E de **LANCEFIELD** (1933).

Os estudos de taxonomia numérica levados a efeito por **CARLSSON** (1968) e **DRUCKER & MELVILLE** (1971), demonstraram que cepas de *S. mutans* são fenotipicamente homogêneas. No entanto, **COYKENDALL** (1970) e **DUNNY et al** (1973), obtiveram variações na constituição de base do DNA entre cepas de *S. mutans* e, posteriormente em experimentos de reassociação de DNA, demonstraram a existência de 4 grupos genéticos distintos (I a IV), levando **COYKENDALL** (1974) a propor subespécies ou "genoespécies" de *S. mutans*. Concomitantemente, **COYKENDALL et al** (1974), descreveram um novo genótipo V, isolado da boca de ratos selvagens. Posteriormente, correlacionou os genótipos com os sorotipos descritos por **BRATTHALL** (1970), afirmando que, dentre um genótipo, diferentes sorotipos e reações bioquímicas poderiam ocorrer. Subseqüentemente, **PERCH et al** (1974), com base em estudos sorológicos, propuseram dois sorotipos adicionais (f,g).

Durante esse período, um novo esquema bioquímico foi proposto por **SHKLAIR & KEENE** (1974), para separação de *S. mutans*. A identificação foi baseada em provas de fermentação de manitol, sorbitol, rafinose, melibiose e na habilidade de produzir amônia de arginina. Assim, através de características bioquímicas, a existência de 5 grupos distintos (a - e) foram descritas, relacionados aos sorotipos a - e de **BRATTHALL** (1970). **COYKENDALL** (1977), propôs elevar as diversas subespécies de *S. mutans*, à categoria de espécie, tendo como base as suas composições moleculares. As 5 espécies descritas foram: *S. cricetus*, *S. rattus*, *S. mutans*, *S. sobrinus* e *S. ferus*. **KRAL & DANEO-MOORE** (1981), propuseram mais

um esquema bioquímico de diferenciação , constituindo a modificação do sistema API 50 L*, destinado à caracterização bioquímica de lactobacilos que, associado ao esquema de **SHKLAIR & KEENE** (1974), permite a diferenciação de espécies do grupo *mutans*. Com base em estudos de taxonomia, **BEIGHTON et al** (1981), isolaram da placa dental de macacos (*Macaca fascicularis*) o sorotipo (h) - o qual estaria implicado no processo de cárie em macacos - foi intimamente relacionado ao grupo genético III (sorotipos d, g). Recentemente, **BEIGHTON et al** (1984), propuseram mais uma espécie, *Streptococcus macacae*, pertencente ao grupo *mutans*, apresentando o sorotipo c, assim como *S. mutans* e *S. ferus*; contudo, sua diferente composição genética (G + C = 35 a 36 moles %), a distingue das outras espécies que possuem o antígeno c e dos outros estreptococos do grupo *mutans*.

A comprovação de que variações em características bioquímicas, sorológicas e genéticas entre estreptococos do grupo *mutans* relacionam-se à espécie animal da qual foi isolado (**BRATTHALL**, 1970; **COYKENDALL**, 1974; **PERCH et al**, 1974), foi reconhecida pela última edição do Manual de Bergey's (1986), que descreve o grupo *mutans* de *Streptococcus*, composto pelas espécies *S. cricetus*, *S. rattus*, *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. ferus*, e de acordo com **BEIGHTON et al** (1984), também por *S. macacae* . Algumas características bioquímicas do grupo *mutans* são mostrados na Tabela I.

---

*API - System - apparells et Procédés d'Identification, Montalieu Vercien, França.

Tabela I - Características bioquímicas diferenciando espécies dentro do grup *mutans*(*)

CARACTERÍSTICAS	*S. mutans*	*S. ferus*	*S. cricetus*	*S. sobrinus*	*S. rattus*	*S. macacae*
Fermentação de manitol	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	d	+	+
Melibiose	+	NT	d	d	+	+
Rafinose	+	-	+	d	+	+
Hidrólise de Arginina	-	-	-	-	+	-
Esculina	+	+	d	d	+	+
Produção H_2O_2	-	-	-	+	-	-
Resistência à bacitracina (2un/ml)	+	-	-	+	+	-
Sorotipo	c, e, f	c	a	d, g	b	c
Mol% G + C	36-38	43-45	42-44	44-46	41-43	35-36
Origem	humana	ratos	humanos ratos hamster	humano	rato humano	macaco

(*) Símbolos: +, 90% ou mais são cepas positivas; -, 90% ou mais são cepas negativas; d, 11-89% são cepas positivas; NT, não testadas.

Streptococcus rattus

O nome desta espécie foi dada por **COYKENDALL** (1977), à estreptococos que produzem glucano extracelular adesivo. Em agar sacarosado, algumas cepas de *S. rattus* produzem colônias firmes, freqüentemente rugosas. Foram descritos originalmente como sorotipo b de *S. mutans* (**BRATTHALL**, 1970), tendo sido primeiramente obtido em ratos de laboratório, embora tenham sido também isolados da cavidade oral humana.

Streptococcus cricetus

Originalmente isolados da cavidade oral de hamster (**COYKENDALL**, 1977), algumas cepas de *S. cricetus* produzem uma zona de alfa-hemólise, mas a maior parte é não hemolítica em agar sangue. As colônias em agar sacarosado aparecem freqüentemente brilhantes e circundadas por líquido contendo glucano extracelular solúvel. As cepas desse microrganismo reagem com antisoro para *S. mutans* sorotipo a (**BRATTHALL**, 1970), embora algumas cepas tenham perdido esse antígeno.

Streptococcus sobrinus

Proposto por **COYKENDALL** (1983), este microrganismo foi originalmente isolado de cavidade oral humana e, primeiramente mencionado por **FITZGERALD & JORDAN** (1968), porém, não descrito

anteriormente. Algumas cepas de *S. sobrinus* são alfa-hemolíticas, outras não hemolíticas. Não sintetizam quantidades significantes de polissacarídeos intracelulares. Sorologicamente, reagem usualmente com antisoro para *S. mutans* sorotipo d ou g (**BRATTHALL**, 1970). O habitat de *S. sobrinus* é a superfície dos dentes, sendo cariogênico para animais experimentais e podendo estar associado à cárie dental humana (**COYKENDALL**, 1983).

Streptococcus ferus

Descrito por **COYKENDALL** (1983), *S. ferus* foram originalmente isolados da cavidade oral de ratos que consumiam cana-de-açúcar como dieta alimentícia (**COYKENDALL et al**, 1974). Estas cepas reagem com antisoro c de **BRATTHALL** (1970) e produzem polissacarídeos extra e intracelulares. Fermentam manitol e sorbitol, mas não fermentam rafinose e são inibidos por bacitracina (2 unidades/ml).

Streptococcus macacae

O termo *S. macacae* foi proposto por **BEIGHTON et al** (1984), por ter sido isolado de placa dental de macacos (*Macaca fascicularis*). Esse estreptococo é Gram-positivo, produz manitol e rafinose, mas não inulina e são sensíveis à bacitracina. Sorologicamente, reagem com antisoro para *S. mutans* sorotipo c (**BRATTHALL**, 1970), como *S. mutans* e *S. ferus*. Não produzem peróxido de

hidrogênio, porém hidrolizam esculina. O habitat de *S. macacae* é a cavidade oral, predominantemente a superfície dos dentes.

Do ponto de vista da distribuição e habitat natural dos estreptococos da microbiota oral, sabe-se que essa distribuição não possue uma localização específica, mas sim, que varia de região para região na boca. Dessa forma, por exemplo, o habitat natural do *S. mutans*, parece ser a superfície dental (**GIBBONS et al**, 1974) e está entre os primeiros microrganismos a colonizar a cavidade oral de crianças, após a erupção dental (**ALALUUSUA**, 1983; **ALALUUSUA & RENKONEN**, 1983). Os estreptococos espécie *sobrinus*, são também encontrados na superfície dental (**COYKENDALL**, 1983) e é o segundo estreptococo mais isolado e envolvido no processo de cárie dental (**DE SOETT et al**, 1990).

Os estreptococos orais podem ser isolados de vários sítios da cavidade oral, utilizando-se o meio seletivo desenvolvido por **CHAPMAN** (1944), agar *Mitis-Salivarius*. Os métodos de isolamento desses microrganismos, foi amplamente facilitado pelo desenvolvimento de um outro meio seletivo, o MSB (**GOLD et al**, 1973). Esse meio é baseado na combinação de sacarose, bacitracina e MS agar; entretanto, é seletivo somente para *S. mutans*, *S. sobrinus* e *S. rattus* (**EMILSON & BRATTHALL**, 1976; **LITTLE et al**, 1977). Assim, vários meios seletivos, têm sido desenvolvidos para o isolamento de estreptococos da cavidade oral, e já que alguns estreptococos produzem polissacarídeos extracelulares a partir de sacarose, esses meios em geral, incluem concentrações adequadas de sacarose, como por exemplo, o meio seletivo TYCSB, descrito por **VAN PALENSTEIN &**

HELDERMAN et al (1983) e **TANZER et al** (1984).

A atenção de alguns pesquisadores envolvidos na área de Biologia Oral, tem sido voltada ao desenvolvimento e aplicação de técnicas específicas, com o objetivo de contribuir na identificação e caracterização desses microrganismos orais.

Os estreptococos presentes na cavidade oral, geralmente podem ser identificados a nível de espécie através de testes bioquímicos convencionais (**MARFORT et al**, 1985), como fermentação de carboidratos, hidrólise de arginina, crescimento em anaerobiose. Porém, apesar da importância desses testes bioquímicos e do grupo *mutans* possuir características que os distinguem dos demais estreptococos, estes testes não são eficazes na diferenciação, por exemplo, de *S. mutans* e *S. ferus* (ambos de mesmo sorotipo e genótipo I), como também *S. mutans* pode ser confundido com outro tipo de *Streptococcus*, como *S. bovis* e *S. faecalis*. Tal fato, tem estimulado os pesquisadores a desenvolver técnicas que auxiliam o reconhecimento de grupos variados e complexos de microrganismos. Assim, por exemplo, a sorologia é uma técnica que foi introduzida nos laboratórios de pesquisa para auxiliar no trabalho de identificação e caracterização de microrganismos (**MINETT & STABLEFORTH**, 1931; **BRATTHALL**, 1970; **PERCH et al**, 1974). Contudo, a existência de diferenças sorológicas entre cepas de *mutans*, foi primeiramente observado por **ZINNER & JABLON** (1968). Posteriormente, **BRATTHALL** (1970) relatou a presença de vários tipos sorológicos distintos. A ocorrência de reações sorológicas cruzadas foi observada entre sorotipos de *S. mutans* (**BRATTHALL**, 1972; **PERCH et al**, 1974), devi-

do à antígenos de parede celular (ácido teicoico) e de membrana celular (ácido lipoteicoico).

Esses métodos imunológicos, têm demonstrado serem capazes de distinguir e definir um grande número de espécies de microrganismos. Entretanto, o mesmo requer a disponibilidade de potentes soros específicos que tenham sido submetidos a testes de absorção - a fim de eliminar reações cruzadas - além do que a sorotipagem pode estar limitada pela detecção de um número limitado de antígenos, com características muitas vezes instáveis.

A subdivisão das cepas de estreptococos através do estudo de bacteriocinas para aplicação em estudos epidemiológicos, além da sorologia,foi proposto por vários pesquisadores (**KELSTRUP & GIBBONS**, 1969; **BERKOWITZ & JORDAN**, 1975; **ROGERS**, 1975; **KOLSTAD**, 1976). As bacteriocinas são substâncias inibidoras de crescimento de uma variedade de bactérias Gram-positivas e podem ser chamadas também de mutacinas (**KELSTRUP & GIBBONS**, 1969; **HAMADA & OOSHIMA**, 1975). Utilizando tal sistema (**ROGERS**, 1975), observou o mesmo tipo de bacteriocina de *S. mutans* em todos os membros de uma família em particular. Esse mesmo autor, observou que somente um tipo de bacteriocina de *S. mutans* predomina na boca.

Todas essas substâncias denominadas bacteriocinas ou mutacinas, possuem atividade para inúmeros estreptococos de placa dentária, e algumas possuem ampla atividade contra outras bactérias da cavidade oral, como por exemplo, bacteriocina de cepas de *S. mitis* se mostraram ativas contra cepas de *S. mutans* e *S. sanguis* e estafilococos da cavidade oral (**VERNAZZA & MELVILLE**,

1977). Relatos de estudos com microrganismos de placa, demonstraram que algumas cepas de *S. mutans* são capazes de aumentar em número durante um período de 13 semanas (**BOWDEN et al, 1976**; **HARDIE et al, 1977**). A habilidade dessa espécie de dominar dessa forma, o crescimento quando em competição com um grande número de diferentes bactérias, parecem sugerir uma íntima relação com a produção dessas substâncias, já que a produção de mutacinas foi demonstrada *in vivo* por **VAN DER HOEVEN et al** (1977).

A identificação de diversos microrganismos já foi historicamente baseada na morfologia e anatomia, porém, métodos bioquímicos, sorológicos e genéticos têm sido desenvolvidos e empregados nessa linha de pesquisa, objetivando um maior conhecimento desses organismos e de suas diversidades taxonômicas, não detectáveis pelos métodos tradicionais. Dentro dessa linha de investigação, a técnica de separação de proteínas celulares por eletroforese em gel de poliacrilamida, tem demonstrado ser um recurso importante no estudo de microrganismos isolados dos diversos nichos ecológicos. Pode ser também de muita importância na identificação e caracterização inicial de amostras isoladas quando amostras de referências são disponíveis.

A eletroforese, é uma técnica de análise qualitativa e quantitativa para substâncias que apresentam carga elétrica e baseia-se na migração destas substâncias em determinado campo elétrico. Seu princípio já era conhecido e usado desde o início do século passado, mas é nas últimas décadas que essa técnica tem sofrido aperfeiçoamentos constantes, possibilitando análises mais

precisas e auxiliando trabalhos de pesquisa em diversas áreas (SAOJI & KHARE, 1985).

A separação de proteínas por eletroforese, tem demonstrado ser de muita utilidade no estudo de microrganismos, sendo vários os trabalhos relatados na literatura internacional (SEITER & JAY, 1980; CALHOON et al, 1981). Em 1971, COYKENDALL et al demonstraram diferenças nos padrões de eletroforese de proteínas celulares de *S. mutans*, ao mesmo tempo SIMONSON & SHKLAIR (1972), isolaram proteínas intracelulares de extrato aquoso *S. mutans*, e aplicando a mesma técnica, de acordo com o método descrito por DAVIS (1964), demonstraram também diferenças nos padrões protéicos das amostras estudadas. Os resultados de BROWN & PETTERSON (1972), mostraram que a mobilidade eletroforética da dehydrogenase manitol-1-fosfato, pode ser utilizada para distinguir os sorotipos de *mutans*. Posteriormente, OLSSON et al (1976) e RUSSEL (1976), mostraram resultados satisfatórios com a utilização da eletroforese em poliacrilamida (PAGE-SDS), onde amostras pertencentes a diversos sorotipos de *S. mutans*, apresentavam diferenças em suas mobilidades eletroforéticas.

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida mostra ser, portanto, um recurso disponível na caracterização de microrganismos. Através de estudos de taxonomia levados a efeito por BEIGHTON et al (1984), foi possível detectar com a ajuda desta técnica, mais uma espécie - *Streptococcus macacae*, pertencente ao grupo *mutans*.

MATERIAL E MÉTODOS

1 - Bactérias

Foram usadas amostras de microrganismos orais, potencialmente cariogênicos do gênero *Streptococcus*, identificadas bioquimicamente, obtidas de indivíduos de ambos os sexos, numa faixa etária entre 15 e 30 anos. As cepas utilizadas foram gentilmente cedidas pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - Departamento de Microbiologia, pela Prof^{a}. Márcia P. A. Meyer (Quadro 1). Detalhes sobre a origem e identificação das cepas bacterianas, estão descritas no apêndice.

2 - Manutenção das Cepas

As cepas microbianas foram cultivadas em tubos contendo 3.0 ml de meio de cultura Brain Heart Infusion Agar (BHI agar), previamente autoclavados à 120°C durante 15 minutos. Os tubos foram incubados em jarras anaeróbicas (Sistema Gaspak BBL) ou em chama de vela, a 37°C durante 48 horas. Em seguida, os tubos foram removidos da jarra e mantidos sob refrigeração (10°C), durante aproximadamente 8-12 dias, quando a coleção era então renovada.

3 - Preparo das Amostras

Três métodos foram usados no preparo das amostras e o

meio de cultura utilizado foi Tryptone Yeast Extract - TYE (Ver composição no apêndice), distribuído em tubos (15 x 150 mm), contendo 6.0 ml por tubo e autoclavados a 120°C por 15 minutos.

No primeiro método, as amostras de microrganismos foram inoculadas em tubos contendo TYE. As amostras foram incubadas a 37°C em jarras anaeróbicas durante 48 horas. Após ao crescimento bacteriano nos tubos, as culturas foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos, lavadas duas vezes numa solução de NaCl 0.15 M estéril, e o precipitado final ressuspendido em pequeno volume (100 μl) de SDS solubilizante (**LAEMMLI**, 1970) de acordo com o descrito por **RUSSEL** (1976), como mostra o Esquema 1.

No segundo método, as amostras foram semeadas em meio TYE e incubadas a 37°C por 48 horas. Em seguida, o material bacteriano crescido nos tubos foi centrifugado (3000 rpm-15 minutos), lavado duas vezes em solução de NaCl 0.15 M estéril. O precipitado obtido, foi ressuspendido em sacarose à 20% e mantido por 20 minutos em banho de gelo. Após centrifugação (3000 rpm - 15 minutos), o precipitado foi solubilizado em SDS (**LAEMMLI**, 1970), de acordo com **HEPPEL** (1969) modif., como pode se verificar no Esquema 2.

