

# PURIFICAÇÃO DA PAREDE CELULAR DE MICROORGANISMOS DA PLACA DENTAL\*

PURIFICATION OF THE CELLULAR WALL  
OF DENTAL PLAQUE MICROORGANISMS

**Roseli Teixeira Miranda MENINO\***

*Aluna do Curso de Mestrado em Diagnóstico Bucal da  
Faculdade de Odontologia de Bauru - USP*

**Sergio A. Catanzaro GUIMARÃES**

*Prof. do Departamento de Patologia da Faculdade de  
Odontologia de Bauru - USP*

**Eulazio Mikio TAGA**

*Prof. do Departamento de Bioquímica da da Faculdade de  
Odontologia de Bauru - USP*

**Regina Stela Stilac ROCHA**

*Profª. do Departamento de Patologia da Faculdade de  
Odontologia de Bauru - USP*

**Maria Cristina C. FELIPPE**

*Técnica Especializada do Departamento de Bioquímica da  
Faculdade de Odontologia de Bauru - USP*

**Olinda TÁRZIA**

*Profª. do Departamento de Bioquímica da da Faculdade de  
Odontologia de Bauru - USP*

*\*Trabalho extraído da  
Tese de Mestrado em  
Diagnóstico Bucal  
defendida pelo  
primeiro autor  
em 8/12/1988*

---

**E**stabeleceu-se uma metodologia para purificação da parede celular de microorganismos da placa dental. O material purificado tornou-se um agente flogógeno útil em modelos de estudo de reações inflamatórias agudas e crônicas.

**UNITERMOS:** Placa dental; Parede bacteriana

---

## INTRODUÇÃO

A placa dental é definida como um agregado de microorganismos que se adere à superfície dos dentes e em outras estruturas sólidas presentes na cavidade bucal. Em geral ela se deposita sobre a superfície da película adquirida que é constituída principalmente por

uma delgada camada de glicoproteínas salivares. As bactérias se aderem à película adquirida através de vários fatores de aderência e também através da co-agregação bacteriana<sup>8,11</sup>.

A placa dental é composta por uma fração celular (microorganismos) e um componente acelular (matriz), sendo que este último compreende derivados da saliva

e do fluido gengival, células epiteliais, granulócitos neutrófilos e produtos derivados do metabolismo bacteriano, como por exemplo, os polissacarídeos extracelulares<sup>27</sup>.

Os componentes celulares são constituídos na sua maioria por bactérias de diferentes tipos morfológicos, que variam dependendo do local onde se encontram (subgengival ou supragengival), variando também de pessoa para pessoa e conforme a severidade da doença (exemplo, microorganismos Gram negativos aumentam na doença periodontal). Além disso, diferentes entidades clínicas da doença periodontal estão associadas com diferente composição bacteriana<sup>1</sup>.

As bactérias são mais comumente classificadas pela coloração de Gram, e esta coloração está relacionada com a diferença de permeabilidade da parede celular que corresponde ao invólucro bacteriano. A parede celular constitui uma membrana impermeável com a espessura de 10 a 20 µm, correspondendo a 20% do peso seco da célula bacteriana<sup>1</sup>.

A parede de bactérias Gram positivas é constituída por macromoléculas (muco-complexos) formadas de glicoproteínas (proteoglicanos) e ácido teicóico. Os proteoglicanos são formados por várias unidades de ácido murâmico que se repetem. O ácido murâmico se liga à porção peptídica que corresponde a um tetrapeptídeo (Ala-Glu-Lis-Ala). O ácido teicóico, um polímero de fosfato de glicerol ou ribitol, se une ao ácido murâmico do glicopeptídeo através de ligações fosfodiéster, podendo ainda ocorrer resíduos de açúcar e de alanina, de maneira a constituírem macromoléculas específicas à superfície das bactérias, as quais atuam como determinantes antigênicos<sup>1</sup>.