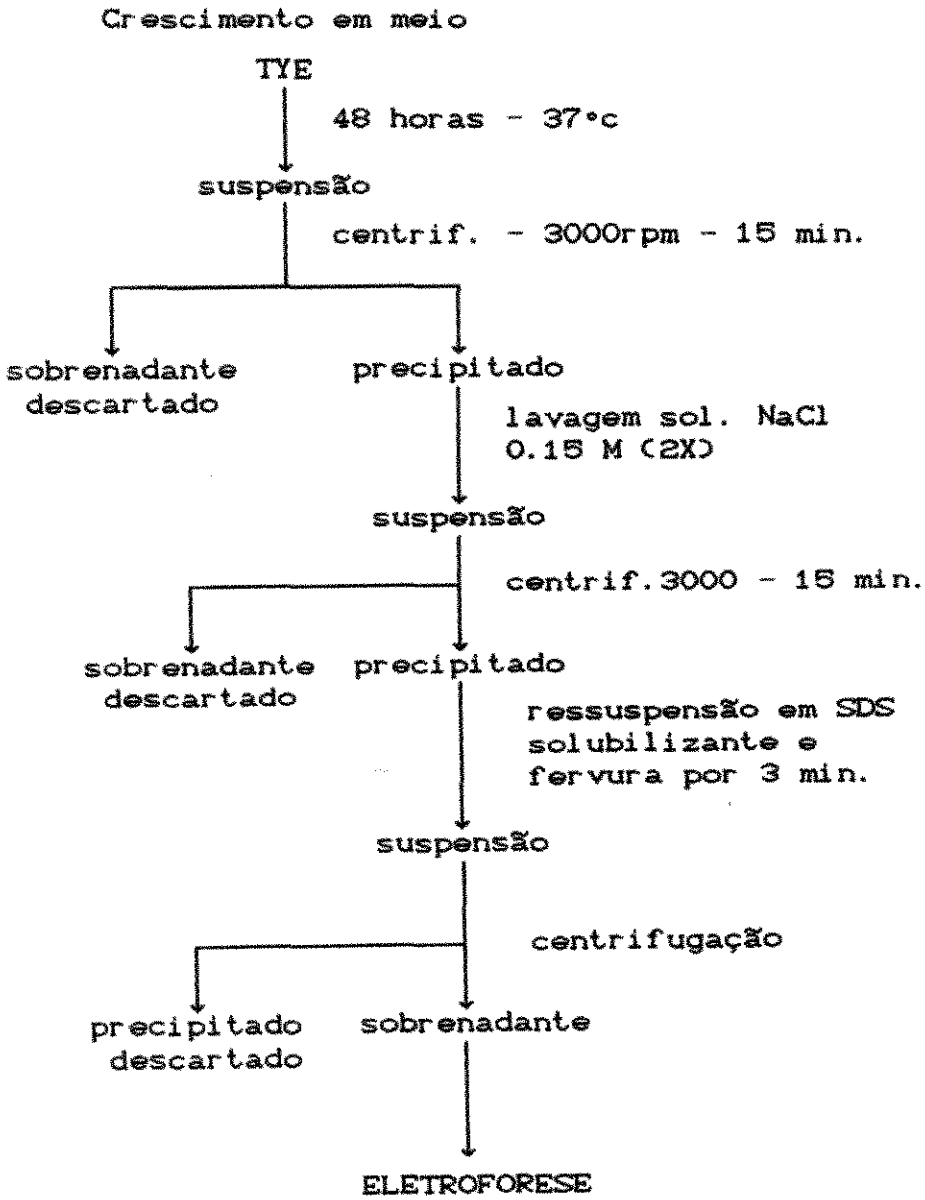
O terceiro método empregado, baseou-se em **CATO et al** (1982) modif., onde os tubos de ensaio contendo meio de cultura (TYE), foram inoculados com material bacteriano, permanecendo 48 horas a

Quadro 1 - Relação das espécies de *Streptococcus* utilizadas nos experimentos

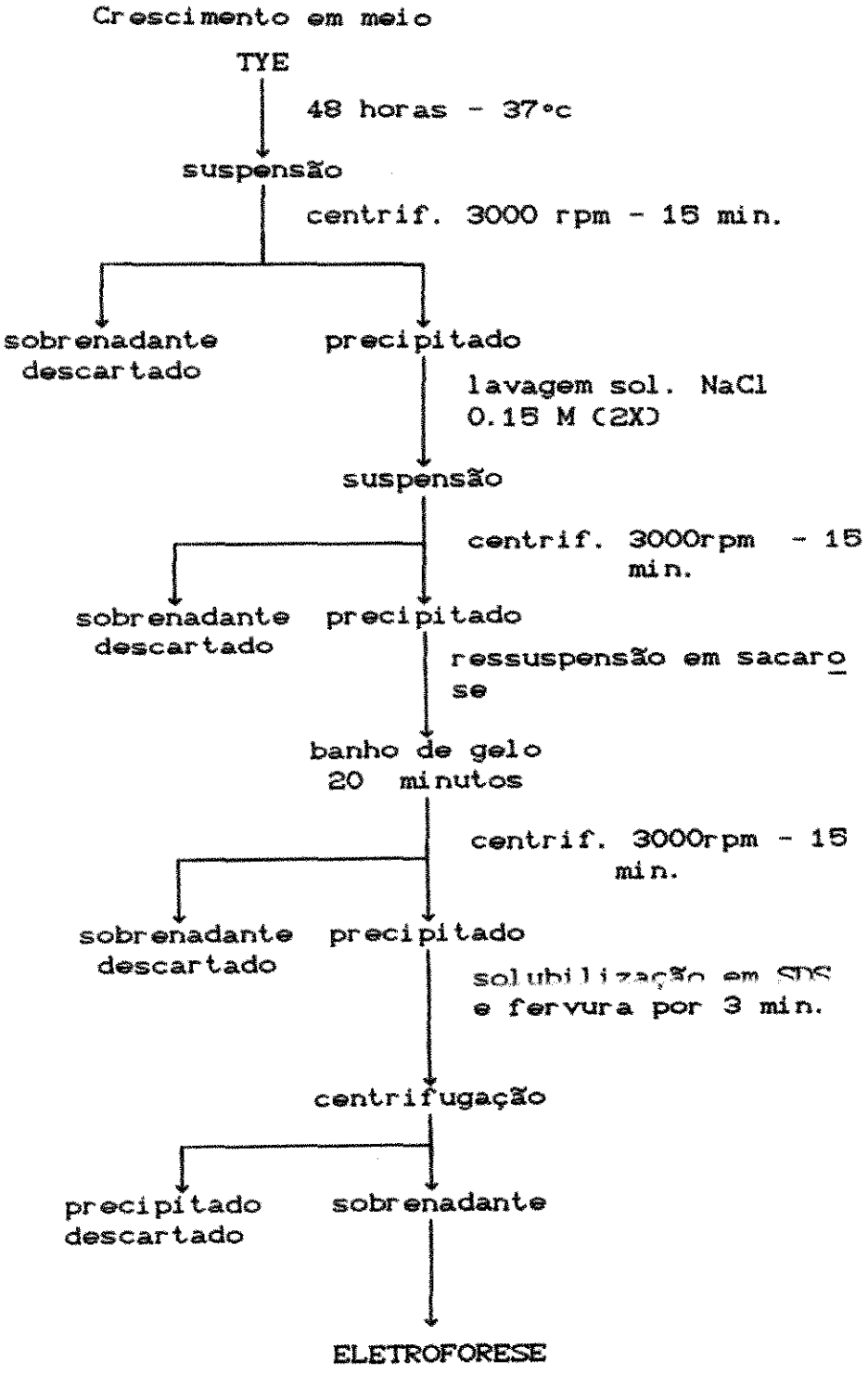
MATERIAL	CÓDIGO
Streptococcus mutans	6-G (Padrão)
Streptococcus mutans	V-5
Streptococcus mutans	VII-1
Streptococcus mutans	VII-2
Streptococcus mutans	XI-4
Streptococcus mutans	XIII-3
Streptococcus mutans	XIII-6
Streptococcus sobrinus	XI-3
Streptococcus rattus	XVI-1
N.I.	I-4-B
N.I.	XII-3
N.I.	XII-5

N.I. - cepa não identificada bioquimicamente, mas com características pertencentes ao grupo *mutans* de *Streptococcus*.

Esquema 1 - Preparo das Amostras Bacterianas



Esquema 2 - Preparo das Amostras Bacterianas



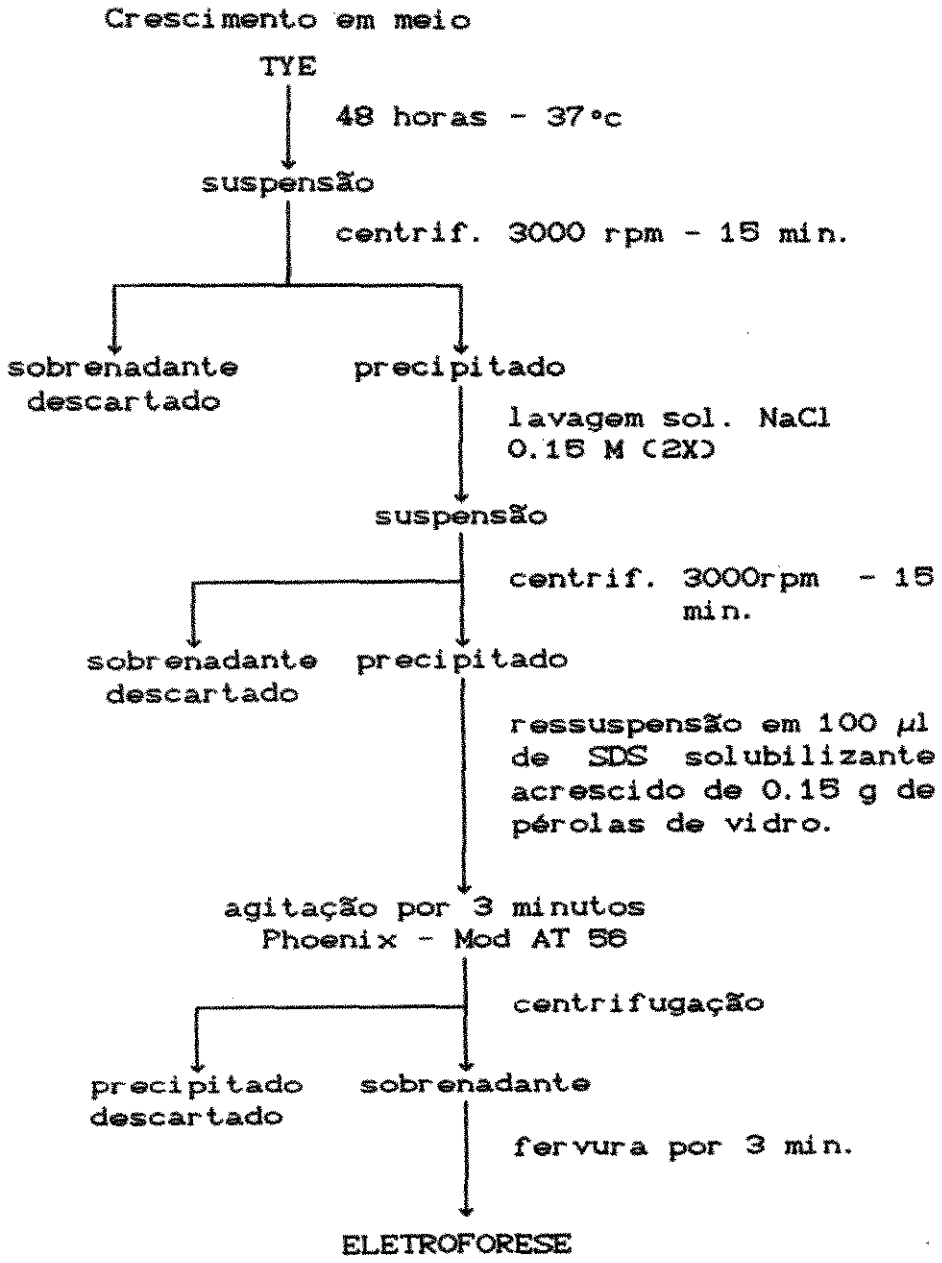
37°C. As células foram centrifugadas (3000 rpm - 15 minutos) e lavadas em solução estéril de NaCl 0.15 M. Ao precipitado resultante, acrescentou-se SDS solubilizante (**LAEMMLI**, 1970) e 0.15 g. de pérolas de vidro (Classe IV, 1420/C - Cataphote Division of Ferro Corp. Jackson, Miss.). As células foram submetidas à agitação (agitador de tubos - Phoenix - Mod. AT 56) por 3 minutos, como mostra o Esquema 3.

4 - Eletroforese

Amostras de culturas bacterianas de *Streptococcus*, obtidas de acordo com os métodos anteriormente descritos, isoladas e identificadas bioquimicamente, foram estudadas, utilizando-se a técnica de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida - Duodecil Sulfato de Sódio (PAGE-SDS), segundo **LAEMMLI** (1970), em sistema descontínuo de Tampão 0.025 M de Tris e 0.192 M de glicina e 0.1% de SDS em pH 8.3 (**LAEMMLI**, 1970), com o gel espaçador a 2.5% e o gel separador a 7.5%.

Aproximadamente 100 µg de proteínas (**LOWRY et al**, 1951) obtidas segundo os três métodos citados, foram solubilizados em mistura dissociante descrito por **LAEMMLI** (1970). As proteínas foram dissociadas por imersão em água à 100°C por 3 minutos. A eletroforese (PAGE-SDS), processou-se em temperatura ambiente a 100V

Esquema 3 - Preparo das Amostras Bacterianas



em corrente constante de 20mA, até que o marcador (Bromofenol Blue) atingisse o final do gel (aproximadamente 2 horas). Após a corrida, o gel foi removido da placa e corado em Coomassie Blue - G 250 0.1% por duas horas. A lavagem (descoloração) do gel foi feita usando-se solução descorante (ver descrição no apêndice). Após 2 dias, o gel foi desidratado, secado em papel celofane (JUANG et al, 1984) e fotografado sobre negatoscópio.

O traçado densitométrico foi realizado com o auxílio de um microdensitômetro modelo Quick Scan-Flur-Vis (Helena Laboratórios) e a mobilidade relativa (Rm) expressa na forma de diagramas, foi calculada em função da proporção da distância percorrida pela banda, em relação ao marcador Bromofenol Blue.

RESULTADOS

As amostras bacterianas de *Streptococcus* orais codificadas como 6-G; XI-4;, V-5; VII-1; XIII-6; XIII-3; VII-2; XVI-1; XI-3; XII-3; XII-5; I-4B e caracterizadas bioquimicamente como sendo respectivamente, *S. mutans* (7 cepas), **S. rattus** (1 cepa), *S. sobrinus* (1 cepa) e as não identificadas (3 cepas), foram usadas na obtenção de proteínas para a análise eletroforética, segundo descrito em Material e Métodos. Os resultados obtidos podem ser avaliados nas Figuras 1 a 24. Como se pode verificar, as figuras mostram as bandas proteicas obtidas por eletroforese em gel de poliacrilamida das diferentes amostras analisadas. As linhas 1 e 2 de cada gel, contém amostra do *S. mutans* (6-G), utilizada como padrão para comparação. Todas as amostras foram feitas em duplicata.

Os resultados obtidos pela técnica de **RUSSEL** (1976), através da solubilização direta (Esquema 1), mostram a presença de 20 a 30 bandas aproximadamente (Figuras 1, 3, 5 e 7). Os perfis eletroforéticos apresentam a mesma distribuição no gel, porém, foram observadas diferenças nas mobilidades relativas (Rm) 0.12 - 0.25 - 0.43 - 0.60 e Rm 0.36 - 0.50 - 9.56 - 0.69 - 0.72 respectivamente para XI-3 e I-4B (Figuras 1, 5 e 7). As figuras 2, 6 e 8 mostram essas diferenças através do traçado densitométrico. As demais amostras apresentaram o mesmo padrão proteico e uma

banda intensa difusa em torno da Rm 0.32, como se pode verificar nas figuras e traçados densitométricos (Figuras 1 a 8).

Os resultados obtidos pelo método de **HEPPEL** (1969) - Esquema 2 - cujos perfis eletroforéticos das proteínas intracelulares de cepas do grupo *mutans* estão expostos nas Figuras 9, 11, 13 e 15, detectaram a presença de aproximadamente 15 a 25 bandas como pode ser verificado pelos traçados densitométricos (Figuras 10, 12, 14 e 16).

Os resultados da técnica desenvolvida por **CATO et al** (1982) - Esquema 3 - cujos resultados obtidos estão expostos nas Figuras 17, 19, 21 e 23) e os respectivos traçados densitométricos nas Figuras 18, 20, 22 e 24, revelaram um maior número de bandas proteicas, aproximadamente 30 a 40. Pode-se observar diferenças na porção de alto peso molecular para a amostra XI-3 (Figuras 17 e 23), enquanto que para a cepa I-4B foram detectadas diferenças nas Rm 0.36 - 0.50 - 0.56 e em toda porção de baixo peso molecular (Figura 21). Esses resultados podem ser melhor visualizados pelos traçados densitométricos nas Figuras 18, 22 e 24.

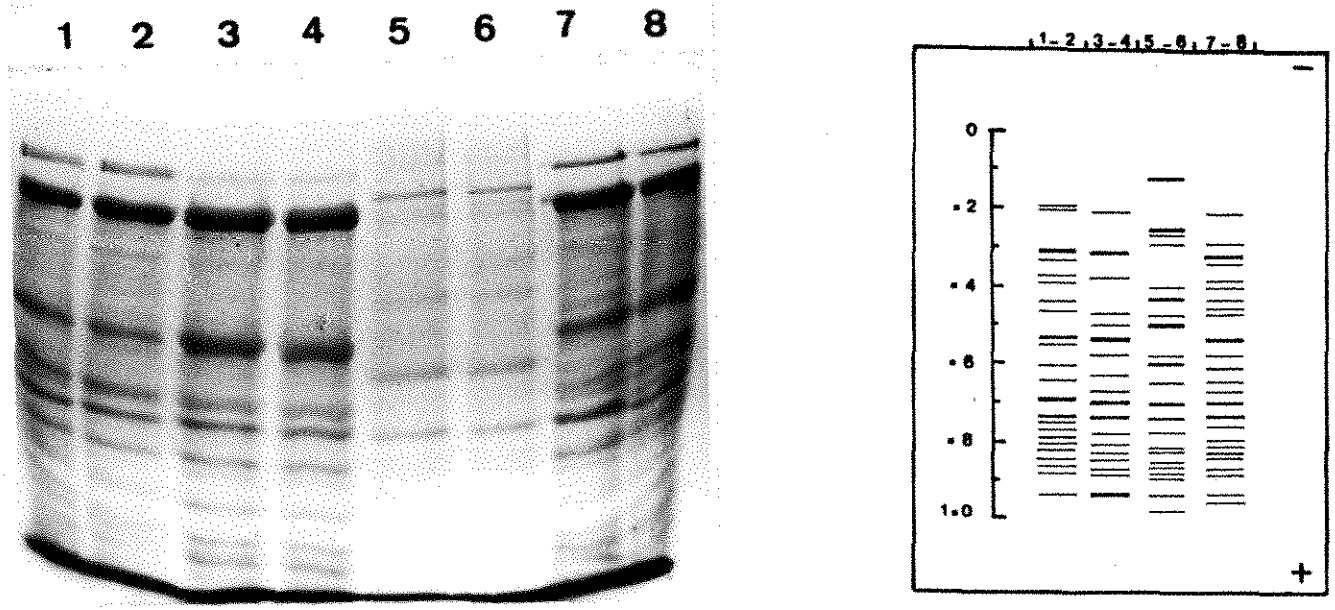


Figura 1 - Perfil eletroforético e diagrama esquemático de proteínas intracelulares de cepas de Streptococcus.

Linhas 1 e 2- 6-G S. mutans (Padrão)
3 e 4- XII-5 Não Identificada
5 e 6- XI-3 S. sobrinus
7 e 8- VII-1 S. mutans

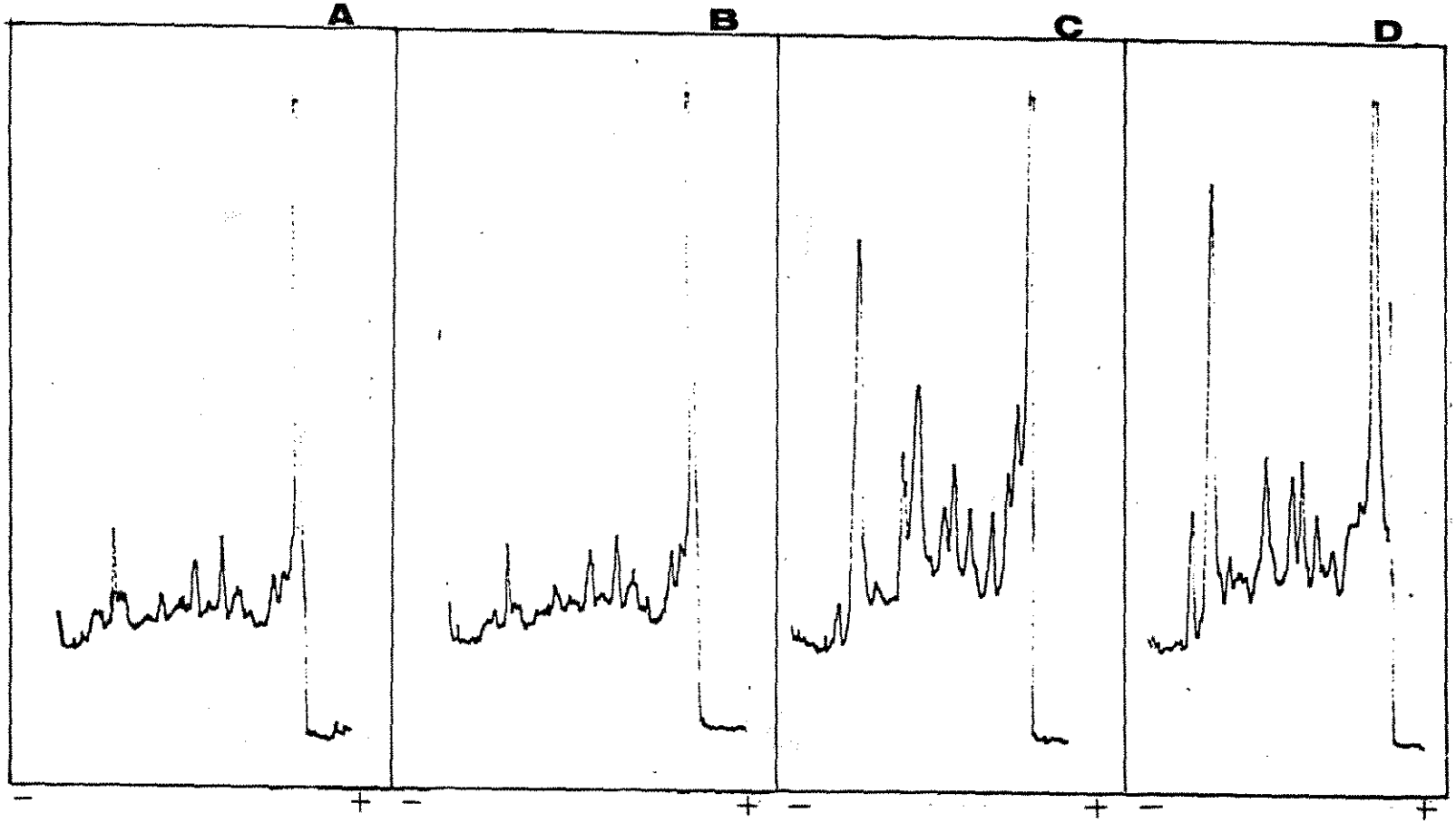


Figura 2 - Traçados densitométricos de proteínas intracelulares de cepas de Streptococcus.

A. 6-G S. mutans (Padrão)
B. XII-5 Não Identificada
C. XI-3 S. sobrinus
D. VII-1 S. mutans

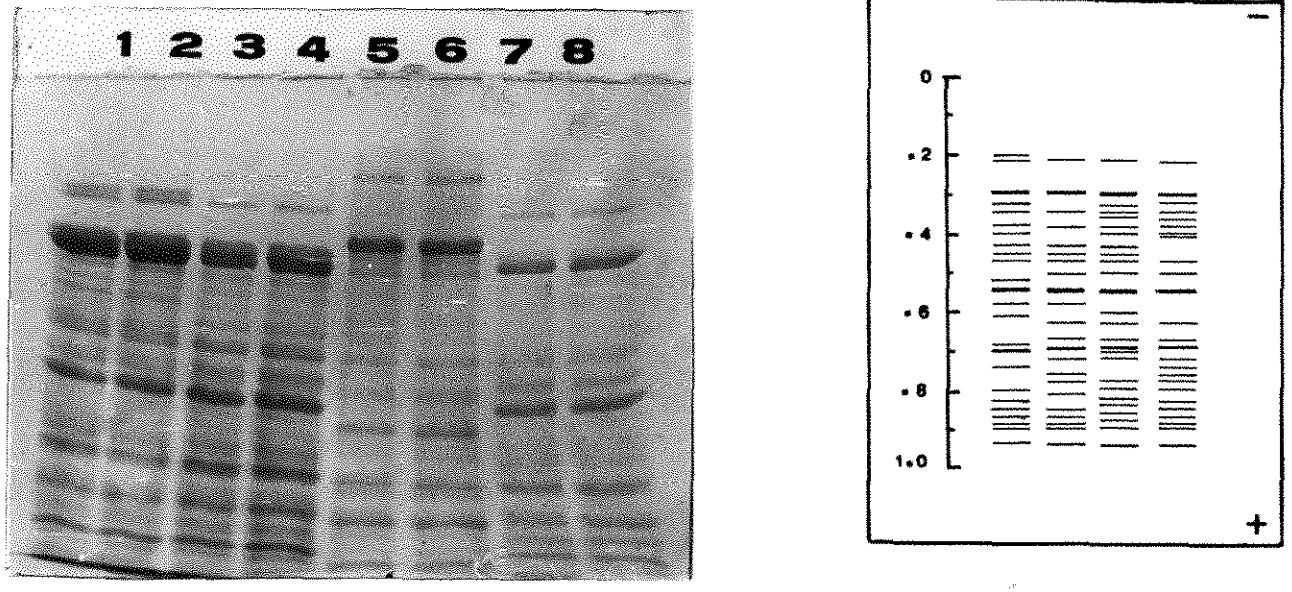


Figura 3 - Perfil eletroforético e diagrama esquemático de proteínas intracelulares de cepas de Streptococcus.

Linhas	1 e 2-	6-G	S. mutans (Padrão)
	3 e 4-	XII-3	Não Identificada
	5 e 6-	XVI-1	S. rattus
	7 e 8-	V-5	S. mutans

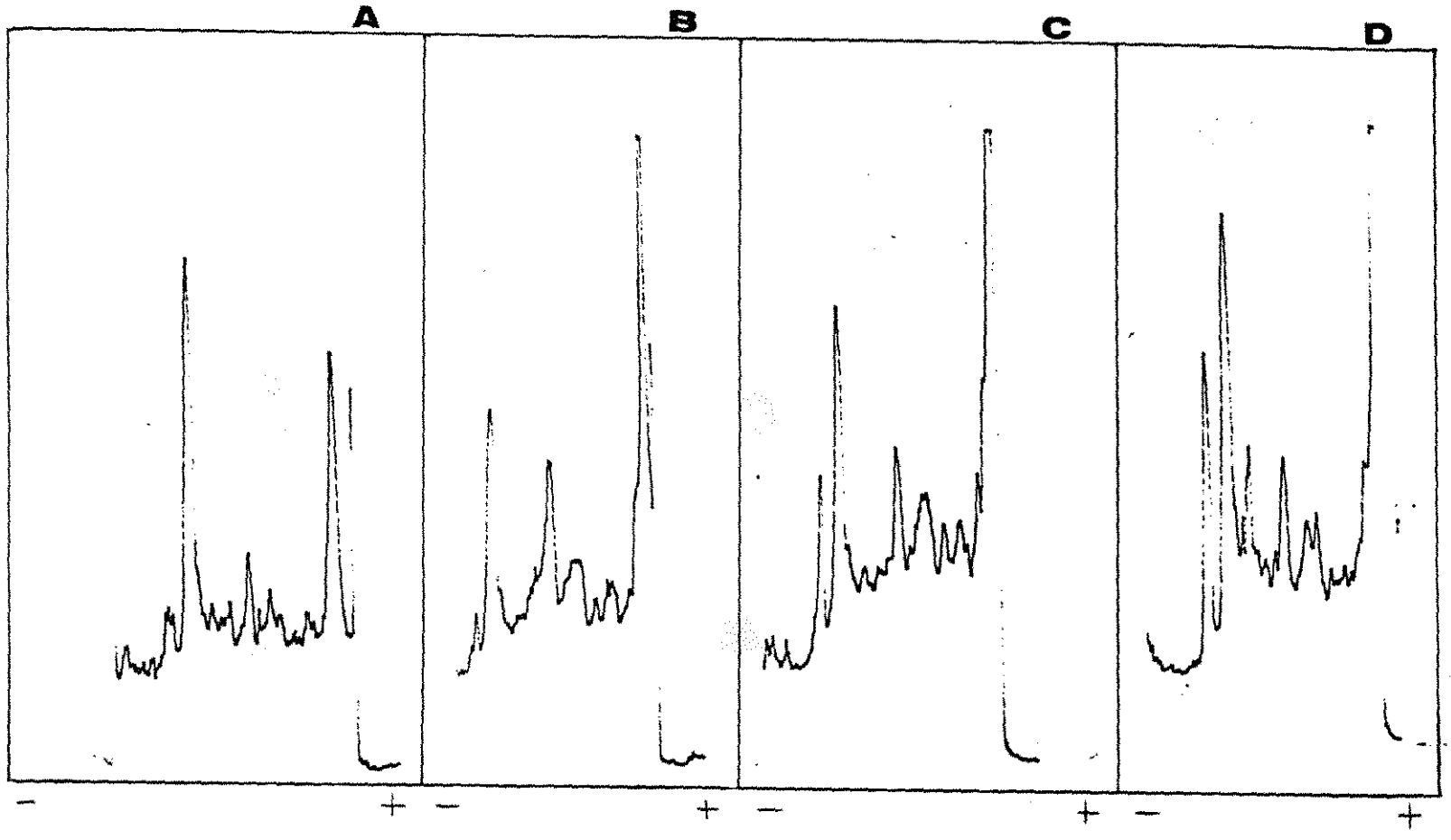
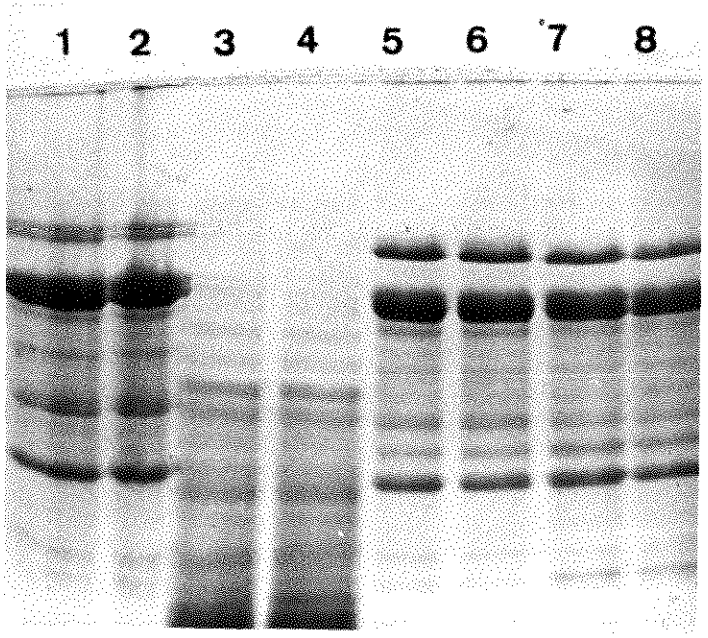


Figura 4 - Traçados densitométricos de proteínas intracelulares de cepas de Streptococcus.

A. 6-G S. mutans (Padrão)
B. XII-3 Não Identificada
C. XVI-1 S. rattus
D. V-5 S. mutans



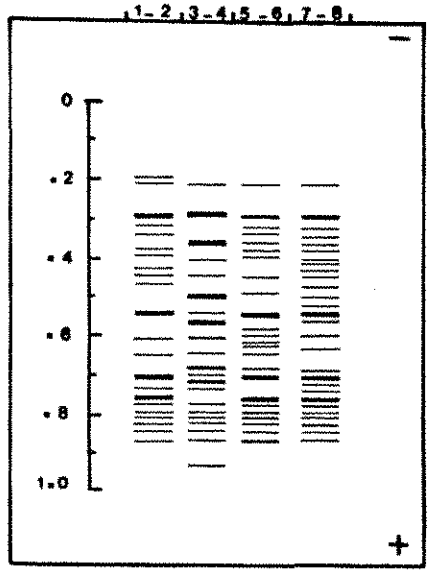


Figura 5 - Perfil eletroforético e diagrama esquemático de proteínas intracelulares de cepas de Streptococcus.

Linhas 1 e 2- 6-G S. mutans (Padrão)
3 e 4- I-4B Não Identificada
5 e 6- XIII-6 S. mutans
7 e 8- XIII-3 S. mutans

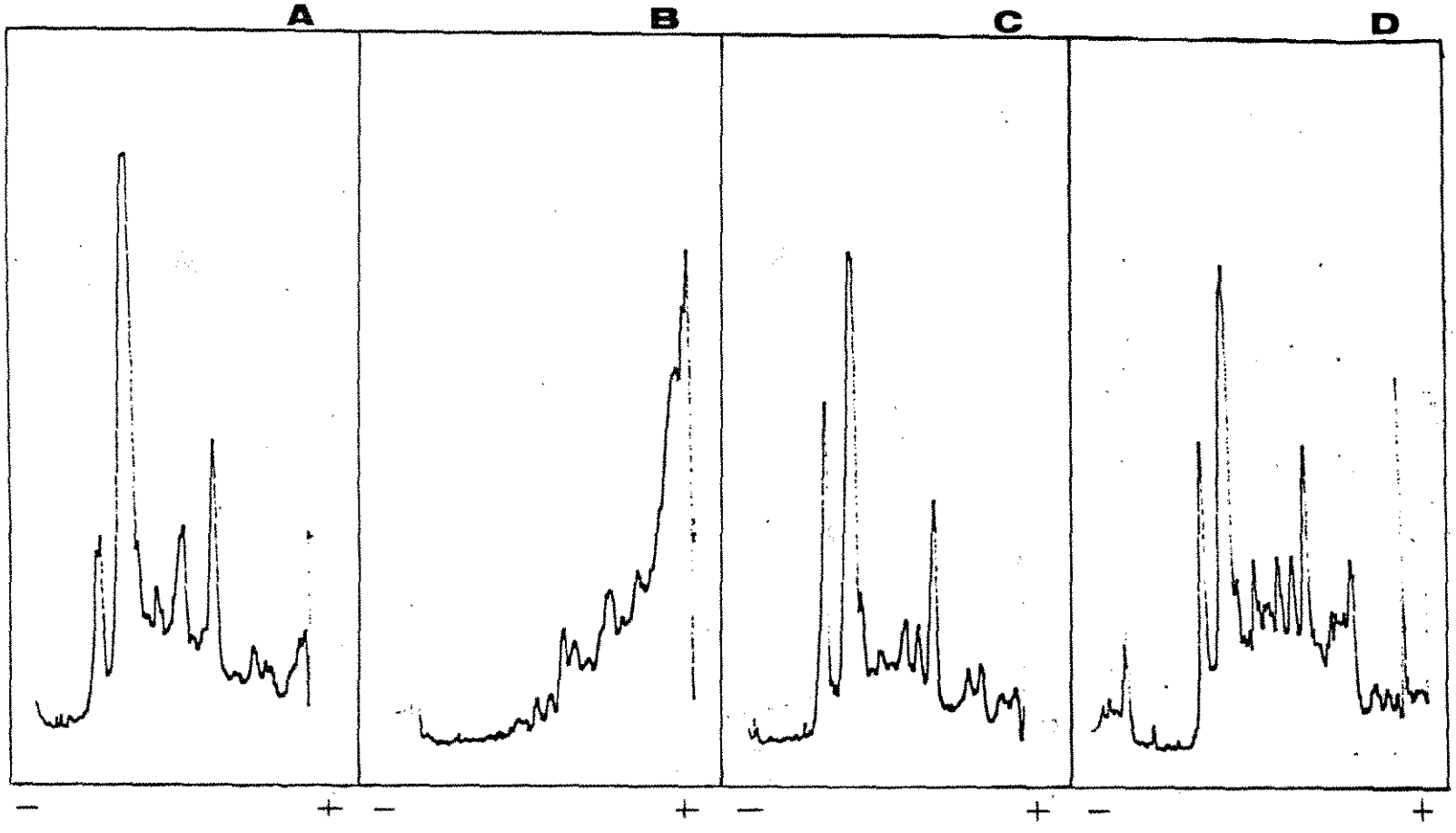


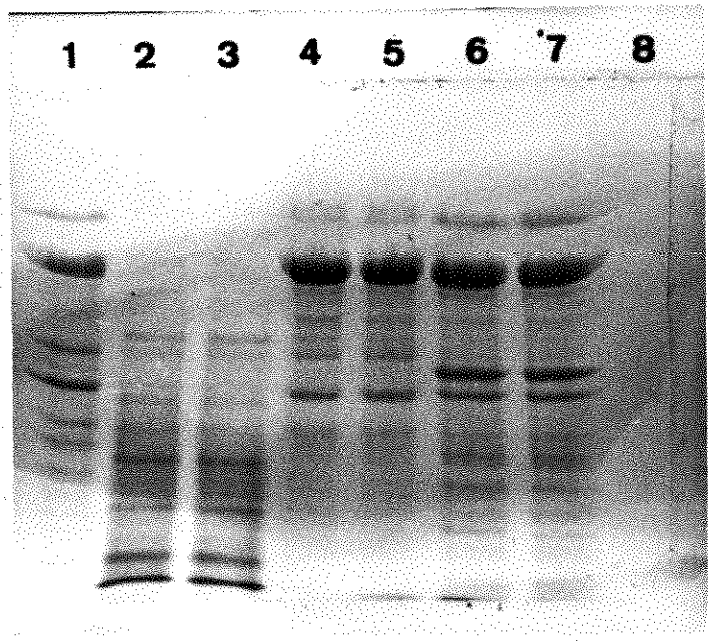
Figura 6 - Traçados densitométricos de proteínas intracelulares de cepas de Streptococcus.

A. 6-G S. mutans (Padrão)

B. I-4B Não Identificada

C. XIII-6 S. mutans

D. XIII-3 S. mutans



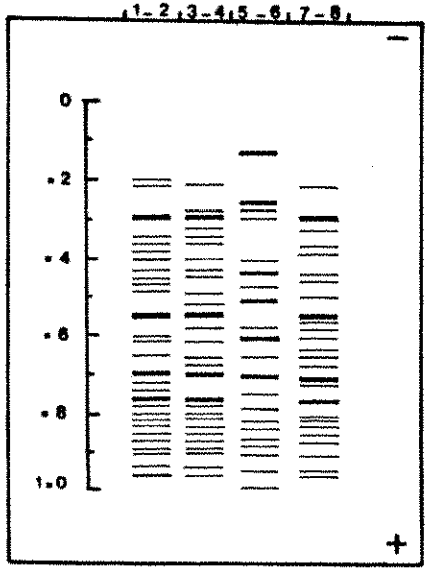


Figura 7 - Perfil eletroforético e diagrama esquemático de proteínas intracelulares de cepas de Streptococcus.