A parede celular de bactérias Gram negativas é menos espessa e mais complexa, pois apresenta uma camada externa de lipopolissacarídeo (endotoxina) ligado covalentemente ao glicopeptídeo adjacente. A composição dos lipopolissacarídeos é bem conhecida nas enterobactérias e compreende um polímero trissacarídico (galactose-manose-ramnose) ligado a um polissacarídeo comum e este conjunto, através do cetodesoxioctonato, a um componente lipídico, conhecido como lípido A. Ao lípido A atribui-se a ação endotóxica da macromolécula do lipopolissacarídeo, enquanto que a especificidade antigênica é devido ao tipo de ligação que ocorre entre os monossacarídeos (alfa e beta).

O estudo da etiopatogenia da doença periodontal através de experiências "in vitro" e "in vivo", tem sido atualmente realizado utilizando-se como agente flogógeno a parede purificada de bactérias da placa

dental com a finalidade de elucidar a ação deste componente bacteriano no processo inflamatório. A partir destes estudos algumas de suas propriedades já se acham esclarecidas.

Entre estas propriedades podemos citar: (1) os lipopolissacarídeos (endotoxinas) participam da indução da reação imunopatológica através da ativação de fatores do soro (complemento), levando à liberação de heparina e histamina pelos mastócitos, sendo ainda quimiotáticos para leucócitos polimorfonucleares e macrófagos; (2) o ácido teicóico possui propriedades similares aos lipopolissacarídeos, apresentando apenas uma maior especificidade sorológica quando comparado com o lado O-específico da cadeia do lipopolissacarídeo; (3) a parede celular dos microorganismos da placa testada "in vivo" e "in vitro" demonstra uma quimiotaxia inicial para granulócitos neutrófilos a qual não perdura por mais de 24 horas, apresentando a seguir uma maior atração para macrófagos, formando uma lesão nodular crônica, cujos nódulos são firmemente aderidos ao tecido circundante e raramente apresentam ulcerações centrais e presença de linfócitos; (4) ainda foi observado que a quantidade de endotoxina no fluido gengival é diretamente proporcional ao grau de inflamação clínica do periodonto<sup>4,5,11,12,13,14,15,16,17,18,20,22,24</sup>.

No presente trabalho foi estabelecida a técnica de purificação da parede bacteriana de microorganismos da placa dental com a finalidade de futuramente utilizar o material purificado como agente flogógeno em reação inflamatória aguda e crônica e se estabelecer um modelo de reação inflamatória frente este agente.

## MATERIAL E MÉTODOS

A placa dental foi colhida de crianças de 11 a 15 anos, de localização supragengival e ausente de contaminação com sangue, com auxílio de instrumentos periodontais do tipo cureta. O "pool" de placa foi recolhido em tubos de centrífuga contendo NaCl 0,9% e imersos em gelo moído acondicionado em isopor.

No laboratório o "pool" de placa foi suspenso em agitador automático para tubos (Agitador para tubos Phoenix-Modelo AT-56) e centrifugado a 1800 rpm durante 15 minutos em centrífuga refrigerada, modelo PR-6 International. O sobrenadante foi descartado e o precipitado armazenado a -20°C.

O precipitado armazenado foi liofilizado, pesado (peso seco), diluído a 5% em NaCl 0,9% e sonificado em sonificador tipo Sonifier Cell Disruptor (Modelo B-30) durante 12 horas com uma intensidade de força de

saida igual a 6, impulso de 50%, de forma intermitente, isto é, com uma parada de sonicação a cada 2 minutos, dando igual tempo de descanso, com a finalidade de manter a temperatura o mais baixo possível, nunca excedendo a 14°C. Durante o tempo de descanso se conseguia um retorno da temperatura para próximo de 1°C.