Linhas 1 e 2- 6-G S. mutans (Padrão)
3 e 4- VII-2 S. mutans
5 e 6- XI-3 S. sobrinus
7 e 8- XI-4 S. mutans

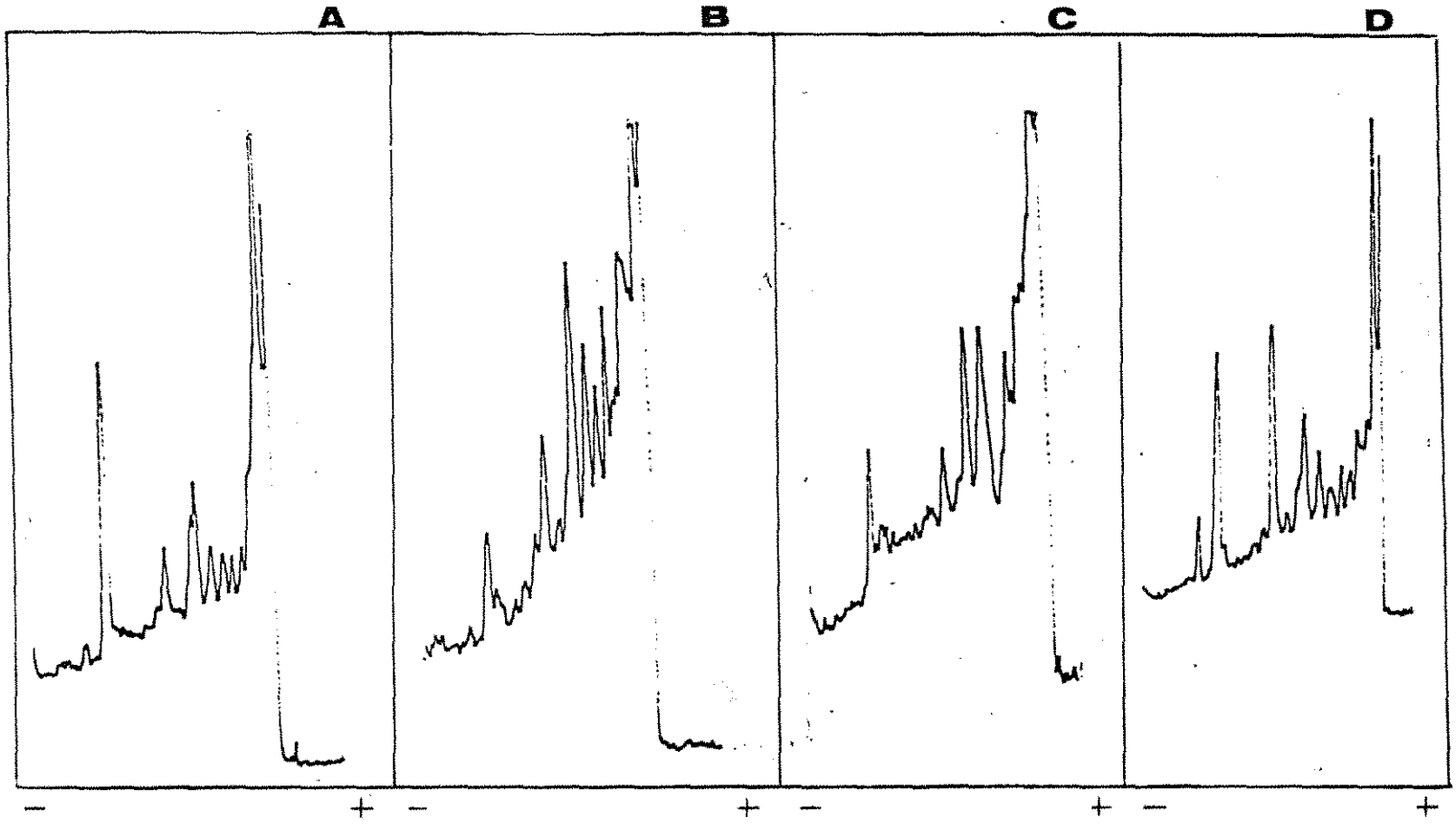
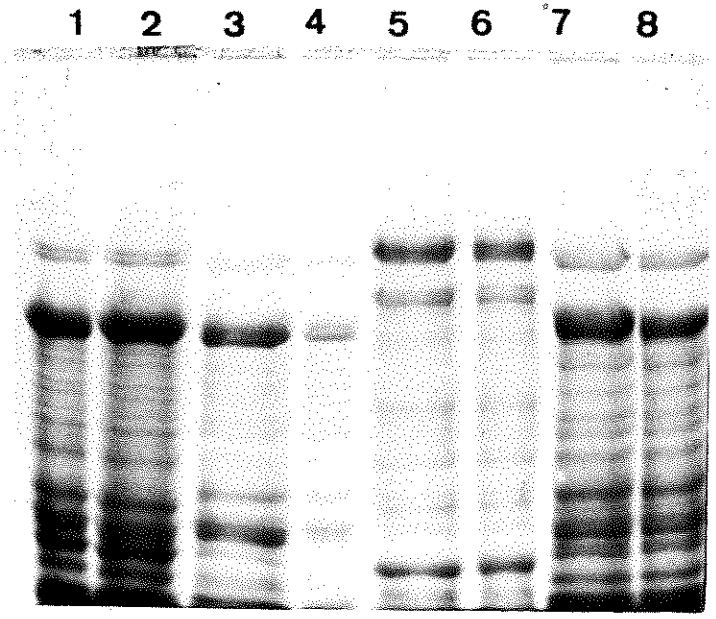


Figura 8 - Traçados densitométricos de proteínas intracelulares de cepas de Streptococcus.

A. 6-G S. mutans (Padrão)
B. VII-2 S. mutans
C. XI-3 S. sobrinus
D. XI-4 S. mutans



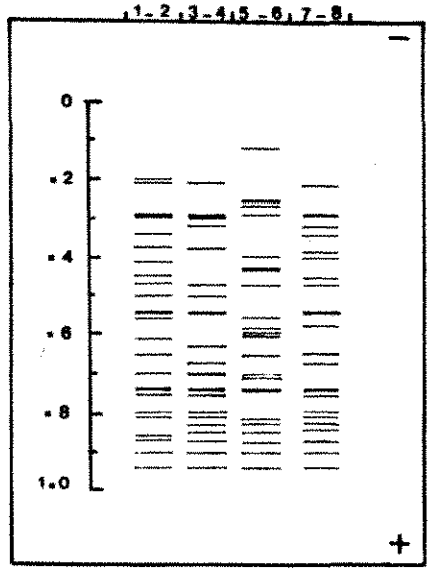


Figura 9 - Perfil eletroforético e diagrama esquemático de proteínas intracelulares de cepas de Streptococcus.

Linhas 1 e 2-	6-G	S. mutans	(Padrão)
3 e 4-	XII-5	Não Identificada	
5 e 6-	XI-3	S. sobrinus	
7 e 8-	VII-1	S. mutans	

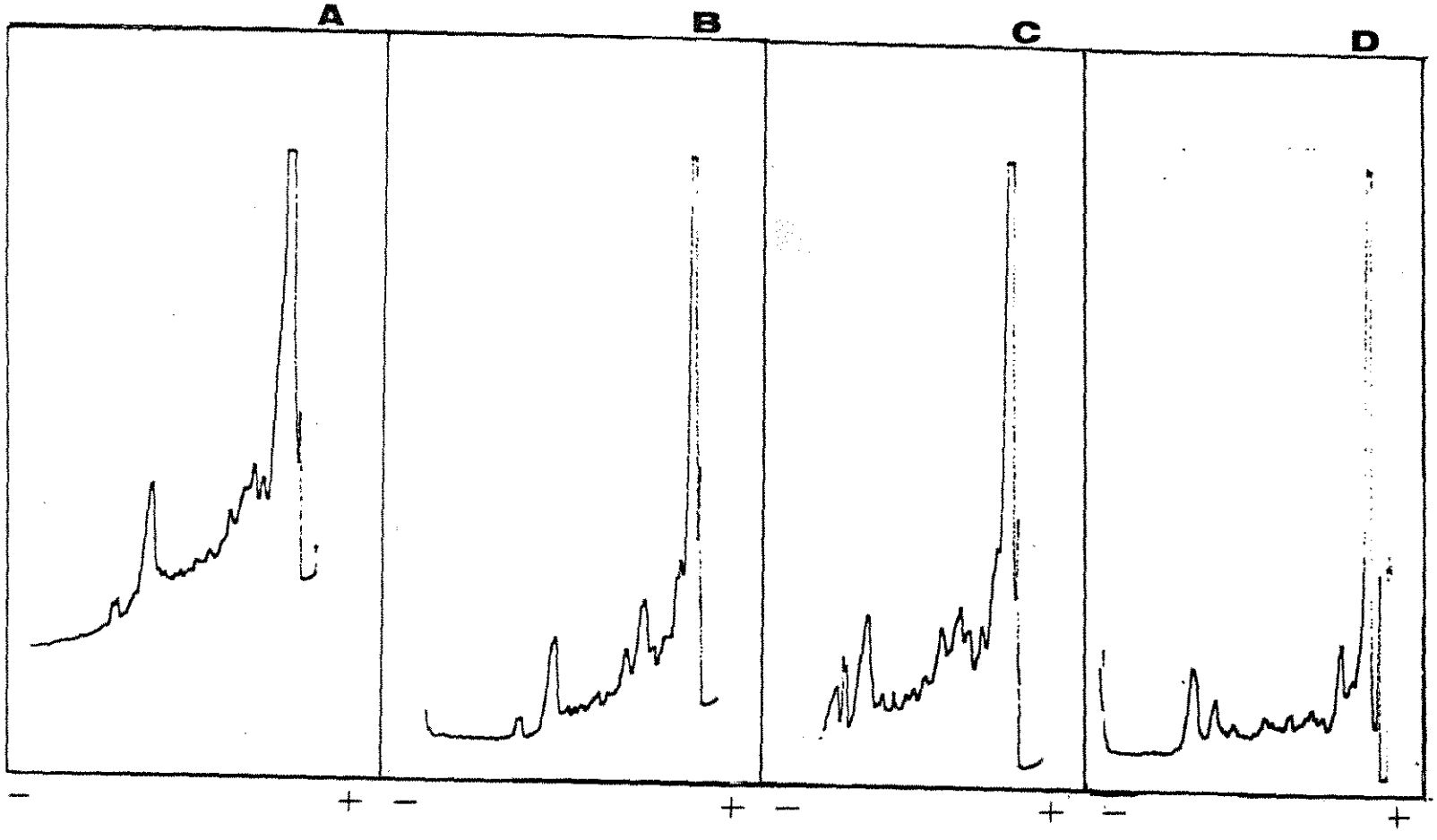
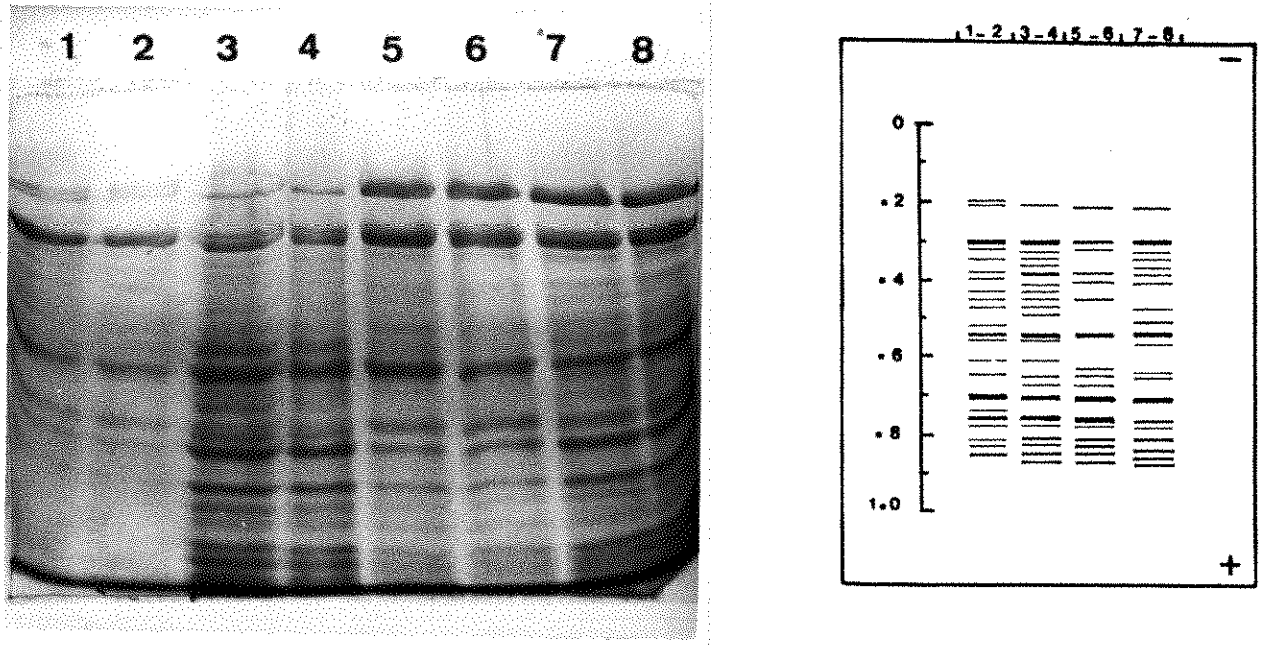


Figura 10 - Traçados densitométricos de proteínas intracelulares de cepas de Streptococcus.

A. 6-G S. mutans (Padrão)
B. XII-5 Não Identificada
C. XI-3 S. sobrinus
D. VII-1 S. mutans



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Figura 11 - Perfil eletroforético e diagrama esquemático de proteínas intracelulares de cepas de Streptococcus.

Linhas 1 e 2- 6-G S. mutans (Padrão)
3 e 4- XII-3 Não identificada
5 e 6- XVI-1 S. rattus
7 e 8- V-5 S. mutans

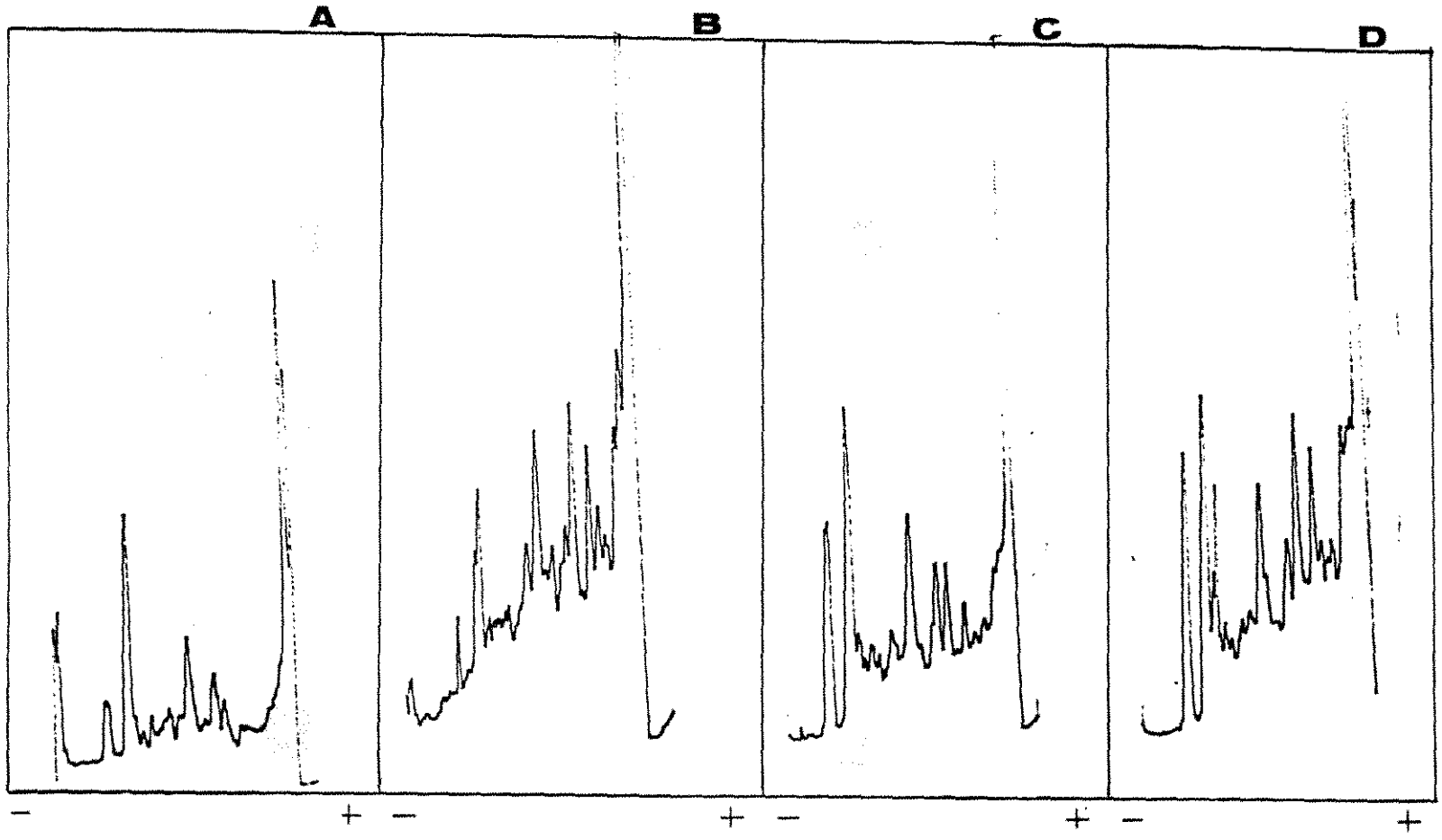


Figura 12 - Traçados densitométricos de proteínas intracelulares de cepas de Streptococcus.

A. 6-G S. mutans (Padrão)
B. XII-3 Não Identificada
C. XVI-1 S. rattus
D. V-5 S. mutans

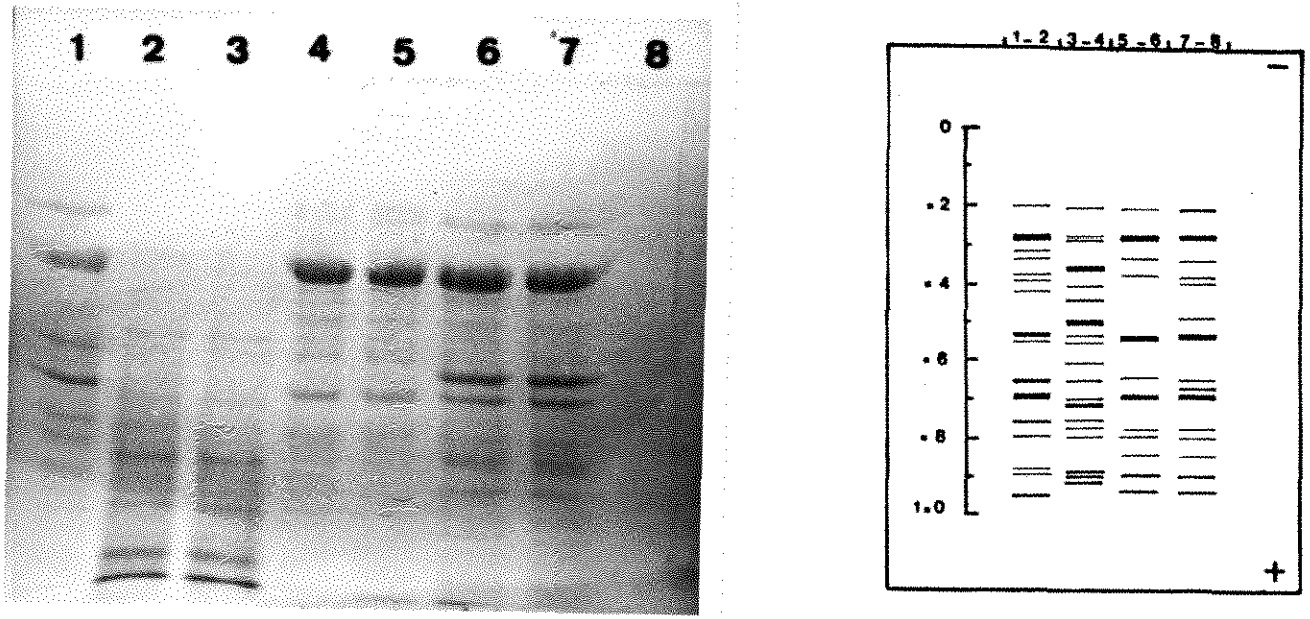


Figura 13 - Perfil eletroforético e diagrama esquemático de proteínas intracelulares de cepas de Streptococcus.

Linhas 1 e 2- 6-G S. mutans (Padrão)
3 e 4- I-4B Não Identificada
5 e 6- XIII-6 S. mutans
7 e 8- XIII-3 S. mutans

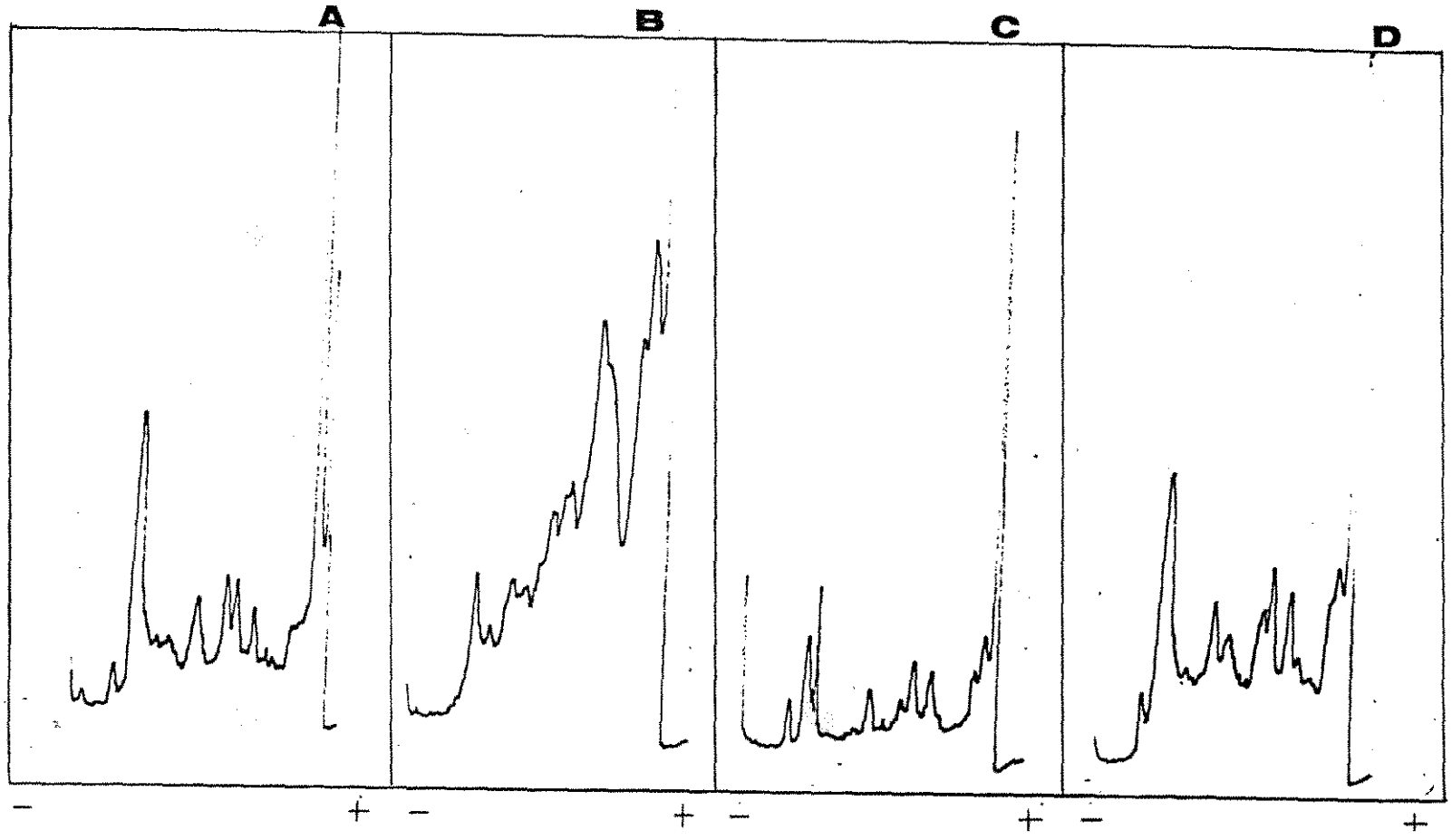


Figura 14 - Traçados densitométricos de proteínas intracelulares de cepas de Streptococcus.

A. 6-G S. mutans (Padrão)
B. I-4B Não Identificada
C. XIII-6 S. mutans
D. XIII-3 S. mutans

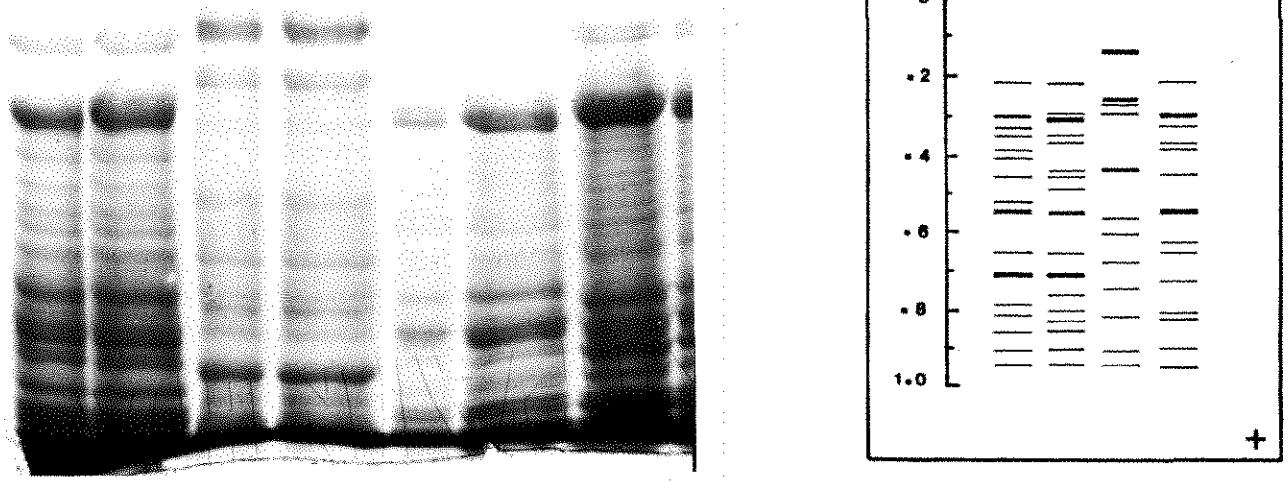


Figura 15 - Perfil eletroforético e diagrama esquemático de proteínas intracelulares de cepas de Streptococcus.

Linhas 1 e 2- 6-G S. mutans (Padrão)
3 e 4- VII-2 S. mutans
5 e 6- XI-3 S. sobrinus
7 e 8- XI-4 S. mutans

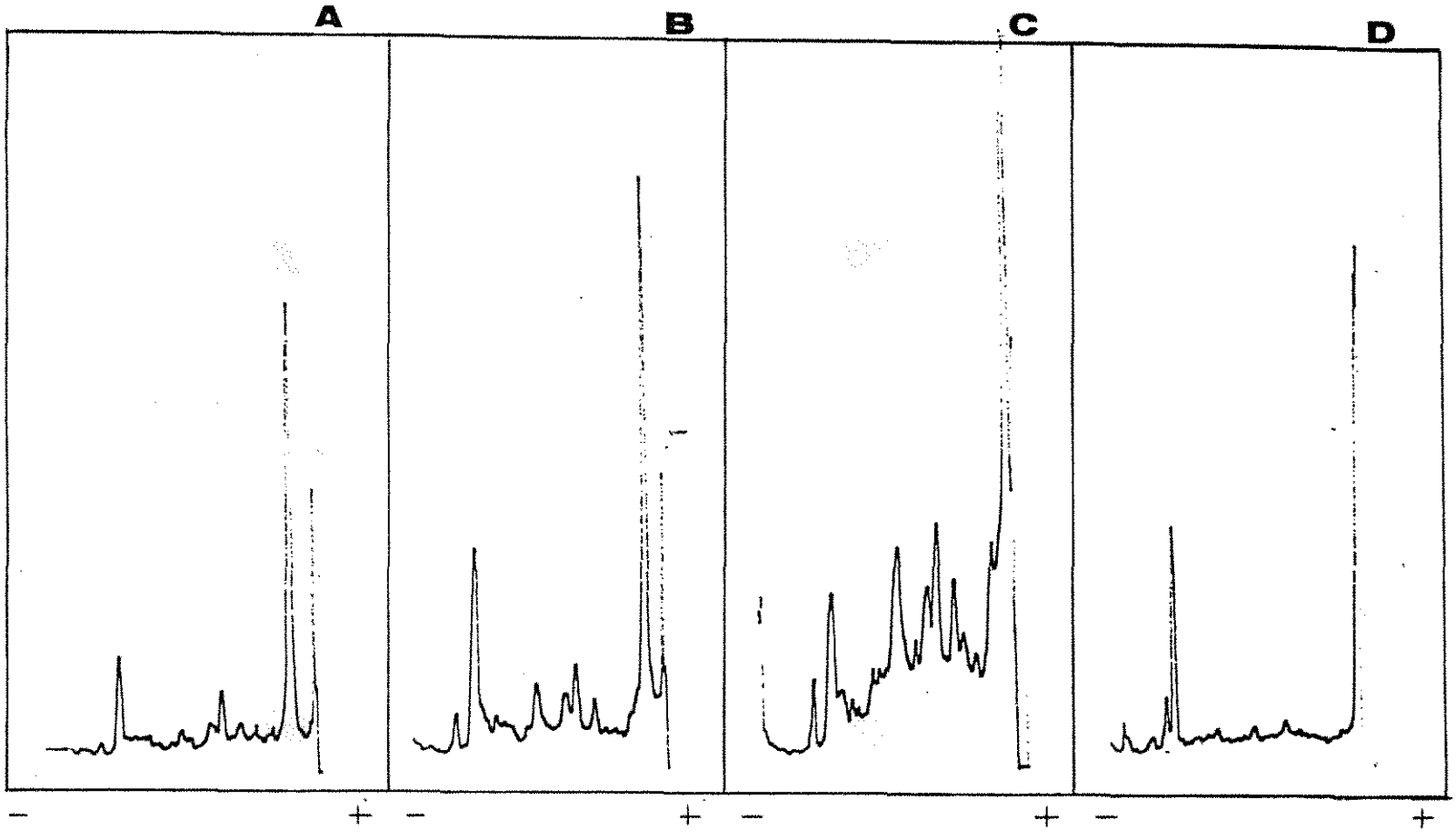


Figura 16 - Traçados densitométricos de proteínas intracelulares de cepas de Streptococcus.

A. 6-G S. mutans (Padrão)
B. VII-2 S. mutans
C. XI-3 S. sobrinus
D. XI-4 S. mutans

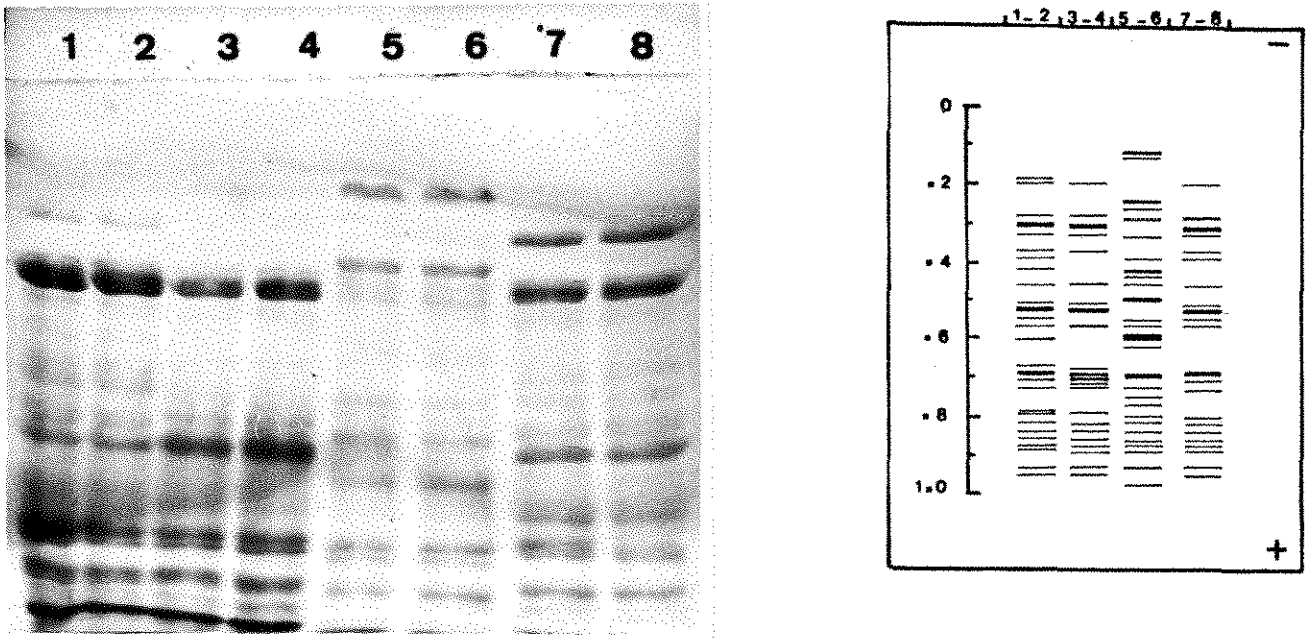


Figura 17 - Perfil eletroforético e diagrama esquemático de proteínas intracelulares de cepas de Streptococcus.

Linhas 1 e 2- 6-G S. mutans (Padrão)
3 e 4- XII-5 Não Identificada
5 e 6- XI-3 S. sobrinus
7 e 8- VII-1 S. mutans

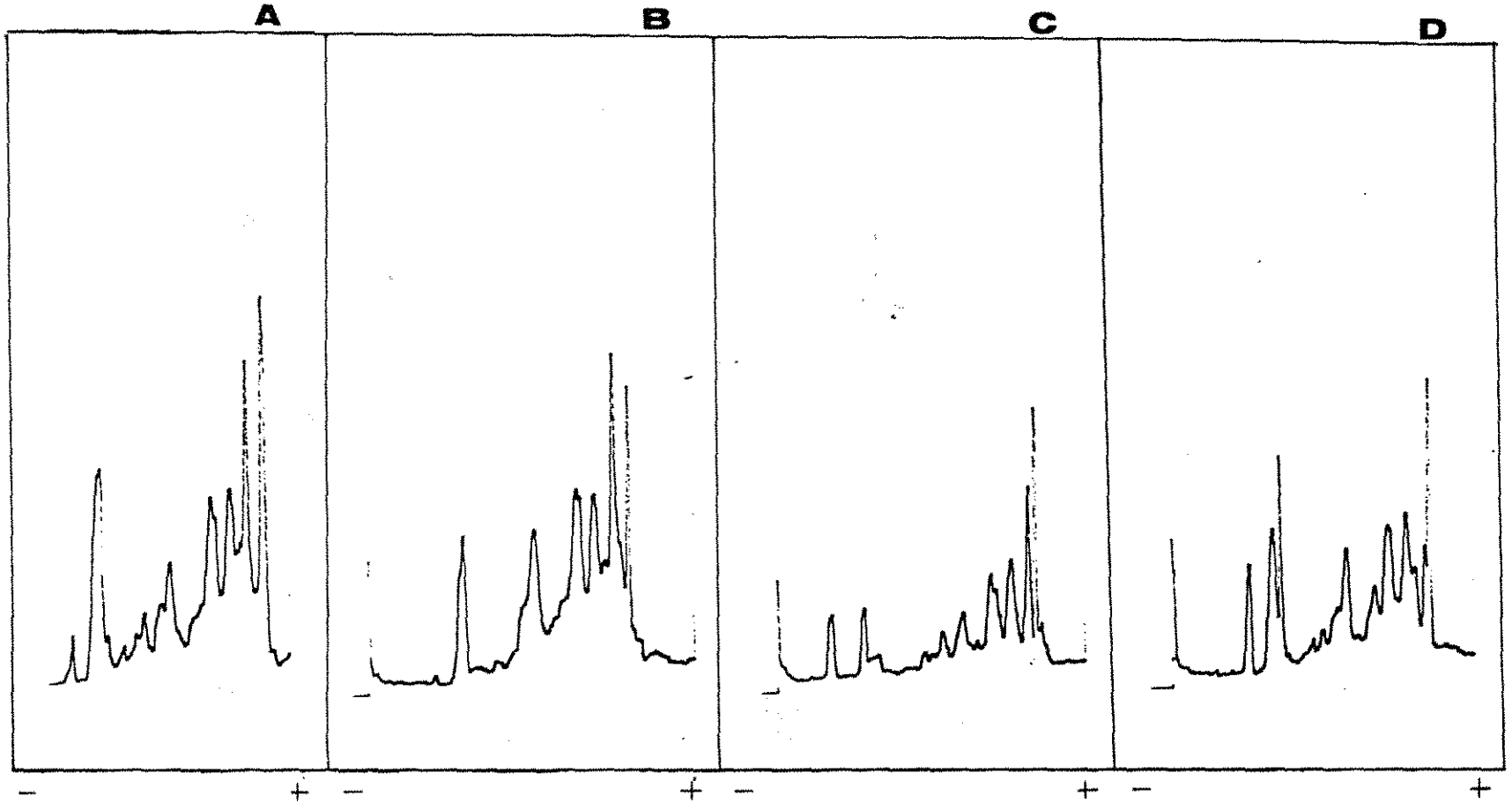
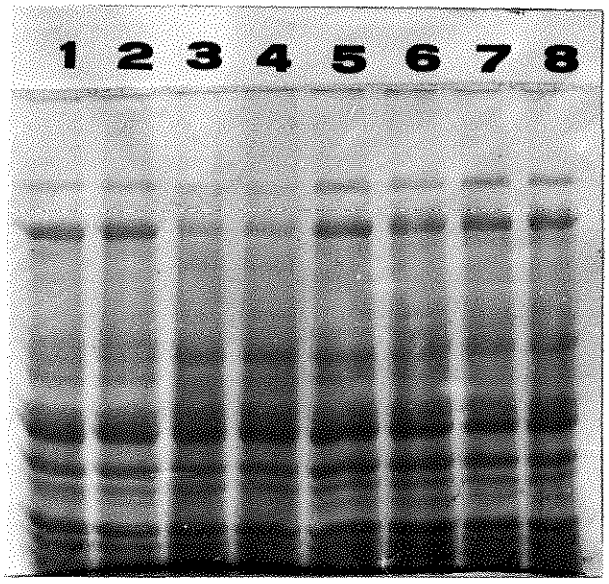


Figura 18 - Traçados densitométricos de proteínas intracelulares de cepas de Streptococcus.

A. 6-G S. mutans (Padrão)
B. XII-5 Não Identificada
C. XI-3 S. sobrinus
D. VII-1 S. mutans



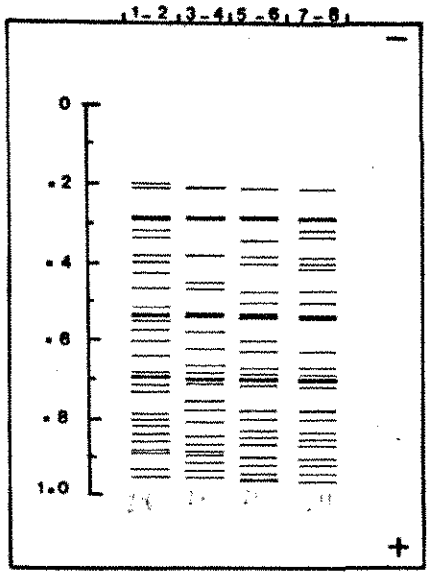


Figura 19 - Perfil eletroforético e diagrama esquemático de proteínas intracelulares de cepas de Streptococcus.