O tubo que continha o material a ser sonicado foi montado numa caixa de isopor onde se fixava por meio de uma escavação no fundo da caixa e uma perfuração na tampa, em cujo interior continha uma mistura de gelo moído e sal para se conseguir manter a temperatura o mais baixo possível por tempo prolongado. A cada 40 minutos havia a necessidade de se completar a altura da caixa com a mistura de gelo e sal.

O tempo de 12 horas de sonicação foi escolhido em função de testes de esfregaços corados pelo Gram, realizados no material inicial e em amostras retiradas do mesmo durante o período de sonicação. De ambos esfregaços, inicial e final, foram feitas fotomicrografias cujo aumento final foi de aproximadamente 1.560 vezes.

O sonicado de 12 horas foi centrifugado, em centrífuga Sorvall RC2-B, rotor SS-34, a 1000 rpm durante 30 minutos. Após a centrifugação o sedimento foi lavado com água destilada por duas vezes e centrifugado da maneira acima descrita, sobrando como sedimento final partículas grandes e restos alimentares, a que denominamos fração I.

Os sobrenadantes obtidos foram juntados e novamente centrifugados na mesma centrífuga (rotor SS-34) a 10.000 rpm por 20 minutos a -4°C. O sobrenadante desta centrifugação, fração II, corresponde a pequenas partículas e citoplasma e o mesmo foi, neste experimento, desprezado. Por sua vez o sedimento, que é a parede celular ainda impura, continuou passando por novos processos de purificação.

O sedimento da parede celular impura foi lavado com NaCl 1M durante 1 minuto e centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos a -4°C (rotor SS-34). O sobrenadante foi desprezado e o sedimento (parede celular) continuou a ser tratado, enzimaticamente, com a finalidade de retirar contaminantes de nucleoproteínas (RNA e DNA) que costumam continuar ligadas à parede e interferem no processo final de purificação.

O sedimento foi suspenso em tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 7,5 contendo tripsina 0,05%, ribonuclease A e ribonuclease B (ambas na concentração de 0,025%) desoxirribonuclease 0,0125% e

incubado a 37°C durante 12 horas.

Após o tempo de incubação a suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm por 30 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e o sedimento continuou a ser tratado por lavagem com água destilada. A lavagem foi repetida por tres vezes e a cada lavagem procedeu-se a centrifugação em rotor SS-34 (Centrífuga Sorval do tipo RC2-B) a 10.000 rpm por 30 minutos; tomando-se o cuidado de não exceder o volume de 10 ml em cada tubo de centrífuga. Os sobrenadantes foram desprezados e o sedimento lavado com água destilada e centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos (10 ml em cada tubo). O sedimento desta centrifugação (fração III) foi reservado para uma repurificação a partir do tratamento enzimático (para obtenção de uma maior quantidade do material purificado).

O sobrenadante foi centrifugado a 12.000 rpm por 45 minutos (rotor SS-34). A partir dessa última centrifugação eliminou-se o sobrenadante e o sedimento ("pellet") constituindo a chamada fração IV corresponde à parede celular purificada que passamos a denominar de Parede Purificada de Placa Bacteriana (PPPB).

O purificado final (PPPB), suspenso num volume o menor possível, foi utilizado inicialmente para quantificação de proteína pelo método de LOWRY et al<sup>10</sup> e de carboidrato total pelo método de DUBOIS et al<sup>9</sup>.

Uma vez conhecendo-se a concentração de proteína, o volume foi completado com água destilada para se conseguir uma concentração correspondente a 1 µg de proteína/µl.

## RESULTADOS

Neste trabalho foi desenvolvido o processo de purificação da parede celular bacteriana de microorganismos da placa dental, cujos resultados relativos ao rendimento do material purificado e quantificação de proteína e carboidrato total podem ser vistos na tabela I.

O tempo de 12 horas de sonicação foi escolhido em função de testes de esfregaços corados pelo Gram, realizados no material inicial e em diversas amostras retiradas do mesmo durante o período de sonicação. Na observação do esfregaço obtido depois de 12 horas foi possível considerar, em comparação com o esfregaço do material inicial (antes do início da sonicação) que se havia conseguido o rompimento da maior parte dos microorganismos presentes.