Linhas 1 e 2- 6-G S. mutans (Padrão)
3 e 4- XII-3 Não Identificada
5 e 6- XVI-1 S. rattus
7 e 8- V-5 S. mutans

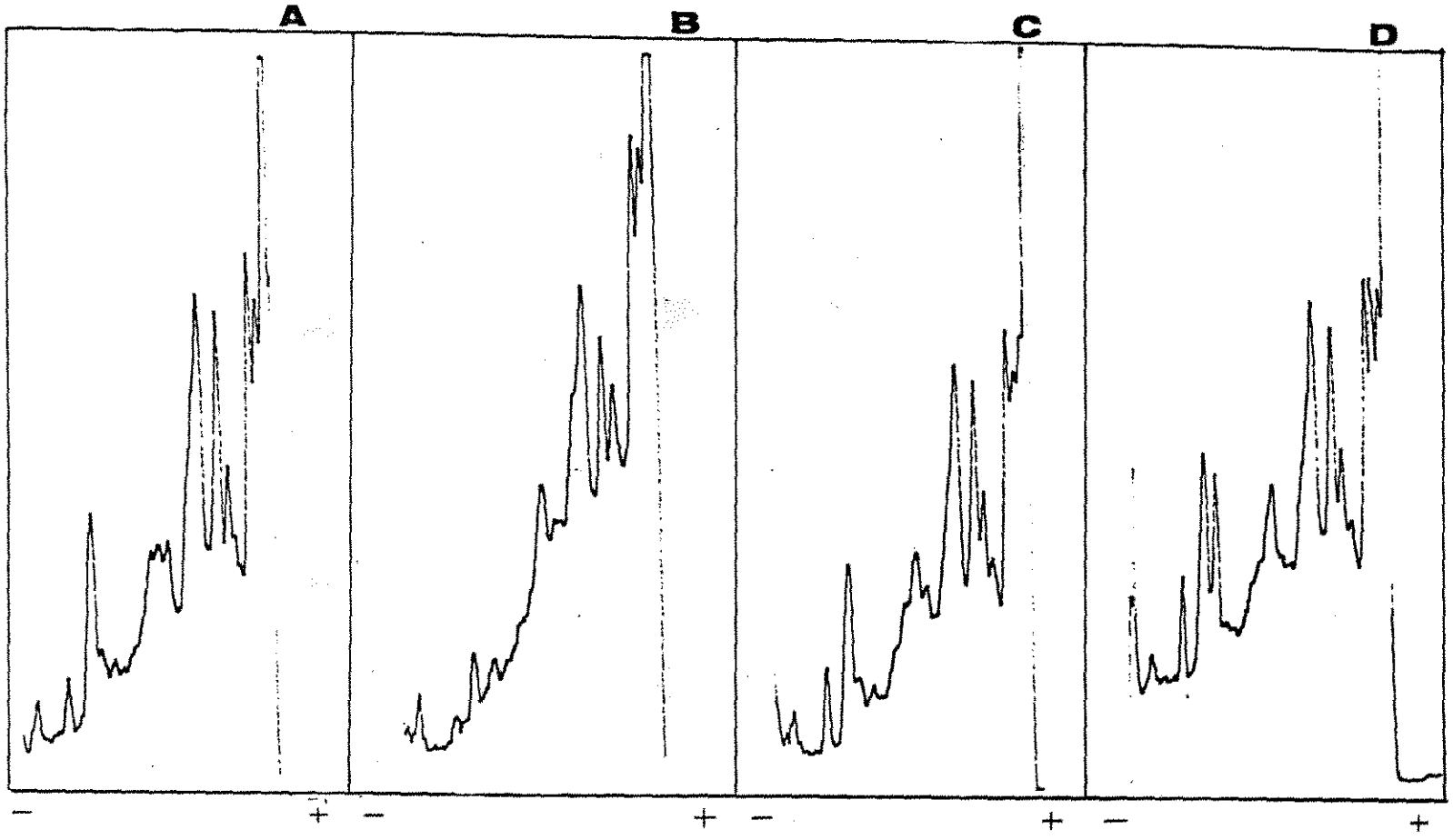


Figura 20 - Traçados densitométricos de proteínas intracelulares de cepas de Streptococcus.

A. 6-G S. mutans (Padrão)
B. XII-3 Não Identificada
C. XVI-1 S. rattus
D. V-5 S. mutans

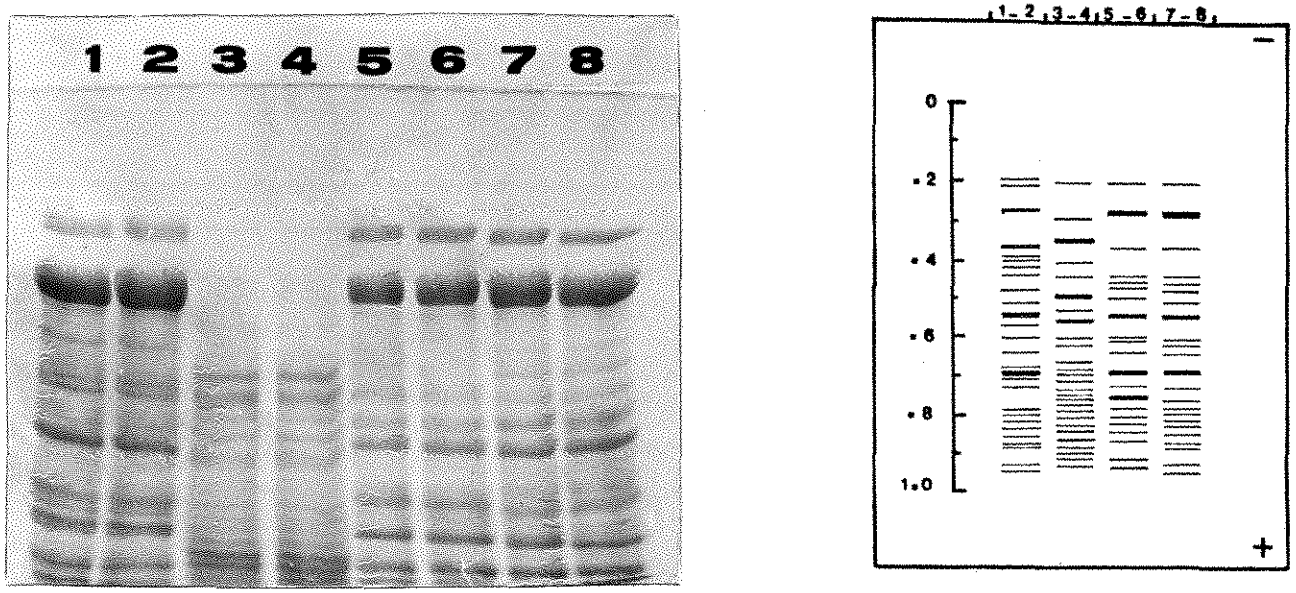


Figura 21 - Perfil eletroforético e diagrama esquemático de proteínas intracelulares de cepas de Streptococcus.

Linhas 1 e 2- 6-G S. mutans (Padrão)
3 e 4- I-4B Não Identificada
5 e 6- XIII-6 S. mutans
7 e 8- XIII-3 S. mutans

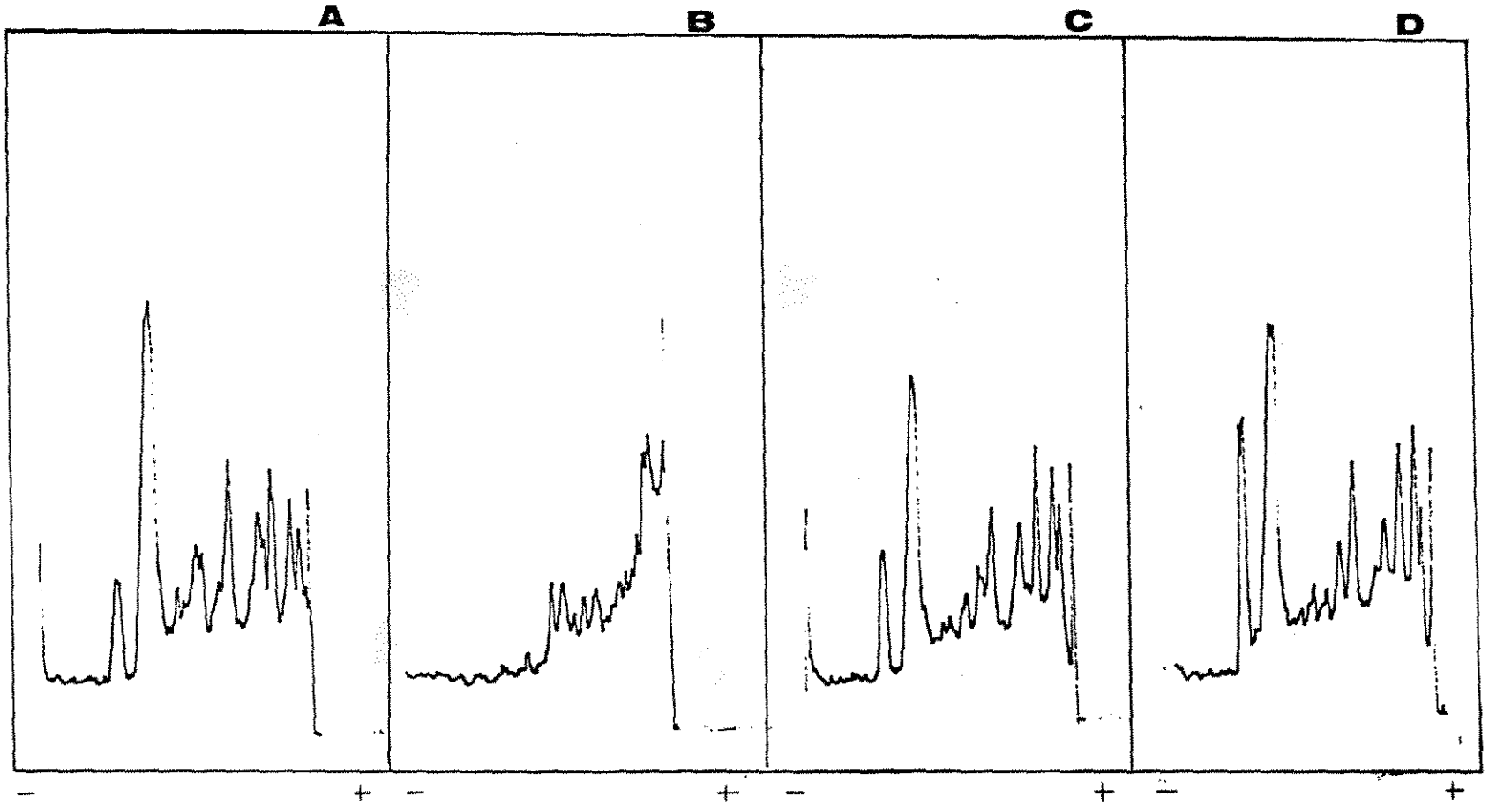


Figura 22 - Traçados densitométricos de proteínas intracelulares de cepas de Streptococcus.

A. 6-G S. mutans (Padrão)
B. I-4B Não Identificada
C. XIII-6 S. mutans
D. XIII-3 S. mutans

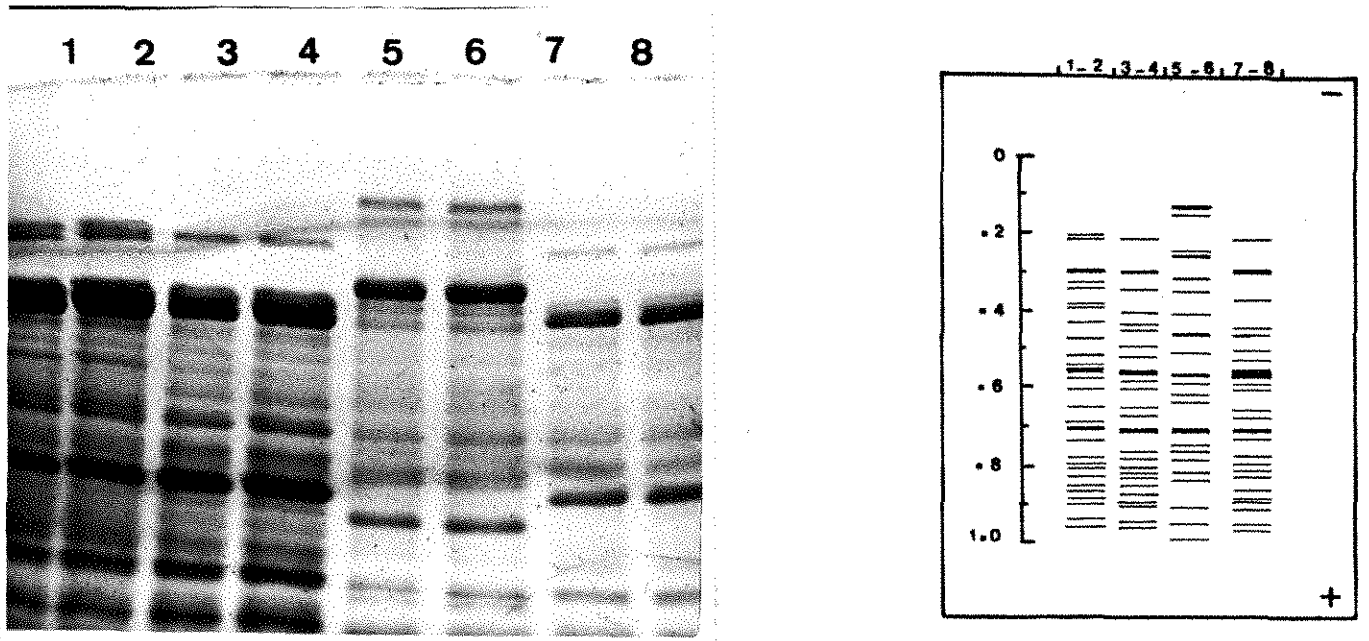


Figura 23 - Perfil eletroforético e diagrama esquemático de proteínas intracelulares de cepas de Streptococcus.

Linhas 1 e 2- 6-G S. mutans (Padrão)
3 e 4- VII-2 S. mutans
5 e 6- XI-3 S. sobrinus
7 e 8- XI-4 S. mutans

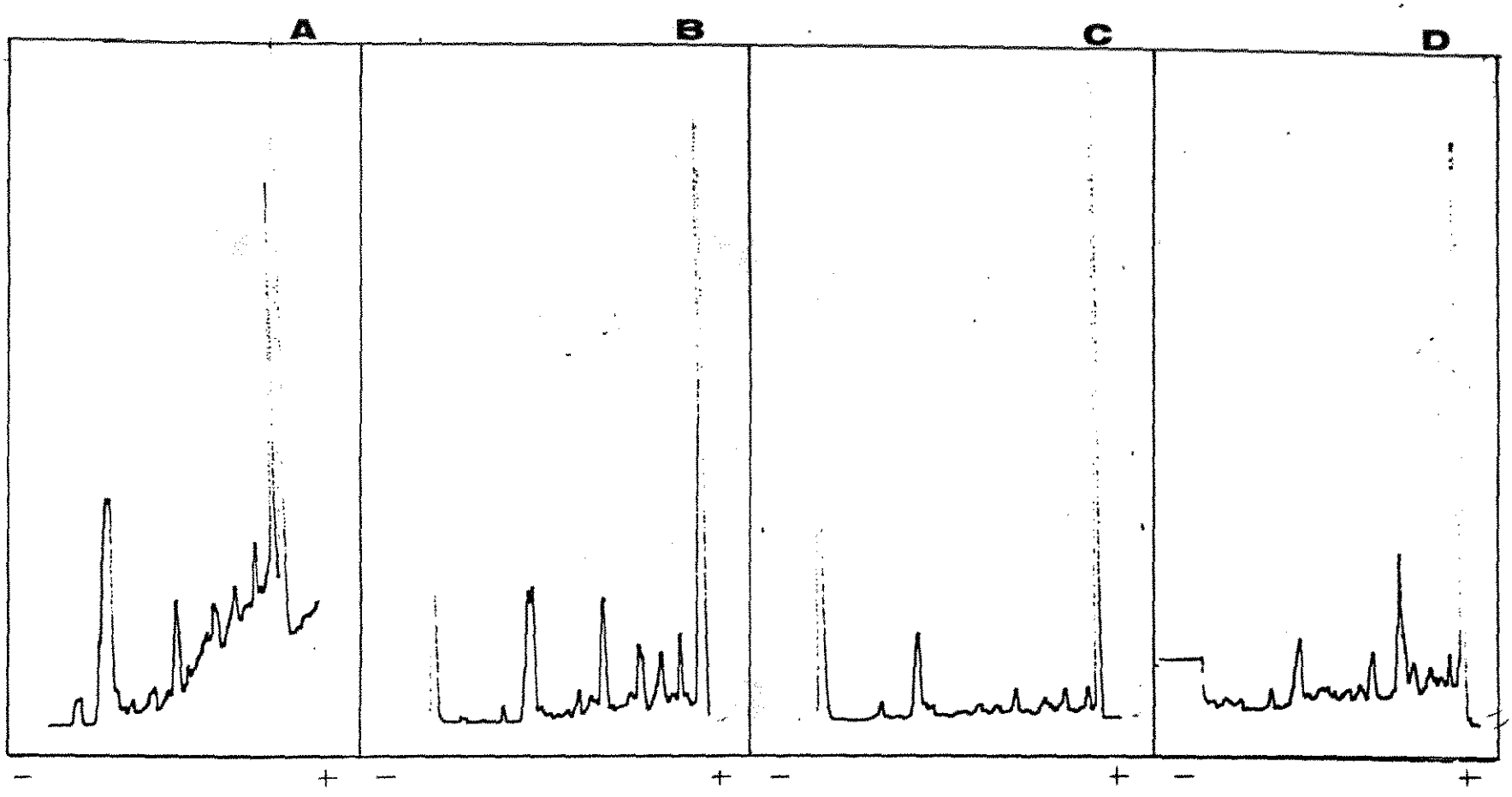


Figura 24 - Traçados densitométricos de proteínas intracelulares de cepas de Streptococcus.

A. 6-G S. mutans (Padrão)
B. VII-2 S. mutans
C. XI-3 S. sobrinus
D. XI-4 S. mutans

DISCUSSÃO

No que diz respeito à bactérias da cavidade oral, com particular referência aos *Streptococcus mutans*, pesquisas têm sido desenvolvidas sob vários pontos de vista: morfológico, bioquímico, genético, patológico e inclusive taxonômico. Assim o emprego de provas bioquímicas, pesquisas de antígenos específicos, experimentos de reassociação de DNA e eletroforose em gel de poliacrilamida, têm sido de fundamental importância na identificação e caracterização desses microrganismos. Como consequência, pode-se observar pela literatura, que há um certo número de informações disponíveis nessa linha de investigação (**BRATTHALL**, 1970; **COYKENDALL**, 1970, 1971, 1974, 1977; **KRAL & DANEO-MOORE**, 1981; **BEIGHTON et al**, 1984), onde várias técnicas têm sido empregadas e desenvolvidas, objetivando-se um maior conhecimento desses microorganismos e de suas diversidades taxonômicas.

A técnica de eletroforese em gel de policrilamida, particularmente, tem demonstrado ser um recurso importante na distinção de pequenas diferenças moleculares existentes entre cepas da mesma espécie de microrganismos, ou seja, entre grupos fenotipicamente semelhantes. Nesse sentido, estudos com microrganismos da cavidade oral (**MOORE et al**, 1980), empregando proteínas de células totais, demonstraram possibilidade de aplicação dessa técnica em estudos ecológicos e de epidemiologia, particularmente quando múltiplas amostras são isoladas. Nessa mesma linha de investiga-

ção, **CATO et al** (1982), estudando espécies do gênero *Clostridium*, demonstraram também, que essa técnica pode ser um recurso importante na diferenciação e caracterização desses microrganismos.

Os estudos realizados nesse trabalho tiveram como objetivo, contribuir para a caracterização de amostras de *Streptococcus* da cavidade oral, sob o ponto de vista da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, empregando-se metodologias distintas na obtenção de proteínas intracelulares microbianas. Os resultados obtidos na determinação dos perfis proteicos das amostras de *Streptococcus*, analisadas pela técnica descrita por **RUSSEL** (1976), demonstraram algumas diferenças entre as amostras. Observou-se que, somente as cepas codificadas como XI-3 e I-4B, diferenciaram-se das demais. As amostras codificadas como 6-G, VII-1, V-5, XIII-6, XIII-3, VII-2 e XI-4 caracterizadas como *S. mutans*, mostraram um padrão semelhante quando comparadas, sendo que as amostras não identificadas bioqumicamente, XII-5 e XII-3 revelaram similaridades com as caracterizadas como *S. mutans*. A amostra XVI-1, descrita como *S. rattus*, não apresentou diferenças detectáveis quando comparada ao padrão, como pode ser verificado nas Figuras 1 a 8. Esses resultados demonstraram que a ressuspensão direta de células totais em mistura solubilizante proposto por **MAIZEL** (1971), permite a possibilidade de se distinguir duas espécies como *S. mutans* e *S. sobrinus*, ou descrever como semelhantes, cepas microbianas supostamente diferentes ou não relacionadas, como XI-3, XII-5, XII-3 e I-4B. Segundo **AMES** (1974) e **RUSSEL**

(1976), a vantagem de se utilizar a metodologia de solubilização direta, se deve à fatores como a manipulação mínima do material - em um curto período de tempo - associada à possibilidade de se poder eliminar as várias etapas de centrifugação e rompimento celular, pertinentes a outras metodologias com o mesmo objetivo. Esses dados confirmam as observações feitas por **BEIGHTON et al** (1984), os quais demonstraram com essa técnica, que amostras microbianas pertencentes ao gênero *Streptococcus*, puderam ser melhor caracterizadas, principalmente quando pode ocorrer confusão na identidade de isolados pertencentes ao mesmo sorotipo, como *S. macacae*, *S. mutans* e *S. ferus*. Mostraram ainda, que várias amostras podem ser analisadas ao mesmo tempo, possibilitando o estudo de um maior número de espécies microbianas.

Os resultados obtidos através da metodologia de **HEPPEL** (1969), onde as amostras foram ressuspendidas em sacarose e mantidas a baixa temperatura antes de serem solubilizadas, mostraram - através da comparação dos perfis eletroforéticos e de suas respectivas mobilidades relativas (Figuras 9 a 16) - que suas proteínas são comuns à quase todas as amostras estudadas, inclusive entre as cepas não identificadas, XII-6 e XII-3, a não ser para as amostras I-4B e XI-3, nas quais observou-se poucas similaridades com as demais amostras citadas. Com relação a amostras XVI-1, verificou-se que não ocorreram diferenças com relação ao padrão *S. mutans*. Esses resultados demonstraram que o processo de choque osmótico também permite a caracterização de espécies microbianas Gram

Positivas, particularmente do gênero *Streptococcus*, mesmo que esteja limitado por um maior tempo de manipulação da amostra, quando comparado às demais técnicas. Segundo **HEPPEL** (1960), o efeito do choque osmótico tem sido um procedimento muito utilizado para bactérias Gram-Negativas - de modo geral - pois ao contrário das Gram-Positivas, estas apresentam uma camada externa menos espessa, que em função do tratamento em meio hipertônico - próprio da técnica - liberam mais facilmente seu conteúdo intracelular. **MALAMY & HORECKER** (1964), **DAVIS & DULBECCO** (1979), investigando proteínas de *E. coli*, puderam demonstrar, também, que a lise completa de uma célula bacteriana se dá através do emprego de sacarose e EDTA, associado à lisozima, ou seja, pelo tratamento com esta enzima, ocorre ruptura da membrana externa pela adição concomitante de EDTA. Este, libera grande parte de lipopolissacarídeos (LSP) e torna a membrana externa mais permeável à saída de osmólitos, causando uma pressão na peptideoglicana, liberando seu conteúdo intracelular. Isto mostra que sob a influência da lisozima e em meio hipertônico, as células bacterianas Gram-Negativas tem sua parede celular alterada e seu conteúdo celular é então liberado. Embora bactérias Gram-Positivas apresentem diferenças estruturais, que teriam relação com os mecanismos aqui discutidos, os dados obtidos em nossas investigações permitem sugerir a aplicação desse método nos estudos em questão.

A análise dos resultados referentes à metodologia empregada por **CATO et al** (1982), cujo objetivo é promover a desintegra

ção mecânica das células, revelaram que as amostras do grupo *mutans* analisadas (6-G, VII-1, V-5, XIII-6, XIII-3, VII-2 e XI-4), são similares, inclusive com relação as cepas não identificadas XII-5 e XII-3, com exceção das amostras XI-3 e I-4B, as quais apresentaram diferenças quando comparadas ao padrão, enquanto várias similaridades com o padrão *S. mutans* foram detectadas para a amostra XVI-1, caracterizada bioquimicamente como *S. rattus*, como pode ser verificado nas Figuras 17 a 24. Verificou-se, que foi possível definir com um certo grau de discernimento, duas espécies distintas (*S. mutans* e *S. sobrinus*), e descrever como semelhantes duas amostras, XII-5 e XII-3 - não identificadas bioquimicamente - dentro do grupo *mutans*. Segundo **MOORE et al** (1980), **SEITER & JAY** (1980) e **SIMONSEN & SHKLAIR** (1972), a vantagem no emprego dessa metodologia, baseia-se no princípio de que a desintegração mecânica com pérolas de vidro, possibilita o rompimento do envoltório celular, liberando todo o seu conteúdo intracelular, originando um maior número de bandas, permitindo assim, uma melhor resolução nos perfis eletroforéticos. Dessa forma, pode-se obter quantidades suficientes de proteínas celulares para aplicação em eletroforese num espaço de tempo razoável e adequado para o estudo de coleções inteiras de bactérias, transformando-se num instrumento importante e eficaz na caracterização rotineira de microrganismos.

Um variado número de testes bioquímicos têm sido usado como um método de escolha na identificação de amostras de cepas

microbianas e têm sido rotineiro o seu emprego com ênfase na caracterização desses organismos, contudo não totalmente eficiente, já que muitas cepas isoladas podem permanecer não identificadas, devido à positividade simultânea de provas críticas para diferenciar duas espécies distintas, como descrito na literatura.

Os resultados obtidos em nossas investigações, com o emprego de técnicas distintas, para obtenção dos padrões eletroforéticos de proteínas intracelulares, permitem sugerir que a metodologia de **RUSSEL** (1976), baseada na solubilização direta, possue algumas vantagens quando comparadas as demais técnicas propostas por **HEPPEL** (1969) e **CATO et al** (1982). O uso direto de dissociante SDS (Duodecil Sulfato de Sódio), além de recuperar algunas proteínas celulares e modificar suas cargas elétricas, parece permitir uma melhor visualização e separação das diversas substâncias no gel, associada à uma redução do tempo de preparo com as diferentes amostras. Comparativamente, a técnica empregada por **CATO et al** (1982), apesar de exigir uma maior preparação do material a ser analisado, pode ser considerado um método adequado e eficiente de estudo, já que se obteve uma melhor resolução do perfil eletroforético com o aumento do número de bandas visualizadas, o que certamente deve contribuir positivamente nos estudos de relações entre as espécies microbianas. Segundo **JACKMAN & WHILEY** (1990), a reprodutibilidade das bandas, é o fator mais importante em taxonomia numérica, onde vários fatores, tais como, condições de corrida, estrutura do gel e preparo das amostras, devem ser considera-

das, ao lado da padronização do tamanho do gel, assim como também a temperatura, que associada aos outros fatores, podem explicar falhas nos géis como por exemplo, a curvatura ocorrida nas extremidades dos mesmos e dificuldades de coloração. De qualquer forma, a escolha de um método adequado de estudo com ênfase na identificação e caracterização de microrganismos, ou mesmo com outros objetivos, sugere uma íntima relação com as condições da amostra a ser analisada, associado aos fatores intrínsicos das várias metodologias disponíveis, permitindo-se considerar a padronização das condições de trabalho, um fator relevante e fundamental em estudos dessa natureza.

Nesse trabalho, o conjunto de informações obtidas e apresentadas, mostram que o emprego da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, pode ser um recurso complementar importante na caracterização dos diversos grupos de microrganismos, de modo geral - e em particular da cavidade oral - confirmando alguns estudos nessa linha de investigação. Os resultados obtidos, abrem possibilidades de novos estudos através da análise de um maior número de cepas microbianas da cavidade oral, inclusive utilizando-se cepas padrão como comparação, no sentido de se obter dados mais precisos, entre essas espécies.

CONCLUSÕES

Os dados obtidos na presente pesquisa, permitiram concluir que:

1 - A metodologia de solubilização direta, apresenta vantagens quando comparadas às demais técnicas usadas. O emprego de SDS (Duodecil Sulfato de Sódio), além de recuperar algumas proteínas celulares e modificar suas cargas elétricas, permite uma melhor visualização e separação das diversas substâncias no gel, associada a uma redução no tempo de preparo das amostras.

2 - O emprego da metodologia de desintegração mecânica, permitiu uma melhor resolução nos perfis eletroforéticos.

3 - De modo geral, os estudos efetuados entre espécies de *Streptococcus* da cavidade oral, analisadas pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, permitiram demonstrar que as amostras VII-1, V-5, XIII-6, XIII-3, VII-2, XI-4 e XVI-1, apresentaram perfis proteicos semelhantes ao padrão *S. mutans* inclusive para as cepas não identificadas, XII-5 e XII-3, enquanto que as amostras I-4B e XI-3 apresentaram poucas similaridades com as demais amostras citadas.

4 - A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, empregando-se a metodologia de solubilização direta (**RUSSEL**, 1976), choque osmótico (**HEPPEL**, 1969) modif, e desintegração celular (**CATO et al**, 1982) modif., permitiram a obtenção de dados com possibilidades de aplicação em estudos de identificação e caracterização de espécies microbianas da cavidade oral, ressalvando suas diferenças.

RESUMO

Com o propósito de se aplicar a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida como contribuição aos estudos de identificação e caracterização de *Streptococcus* orais, amostras de culturas do grupo *mutans*, identificadas bioquimicamente, foram analisadas através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, empregando-se metodologias distintas na obtenção de proteínas intracelulares.

Os resultados obtidos na determinação dos perfis proteicos das amostras microbianas, analisadas pela técnica de solubilização direta, permitiram detectar diferenças entre as mesmas, quando comparadas. Esses resultados demonstraram, que a ressuspensão direta de células totais em mistura solubilizante, permite a possibilidade de se distinguir duas espécies como *S. mutans* e *S. sobrinus*, ou descrever como semelhantes, cepas microbianas supostamente diferentes ou não relacionadas, como XI-3, XII-5, XII-3 e I-4B.

Os testes efetuados com as amostras ressuspendidas em sacarose e mantidas a baixa temperatura antes de serem solubilizadas, demonstraram que o processo de choque osmótico, fornecem dados importantes na caracterização de espécies microbianas, mesmo que esteja limitado por um maior tempo de manipulação da amostra a ser analisada.

A análise dos resultados referentes ao método de desintegração mecânica das células, revelaram um maior número de bandas no gel e uma melhor resolução dos perfis eletroforéticos. Essas observações mostraram que, por essa técnica pode-se obter quantidades suficientes de proteínas celulares para aplicação na técnica de eletroforese num espaço de tempo razoável e adequado para o estudo de coleções inteiras de bactérias, tornando-se um instrumento importante e eficaz na caracterização rotineira de microrganismos.

Os estudos levados à efeito com as amostras analisadas, permitiram demonstrar que as amostras VII-1, V-5, XIII-6, XIII-3, VII-2, XI-4 e XVI-1, são compatíveis com o padrão *S. mutans* comparativamente, inclusive as cepas não identificadas XII-5 e XII-3, enquanto as amostras I-4B e XI-3, apresentaram um padrão característico, não comparáveis às demais amostras. De um modo geral, a eletroforese em gel de poliacrilamida, provou ser uma técnica de valor complementar em estudos com o objetivo de se detectar diferenças ou estabelecer semelhanças entre grupos de microrganismos.

SUMMARY

As a contribuition to the identification and caracterization of oral *Streptococcus*, culture samples of the *mutans* group identified byochemically, were analysed through the polyacrylamide gel electrophoresis technique, using distinct methods to isolate their intracellular proteins.

These results showed that the direct resuspension of the whole cell proteins in buffered solubilizing solution, allows to distinguish between species of *S. mutans* and *S. sobrinus*, or to describe as similar, microbian strains supposely different or not related.

The tests performed with resuspended samples in sucrose and maintained in low temperature before being solubilized, showed thet the osmotic shock procedure give important data in the caracterization of microbian species, even though, it was limited by a larger manipulation time of the samples.

The cell mechanic desintegration method revealed a larger number of bands in the gel and a better resolution of the electrophoretic profiles. With this technique, enough quantities of cellular proteins were yeld in a reasonable and adequate period of time, allowing analisys of whole colections of bacterias, showing to be an efficient instrument in the rotine caracterization of microrganisms.

The samples analysed, showed that the VII-1, V-5, XIII-6, XIII-3, VII-2, XI-4 and XVI-1, ones were similar to the pattern of *S. mutans*; the same ocurred with the XII-5 and XII-3 strains which have not been identified biochemically, while the I-4B and XI-3 strains presented a different pattern. In general, the polyacrylamide gel electrophoresis, showed to be a valuable complementary technique to detect differences or to establish similarities among microrganism groups.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALALUUSUA, S. 1983. *S. mutans* establisment and changes in salivary IgA in young children with reference to dental caries. Longitudinal studies and studies on associated methods. Proc. Finn. Dent. Soc., 79 (Suppl. 3): 1-55.

———— **& RENKONEN, O.V.** 1983. *S. mutans* establishment and dental caries experience in children aged from 2 to 4 years old. Scand. J. Dent. Res., 91: 453-457.

ALLEN, R.C. 1978. Applications of polyacrylamide gel electhophoresis and polyacrylamide gel isoeletric focusing in clinical chemistry. J. Chromatogr. Biomed. Appl., 146: 1-32

AMES, G.F.L. 1974. Resolution of bacterial proteins by polyacrylamide gel electrophoresis on slabs. J. Biological Chemistry. 249(2): 634-644.

BALL, L.C. & PARKER, M.T. 1979. The cultural and biochemical characters of *S. milleri* strains isolated from human sources. J. Hyg. Camb., 82: 63-78.

BEIGHTON, D.; RUSSELL, R.R.B.; HAYDAY, H. 1981. The isolation and characterization of *S. mutans* serotype h from dental plaque of monkeys (*Macaca fascicularis*). J. Gen. Microbiol., 124: 271-279.

———— **et al.** 1984. *S. macacae* sp nov from dental plaque of monkeys. Int. J. Syst. Bacteriol., 34: 332-335.

BERKOWITZ, R.J. & JORDAN, H.U. 1975. Similarity of bacteriocins of *S. mutans* from mother and infant. Archives of Oral Biology, 20: 725-730.

BIER, O. 1984. Estreptococos. In: Microbiologia e Imunologia 23 ed. São Paulo, Melhoramentos, Cap. 27, p.511-527.

BOWDEN, G.H. et al. 1976. The microflora associated with developing carious lesions of the distal surfaces on the upper first premolars in 13-14 year old children. Proceeding - Microbial Aspects of Dental Caries, eds. **STILES, H.M., LOESCHE, W.J.** and **O'BRIEN, T.C.** Special Supplement to Microbiology Abstracts, 1: 223-241.

BRATTHALL, D. 1970. Demonstration of five serological groups of streptococcal strain resembling *S. mutans*. Odontologisk Revy, 21: 143-152.

BRIDGE, P.D. & SNEATH, P.H.A. 1983. Numerical taxonomy of *Streptococcus*. J. Gen. Microbiol., 129: 569-597.

BROWN, A.T. & PATTERSON, C.E. 1972. Heterogeneity of *S. mutans* strains based on their mannitol-1-phosphat dehydrogenases criterion for rapid classification. Infect. Immun., 6: 422-424.

CATO, E.P. et al. 1982. Electrophoretic study of *Clostridium* species. J. Clin. Microbiol., 15(4): 688-702.

CALHOON, D.A.; MAYBERRY, W.R. ; SLOTS, J. 1981. Cellular fatty acid and soluble protein composition of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and related organisms. J. Clin. Microbiol., 14: 376-382.

CARLSSON, J. 1965. Zooglea-forming streptococci, resembling *S. sanguis*, isolated from dental plaque in man. Odontologisk Revy, 16: 348-358.

———— 1968. A numerical taxonomic study of human oral streptococci. Odontologisk Revy, 19: 137-160.

————. 1970. Chemically defined medium for growth of *S. sanguis*. Caries Res., 4: 297-304.

———— & GRIFFITH, C.J. 1974. Fermentation products and bacterial yields in glucose - limited and nitrogen - limited cultures of streptococci. Arch. Oral Biol., 19: 1105-1109.

————; GRAHNEN, H. ; JONSSON, G. 1975. Lacotacilli and streptococci in the month of children. Caries Res., 9: 333-339.

CHAPMAN, G.H. 1944. The isolation of streptococci from mixed cultures. J. Bacteriol., 48: 113-114.

CLARKE, J.K. 1924. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. Br. J. Exp. Pathol., 5: 141-147.

COLMAN, G. 1968. The application of computers to the classification of streptococci. J. Gen. Microbiol., 50: 149-158.

————. 1976. The viridans streptococci. In Selected topics in clinical bacteriology, ed. De Louvous, J., London, Baillière Tindal.

———— & WILLIAMS, R.E.O. 1972. Taxonomy of some human viridans streptococci. In Streptococci and streptococal disease, eds. Wannamaker, L. & Matsen, J.M., London & New York: Academic Press.

COYKENDALL, A. L. 1970. Base composition of deoxyribonucleic acid isolated from cariogenic streptococci. Arch. Oral. Biol., 15: 365.

——— **et al** 1971. DNA- DNA hybridization studies of *S. mutans*. J. Dent. Res., Suppl., 5: 1131-1139.

———.; **SPECHT, P.A. & SAMOL, H.H.** 1974. *S. mutans* in a wild, sucrose-eating rat population. Infec. Immun., 10: 216-219.

———. 1974. Four types of *S. mutans* based on their genetic, antigenic and biochemical characteristics. J. Gen. Microbiol., 83: 327-338.

——— **& SPECHT, P.A.** 1975. DNA base sequence homologies among strains of *Streptococcus sanguis*. J. Gen. Microbiol., 91: 92-98.

———. 1977. Proposal to elevate the subspecies of *S. mutans* to species status based on their molecular composition. Int. J. Syst. Bacteriol., 27: 26-30.

——— **& MUNZENMAIER, A.J.** 1978. Deoxyribonucleic acid base sequence studies on glucan-producing and glucan-negative strains of *S. mitior*. Int. J. Syst. Bacteriol., 28: 511-515.

——— 1983. *S. sobrinus* nom. rev. and *S. ferus* nom. rev: habitat of these and other mutans streptococci. Int. J. Syst. Bacteriol., 33: 883-885.

——— 1989. Classification and identification of the viridans streptococci. Clin. Microbiol. Rev., 2(3): 315-328.

DAVIS, B.J. 1964. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. Ann. New York Acad. Sci, 121: 404-427.

DAVIS, B.D. & DULBECCO, R. 1979. Fisiologia e genética bacteriana. In: Microbiologia 2ª ed. São Paulo. Harper & Row do Brasil Ltda., Cap. 2 e 6.