De ambos esfregaços foram feitas fotomicrografias cujos resultados podem ser vistos nas figuras 1 e 2.

## DISCUSSÃO

A purificação da parede celular de placa bacteriana realizada neste trabalho seguiu parcialmente a metodologia de trabalho proposta por WALLINDER; NEUJAHR<sup>23</sup>, que realizaram seus experimentos a partir de cultura pura de *Lactobacillus fermenti*.

Em nosso trabalho a principal intenção era obter um purificado de Parede de Placa Bacteriana (PPPB) que permanecesse, após os diferentes tratamentos de purificação, o mais possível nas condições encontradas "in natura" de tal maneira a ser representativo das condições encontradas na cavidade bucal.

Por essa razão foram necessárias algumas modificações de técnica, tais como evitar a fervura para a interrupção do tratamento enzimático bem como dispensar o tratamento final com TCA a 10%, e em consequência não continuar o tratamento extrativo do ácido lipoteicóico com álcool e éter. Dessa maneira, enquanto

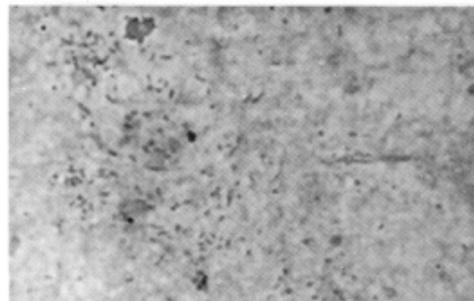
**Tabela 1 - Rendimento do Purificado de Parede Celular Bacteriana do "pool" de Microorganismos da Placa Dental**

ITEM	SEQUÊNCIA DE PURIFICAÇÃO	VALORES QUANTIFICADOS
1	Pesô Seco de Placa Dental (Liofilizado)	1,350mg
2	Volume Final da Suspensão do Liofilizado (a 5%)	27ml
3	Tempo de Sonicação	12horas
4	Proteína Total no Sonicado	207mg
5	Proteína Total no Purificado Final (Fração IV)	6,5mg
6	Carboidrato Total no Purificado Final (Fração IV)	13,98mg
7	Relação Proteína/Carboidrato no Purificado Final (Fração IV)	1:2
8	Rendimento do Purificado de Parede Celular de Placa Bacteriana (PPPB)	
	a) Proteína Total no PPPB em Relação ao Peso Seco da Placa (Item 1 - 100%)	0,48%
	b) Proteína Total no PPPB em Relação à Proteína Total no Sonicado (Item 4 - 100%)	3,14%

os autores obtiveram no final da purificação a porção isolada de peptidoglicano nós chegamos apenas até a fase de obtenção de Parede Celular de Placa Bacteriana (completa) ou seja Peptidoglicano-Ácido Lipoteicóico. Apesar de todos esses cuidados, durante o tratamento enzimático, o uso de tripsina (0,05%) deve ter alterado



**Figura 1 - Estreptococo corado pelo Gram, realizado a partir da suspensão do liofilizado de placa dental a 5%, a ser posteriormente submetida ao processo de sonicação (Escala 1:1.560).**



**Figura 2 - Estreptococo corado pelo Gram, realizado a partir da suspensão do liofilizado de placa dental a 5%, após sonicação durante 12 horas (Escala 1:1.560).**

ligeiramente a composição da porção peptídica em relação aos aminoácidos menores (arginina, treonina, tirosina e prolina que provavelmente não deverão ser detectados, enquanto o ácido glutâmico deverá ter caído para níveis bastante pequenos), como observado por WALLINDER; NEUJAHR<sup>23</sup>.

Uma vez que a purificação do material, seguindo exatamente o tratamento enzimático preconizado, demonstrava (talvez devido ao fato de se tratar de um "pool" de microorganismos e não de uma cultura pura) a presença de resíduos de ácidos nucleicos, foi necessário, neste passo da purificação, incluir as enzimas ribonuclease A e B (na concentração de 0,025% cada uma) e aumentar a concentração da desoxirribonuclease de 0,0006% para 0,0125%.

Na tabela I podemos verificar que o rendimento final do PPPB tomado em mg de proteína tanto em relação ao peso seco da placa dental liofilizada como em relação ao conteúdo total de proteína quantificada no sonificado foi extremamente baixo, respectivamente 0,48% e 3,14%.

Devido à baixa concentração do PPPB obtido no final do processo de purificação, não foi possível realizar sua liofilização e pesagem para que se tivesse, então, um rendimento percentual do peso do purificado final em relação ao peso seco do liofilizado inicial. Daí a impossibilidade de se calcular o rendimento em termos de porcentagem de peso seco do PPPB em relação ao peso seco do "pool" inicial de microorganismos liofilizados (100%).

Uma tentativa de se aumentar o rendimento do material purificado final foi ampliar o tempo de sonicação de tal maneira que foram realizados esfregaços corados pelo Gram em diversas fases do período de sonicação, os quais eram comparados com o esfregaço obtido da suspensão inicial de microorganismos. Pelo que se pode observar os microorganismos maiores (formas filamentosas) foram rompidos nas fases iniciais enquanto microorganismos de menor tamanho permaneciam presentes e viáveis (quando observados à microscopia de contraste de fase em campo escuro) em quantidade relativamente elevada o que nos obrigou a uma sonicação exaustiva, levada até 12 horas. Após esse tempo observou-se que a maior parte dos microorganismos anteriormente presentes no esfregaço inicial (figura 1), se achava rompido, no entanto, permaneciam alguns remanescentes viáveis (figura 2).

No trabalho de purificação desenvolvido por WALLINDER & NEUJAHR<sup>23</sup> a porção peptídica da molécula foi hidrolisada com a finalidade de se identi-

ficar sua composição de aminoácidos. Em nosso caso uma informação deste tipo não traria nenhum benefício uma vez que partimos de um "pool" de microorganismos diferentes (e não de uma cultura pura) e, portanto, cada microorganismo provavelmente apresente uma composição da porção proteica característica da espécie. Já se acha bem estabelecido que a parede bacteriana de diferentes microorganismos apresenta microheterogeneidades estruturais, como já foi sugerido também para suas moléculas de lipopolissacarídeos por KOGA et al<sup>6</sup>; LISTGARTEN<sup>9</sup>.

Observando-se a relação proteica: carboidrato no purificado final (tabela 1), vê-se uma proporção aproximada de 1:2, enquanto WALLINDER; NEUJAHR<sup>23</sup> obtiveram uma proporção de cerca de 1:3 na parede bacteriana obtida pelo tratamento enzimático com tripsina e 1:1,5 na ausência de tripsina. Naturalmente este fato decorre das características diferentes do material inicial, bem como das modificações introduzidas durante o procedimento de purificação.

A parede celular bacteriana da placa dental por nós purificada (PPPB), conforme anteriormente discutido, devido à metodologia empregada, possivelmente deverá se tratar de uma molécula composta de uma porção peptídica ligada à polissacarídica (cujo conjunto se conhece pelo nome de peptidoglicanos ou PPG) e uma porção lipídica (ácido lipoteicóico).

## CONCLUSÕES

A partir da análise e da discussão dos resultados obtidos, com base na metodologia empregada neste trabalho, pudemos constatar e concluir que, pela modificação da metodologia de purificação inicialmente proposta, o Purificado de Parede Celular de Placa Bacteriana (PPPB) por nós obtido deve ser bioquimicamente formado por uma porção peptídica ligada à uma glicosaminoglicano (peptidoglicano) e ao ácido lipoteicóico.