DE SOET, J.J. et al. 1990. Prevalence of *S. sobrinus* in relation to dental caries in children from Iceland and The Netherlands. Asdc. J. Dent. Child., 57(5): 337-42.

DENT, V.E.; HARDIE, J.M.; BOWDEN, G.H. 1978. Streptococci isolated from dental plaque of animals. J. Appl. Bacteriol., 44: 249-258.

DRUCKER, D.B. & MELVILLE, T.H. 1971. The classification of some oral streptococci of human or rat origin. Arch. Oral Biol., 16: 845-853.

_____ **& GREEN, R.M.** 1978. The relative cariogenicities of *S. milleri* and other viridans group streptococci in gnotobiotic hooded rats. Arch. oral Biol., 23: 183-187.

DUNNY, G.M.; BIRCH, G.H.N.; CLEWELL, D.B. 1973. Isolation and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid from *S. mutans*. J. Bacteriol., 114: 1362-1364.

EDWARDSSON, S. 1968. Characteristics of caries-inducing human streptococci ressembling *S. mutans*. Arch. oral Biol., 13: 637-646.

ELLWOOD, D.C.; PHIPPS, P.J.; HAMILTON, I.R. 1979. Effect of growth rate and glucose concentration on the activity of the phosphoenolpiruvate phospho-transferase system in *S. mutans* Ingbritt grown in continous culture. Infect. Immun., 23: 224-231.

EMILSON, C.G. & BRATTHALL, D. 1976. Growth of *S. mutans* on various selective media. J. Clin. Microbiol., 4: 95-98.

FACKLAM, R.R. 1974. Characteristics of *Streptococcus mutans* isolated from human dental plaque and blood. Int. J. Syst. Bacteriol., 24: 313-319.

_____. 1976. A review of the microbiological techniques for the isolation and identification of streptococci. Crist. Rev. Clin. Lab. Sci., 6: 287-317.

_____. 1977. Physiological differentiation of viridans streptococci. J. Clin. Microbiol., 5: 184-201.

FITZGERALD, R.J. & KEYES, P.H. 1960. Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. J. Am. Dent. Assoc., 61: 9-19.

_____; **JORDAN, H.V.; STANLEY, H.R.** 1960. Experimental caries and gingival pathologic changes in the gnotobiotic rat. J. Dent. Res., 39: 923-935.

_____ & _____. 1968. Polysaccharide-producing bacteria and caries, p. 79-86, In: R.S. Harris (ed.), Art and sience in dental caries research. Academic Press, Inc., New York.

GIBBONS, R.J. et al. 1966. Dental caries and alveolar bone loss in gnotobiotic rats infected with capsule forming streptococci of human origin. Arc. Oral Biol., 2: 549-560.

——— **et al.** 1974. Interdental localization of *S. mutans* as related to dental caries experience. Inf. and Immun., 9: 481-488.

GLEDHILL, W.E. & CASIDA, L.E. 1969. Predominant catalase negative soil bacteria. 1. Streptococcal population indigenous to soil. App. Microbiol., 17: 208-213.

GOLD, O.C.; JORDAN, H.V.; VAN HOUTE, J. 1973. A seletive medium for *S. mutans*. Arch. Oral Biol., 18: 1356-1364.

GORDON, A.H. 1975. Electrophoresis of proteins in polyacrilamide and starch gels. North-Holland, Amsterdam.

GRAUDAL, H. 1952. Motile streptococci. Acta Pathol. Microbiol. Scand, 31: 46-50.

GUGGENHEIM, B. 1968. Streptococci of dental plaque. Caries Res., 2: 147-163.

GUTHOF, O. 1956. Ueber pathogene vergrunende streptokokken: streptokokken-be funde bei dentogen abszessen und infiltraten im bereich der mundhohle. Zentralblatt fur bakteriologie, parasitenkunde, infiltions krankleiten und hygiene. Abt, I, 166: 553-564.

HAMADA, S. & OOSHIMA, T. 1975. Inhibitory spectrum of a bacteriocin-like substance (Mutacin) produced by some strains of *S. Mutans*. J. Dent. Res., 54: 140-145.

———— & **SLADE, H.D.** 1980. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol. Rev., 44: 331-384.

HANDLEY, P.S.; CARTER, P.L.; FIELDING, J. 1984. *Streptococcus salivarius* strains carry either fibrils or fimbriae on the cell surface. J. Bacteriol., 157: 64-72.

HARDIE, J.M. & BOWDEN, G.H. 1976. Physiological classification of oral viridans streptococci. J. Dent. Res., 55: A166-A176.

———— **et al.** 1977. A longitudinal epidemiological study on dental plaque and the development of dental caries-interim results after two years. J. Dent. Res., 56: C90-C99.

————; **WHILEY, R.A.; SACKIN, M.J.** 1982. A numerical taxonomic study of oral streptococci. In Holm and Christensen (Editors), Proceedings of the VIIIth International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases, Reedbooks, Chertsey, pp. 59-60.

HARE, R. 1935. The classification of haemolytic streptococci from the nose and throat of normal human beings by means of precipitin and biochemical tests. J. Pathol. Bacteril., 41: 499-512.

HENRIKSEN, S.D. & HENRICHSEN, J. 1975. Twitching motility and possession of polar fimbriae in spreading *Streptococcus sanguis* isolates from the human throat. Acta Pathol., Microbiol. Scand. Sect. B., 83: 133-140.

HEPPEL, L.A. 1969. The effect of osmotic shock on release of bacterial proteins and on active transport. J. Gen. Physiol., 54: 95-109.

HOERMAN, K.C. et al. 1972 The association of *S. mutans* with early carious lesions in human teeth. J. Am. Dent. Assoc., 85: 1349-1352.

JACKMAN, P.J.H. & WHILEY, R.A. 1990. Microbial systematics identification and fingerprinning based on electrophoretic analysis of proteins. In: Workshop of Microbial Systematics, Campinas, 2-6, april, 1990. Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello".

JUANG, R.H. et al. 1984. Analytical biochemistry, 141: 348-350.

KRAL, T.A. & DANEO-MOORE, L. 1981. Biochemical differentiation of certain oral streptococci. J. Dent. Res., 60: 1713-1718.

KRASSE, B. 1966. Human streptococci and experimental caries in hamsters. Arch. Oral Biol., 2: 429-436.

KELSTRUP, J. & GIBBONS, R.J.. 1969. Bacteriocins from human and rodent streptococci. Arch. Oral Biol., 14: 251-258.

KLOCK, B. & KRASSE, B. 1979. A comparison between different methods for predicition of caries activity. Scand. J. Dent. Res., 87: 129-139.

KOLSTAD, R.A. 1976. Strain typing of oral streptococci by the use of bacterial antagoism. J. Dent. Res., 55: Special Issue A, A154-A165.

LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London), 227: 680-686.

LANCEFIELD, R.C. 1933. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. J. Exp. Med., 57: 571-595.

LOWRY, O.H. et al. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275.

MALAMY, M.H. & HORECKER, B.L. 1964. Purification and crystallization of the alkaline phosphatase of *E. coli*. Biochemistry, 3: 1893.

MARFORT, R.A. et al. 1985. Identificación morfológica, bioquïmica y serológica de *S. mutans* en placa dental de niños. Rev. Asoc. Odont. Argent., 73(2): 40-44.

MAIZEL, J.V. 1971. Methods in virology. Edited by Maramorosch and H. Koprowski. vol. V, champ. 5, p. 179. Academic Press, New York.

McCARTHY, C.; SNYDER; PARKER, R.B. 1965. The indigenous oral flora of man. 1. The new born to the 1 year old infant. Arch. Oral Biol., 10: 61-70.

MEJARE, B. & EDWARDSSON, S. 1975. *Streptococcus milleri* (Guthof) an indigenous organism of the human oral cavity. Arch. Oral Biol., 20: 757-762.

MINETT, F.C. & STABLEFORTH, A.W. 1931. J. Comp. Path. and Therap, 44: 114.

MIRICK, G. et al. 1944. Studies on a non hemolytic streptococcus isolated from the respiratory tract of human beings III. Immunological relationship of streptococcus MG to *S. salivarius* Type 1. J. Exp. Med., 80: 431-440.

MONTAGUE, E.A. & KNOX, K.W. 1968. Antigenic components of the cells walls of *S. salivarius*. J. Gen. Microbiol., 54: 237-246.

MOORE, W.E.C. et al. 1980. Polyacrylamide slab gel electrophoresis of soluble proteins for studies of bacterial floras. Applied and Environmental Microbiology, 39(4): 900-907.

MUNDT, J.O. 1982. The ecology of the streptococci. Microb. Ecol. 8: 355-369.

MURRAY, P.A.et al. 1984. Neuraminidase activity: a biochemical marker to distinguish *S. mitis* from *S. sanguis*. J. Dent. Res., 63: 111-113.

NIVEN, C.F. Jr.; SMILEY, K.L.; SHERMAN, J.M. 1941. The production of large amounts of a polyssacharide by *S. salivarius*. J. Bacteriol., 41: 479-484.

OLSSON, J.; GLANTZ, P.; KRASSE, B. Electrophoretic mobility of oral streptococci. Arch. Oral Biol., 21: 605-609, 1976.

PARKER, M.T. & BALL, L.C. 1976. Streptocci and aerococci associated with systematic infection in man. J. Med. Microbiol., 9: 275-302.

_____. 1983. *Streptococcus* and *Lactobacillus*. In Wilson Miles and Parker (Editors), Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, Seventh Edition, vol. 2, Edward Arnold, London, pp. 173-217.

PERCH, B.; KJEMS, E.; RAVN, T. 1974. Biochemical and serological properties of *Streptococcus mutans* from various human and animal sources. Act. Pathol. Microbiol. Scand., 82: 357-370.

POOLE, P.M. & WILSON, G. 1976. Infection with minute-colony-forming B-haemolytic streptococci. J. Clin. Pathol., 29: 740-745.

ROGERS, A.H. 1975. Bacteriocin types of *S. mutans* in human mouths. Arch. Oral Biol., 20: 853-858.

RUOFF, K.L. & KUNZ, L.J. 1982. Identification of viridans streptococci isolated from clinical specimens. J. Clin. Microbiol., 15: 920-925.

RUSSEL, R.R.B. 1976. Classification of *Streptococcus mutans* strains by SDS gel electrophoresis. Microbios Letters, 2: 55-59.

SAOJI, A.M. & KHARE, P.M. 1985. Poly-Acrylamide gel disc eletrophoresis (PAGDE). Part. I. Ind. J. Pathol. Microbiol., 28: 85-89.

SAUNDERS, K.A. & BALL, L.C. 1980. The influence of the composition of blood agar on beta haemolysis by *Streptococcus salivarius*. Med. Lab. Sci., 37: 341-345.

SCHOTTMÜLLER, H. 1903. Die artun ters scheidung der für den menschen pathogenen streptokokken durch blutagar. Münchener Medizinische Wochen Schrift, 50: 849-909.

SEITER, J.A. & JAY, J.M. 1980. Application of polyacrylamide gel electrophoresis to the characterization and identification of *Arthrobacter* species. Int. J. Syst. Bacteriol., 30: 460-465.

SHERMAN, J.M. 1937. The streptococci. Bacteriol. Rev., 1: 3-97.

SHERMAN, J.M.; NIVEN, C.F. Jr.; SMILEY, K.L. 1943. *Streptococcus salivarius* and other non-hemolytic streptococci of human throat. J. Bacteriol., 45: 249-263.

SHKLAIR, I.L.; KEENE, H.J.; SIMONSON, L.G. 1972. Distribution and frequency of *S. mutans* in caries-active individuals. J. Dent. Res., 51: 882.

_____ & _____. 1974. A biochemical scheme for the separation of the five varieties of *S. mutans*. Arch. Oral Biol., 19: 1079-1081.

SIMONSON, L.G. & SHKLAIR, I.L. 1972. Gel electrophoresis of intracellular components of some cariogenic streptococci. J. Dent. Res., 51(2): 488-491.

SOCRANSKY, S.S. et al. 1977. Bacteriological studies of developing supra-gengival dental plaque. J. Periodont. Res., 12: 90-106.

TANZER, J.M. et al. 1984. Glucose-sucrose-potassium tellurite bacitracin agar, an alternative to mitis salivarius-bacitracin agar for immuneration of *S. mutans*. J. Clin. Microbiol., 20: 653-659.

TINANOFF, N.; GROSS, A.; BRADY, J.M. 1976. Development of plaque on enamel. Parallel investigations. J. Periodont. Res., 11: 197-209.

VAN DER HOEVEN, J.S.; ROGERS, A.H.; MIKX, F.H.M. 1977. Inhibition of *A. viscosus* by bacteriocin-producing gnotobiotic rats. J. Dent. Res., 56 Special Issue A: A132. Preprinted abstract 357.

VAN HOUTE, J.; JANSEN, H.M.; BELLACK, S. 1971. Proportions of *S. sanguis* an organism associated with subacute bacterial endocarditis, in human faeces and dental plaque. Inf. and Immun., 4: 658-659.

VAN PALENSTEIN HELDERMAN, W.H.; IJSSELDIJK, M.; HUIS IN'T VELD, J.H.J. 1983. A selective medium for the two major subgroups of the bacterium *S. mutans* isolated from human dental plaque and saliva. Arch. Oral Biol., 28: 599-603.

VERNAZZA, T.R. & MELVILLE, T.H. 1977. Bacteriocin-like activity in strains of *S. mitis*. Int. Assoc. Dent. Res. Brit. Div., Preprinted abstract, 76.

WASHBURN, M.R.; WHITE, J.C.; NIVEN, C.F. Jr. 1946. Streptococcal S.B.E.: immunological characteristics. J. Bacteriol., 51: 723-729.

WEBER, K. & OSBORN, M. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem., 244(16): 4406-4416.

WHITE, J.C. & NIVEN, C.F. Jr. 1946. *Streptococcus* S.B.E.: A *streptococcus* associated with subacute bacterial endocarditis. J. Bacteriol., 51: 717-722.

WILLIAMS, R.E.O. 1956. *Streptococcus salivarius* (Vel. hominis) and its relations to Lancefield's group K. J. Path. Bacteriol., 72: 15-25.

WOLFE, L. &LILJEMARK, W.F. 1978. Observation of beta hemolysis among three strains of *Streptococcus mutans*. Infect. Immun., 19: 745-748.

WOLTJES, J.; MAC LAREN, D.M.; DE GRAAF, J. 1979. Beta haemolysis by *Streptococcus mutans*. Antonie van Leeuwenhoek, 450: 514.

————————; **LEGDEUR-VELTHUIS, H.; DE GRAAF, J.** 1981. Detection and characterization of hemolysin production in *S. mutans*. Infect. Immun., 31(3): 850-855.

ZINNER, D.O. & JABLON, J.M. 1968. Human streptococcal strains in experimental caries. In The Art and Science of Dental Caries Research, ed. Harris, R.S., London & New York, Academic Press.

APÊNDICE

1 - COLETA DE SALIVA

A coleta da saliva foi realizada através da técnica de KLOCK & KRASSE (1979). A saliva estimulada foi obtida pela mastigação de 1.0 g de goma base de mascar por um período de 5 minutos, e em seguida preservada em banho de gelo até ser manipulada.

2 - MANIPULAÇÃO DO MATERIAL

Após diluição da saliva em solução salina fosfatada pH 7.2, estas foram semeadas em placas contendo meio *Mitis-Salivarius*-Bacitrina (MSB), seguindo-se a incubação por 48 horas a 37°C em jarras anaeróbicas.

Após o crescimento bacteriano de cada uma das placas, foram obtidas colônias de morfologia suspeita de *S. mutans*, as quais foram semeadas em Caldo Infuso Cérebro Coração (BHI) e incubadas por 48 horas em atmosfera de CO_2 a 37°C. Após a necessária bacterioscopia para confirmação da pureza das culturas, foram realizadas as provas bioquímicas de identificação.

3 - IDENTIFICAÇÃO: PROVAS BIOQUIMICAS

3.1 - Produção de ácidos a partir de substâncias fermentáveis: manitol, sorbitol, rafinose, salicina, melibiose

O meio utilizado foi o BHI, acrescido de púrpura de bromocresol a 0.0016% em pH 7.0, esterilizado por autoclave a 121°C por 20 minutos. A solução de carboidratos foi adicionado ao meio com indicador, numa concentração final de 1% e distribuídos em tubos.

O inóculo consistiu de alíquotas de 0.1 ml de culturas de 24 horas, seguindo-se incubação a 37°C em jarras anaeróbicas. A prova foi considerada positiva, quando ocorria mudança do indicador de púrpura para amarelo, após 72 horas de incubação.

3.2 - Hidrólise de Arginina

A capacidade das cepas hidralizarem arginina produzindo amônia foi testada, onde a cor amarelo amarronzada foi considerada como indicativa da presença de amônio de meio.

3.3 - Produção de peróxido de hidrogênio

A produção de peróxido de hidrogênio pelas amostras foi detectada pelo aparecimento de halo marrom escuro ou preto em torno da colônia.

3.4 - Hidrólise de esculina

O meio base foi o BHI acrescido de 0.03% de esculina. Para revelar a reação, adicionou-se 0.2 ml de citrato férrico amoniacal a 1%. A cor preta foi considerada prova positiva.

3.5 - Hidrólise do amido

O meio base foi o BHI acrescido de 1% de amido e 1.5% de agar, que foram misturados, autoclavados, plaqueados e a semeadura realizada em picada, seguida de incubação a 37°C em jarras anaeróbicas.

3.6 - Resistência à bacitracina

Utilizou-se o meio base para fermentação do manitol, acrescido de bacitracina. A resistência à bacitracina foi determinado pelo crescimento da amostra no meio.

3.7 - Crescimento em aerobiose

O caldo BHI esterilizado, foi inoculado com 0.1 ml de cultura de 24 horas das amostras a serem testadas e incubadas a 37°C em ambiente de aerobiose. A leitura foi realizada após 48 horas. A prova foi considerada positiva quando ocorria o turvamento do meio ou crescimento precipitado no fundo do tubo.

4 - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

4.1 - TYE - Tryptone Yeast Extract

Tryptone	10 g
Yeast Extract	3 g
NaCl	2 g
$NaHCO_3$	1 g
K_2HPO_4	2 g
Glicose	5 g
Water	1 l

4.2 - Brain Heart Infusion Agar

BHI	3,7 g
Yeast Extract	0,5 g
Agar	0,1 g
Water	100 ml

5 - ELETROFORESE

5.1 - Soluções Estoque

(A)		(B)	
HCl 1N	- 48,0 ml	HCl 1N	- 48,0 ml
Tris	- 36,6 g	Tris	- 5,98 g
Temed	- 0,23 ml	Temed	- 0,46 ml
Water q.s.p.	- 100 ml	Water q.s.p.	- 100 ml
pH	- 8,9	pH	- 6,7

(C)

Acrilamida	- 28,0 g
Bis-Acrilamida	- 0,8 g
WAter	- 100 ml

(D)

Acrilamida	- 10,0 g
Bis-Acrilamida	- 2,5 g
Water	- 100 ml

(E)

Riboflavina	- 4,0 mg
Water	- 100 ml

(F)

Persulfato de Potássio	- 0,166 g
Water	- 100 ml

5.2 - Solução Tampão para Corrida (10x)

Tris	6,0 g
Glicina	28,8 g
Water	1.000 ml
pH	8,3

5.3 - Solução Corante

Coomassie Bue G-250	0,1 g
Metanol	25 ml
Ácido acético	7 ml
Water q.s.p.	100 ml

5.4 - Solução para Descoloração e Estoque do Gel

Metanol	25 ml
Ácido Acético	7 ml
Water q.s.p	100 ml