## ABSTRACT

The purpose of this work was to establish, a purification method of dental plaque cellular wall microorganisms. So that, the purified material will be available as inflammatory agent useful to establish one model of inflammatory reaction using this agent.

**Uniterms** - Dental plaque; Bacteria cellular wall.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BIER, O. Morfologia bacteriana. In: ————. **Bacteriologia e imunologia**. São Paulo. Melhoramentos, 1975, p. 15-33.
2. CRITCHLEY, P. et al. The polymerization of dietary sugars by dental plaque. **Caries Res.**, v. 1, n. 1, p. 112-29, 1967.
3. DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, n. 1, p. 350-6, 1956.
4. HUNTER, N. The interaction of bacterial peptidoglycan with macrophages in chronic inflammation. **J.dent. Res.**, v. 63, n. 5, p. 427-30, Mar. 1984.
5. KNOX, K.W.; WICKEN, A.J. Immunological properties of teichoic acids. **Bact. Rev.**, v. 37, n. 2, p. 215-57, June 1973.
6. KOGA, T. et al. Local shwartzman activity of lipopolysaccharides from several selected strains of suspected periodontopathic bacteria. **J. Periodont. Res.**, v. 22, n. 2, p. 103-7, June 1987.
7. KREMBEL, J. et al. Fractionation of human dental plaque. **Arch. oral Biol.**, v. 14, n. 1, p. 563-5, Jan./June, 1969.
8. LINDHE, J. **Tratado de periodontia clínica**. Rio de Janeiro, Interamericana, 1985. cap. 3, p. 56-140
9. LISTGARTEN, M.A. Nature of periodontal disease: Pathogenic mechanisms. **J. Periodont. Res.**, v. 22, n. 3, p. 172-78, Sept. 1987.
10. LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the folin-phenol reagents. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-75, 1951.
11. MECKEL, A.H. The formation and properties of organic film on teeth. **Arch. oral biol.**, v. 10, n. 4, p. 585-97, July/Aug. 1965.
12. MERGENHAGEN, E.S. Complement as a mediator of inflammation: formation of biologically active products after interaction of serum complement with endotoxin and antigen-antibody complexes. **J. Periodont.**, v. 41, n. 1, p. 202-4, 1970.
13. RANNEY, R.R.; MONTGOMERY, E.H. Vascular leakage resulting from topical application of endotoxin in the gingiva of the beagle dog. **Arch. oral Biol.**, v. 18, n. 8, p. 963-70, Aug. 1973.
14. RIZZO, A.A.; MERGENHAGEN, E.S. Histopathologic effect of endotoxin injected into rabbit oral mucosa. **Arch. oral Biol.**, v. 9, n. 6, p. 659-66, Nov./Dec. 1964.
15. ROBERTSON, P. B. et al. Activation of latent collagenase by microbial plaque. **J. Periodont. Res.**, v. 9, n. 2, p. 81-3, Nov. 1974.
16. SHAPIRO, L. et al. Endotoxin determination in gingival inflammation. **J. Periodont.**, v. 43, n. 10, p. 591-6, Oct. 1972.
17. SIMON, B. I. et al. The role of endotoxin in periodontal disease. III. Correlation of the amount of endotoxin in human gingival exudate with histologic degree of inflammation. **J. Periodont.** v. 42, n. 4, p. 210-6, Apr. 1971.
18. SIMON, B.I. et al. The role of endotoxin in periodontal disease. IV. Bacteriologic analyses of human gingival exudate as related to the quantity of endotoxin and clinical degree of inflammation. **J. Periodont.**, v. 43, n. 8, p. 468-75, Aug. 1972.
19. SLOTS, J. Subgingival microflora and periodontal disease. **J. clin. Periodont.**, v. 6, n. 5, p. 351-82, Apr. 1979.
20. SLOTS, J.; GENCO, R.J. Microbial pathogenicity. Black-pigmented Bacteroides species, Capnocytochae species, and in human periodontal diseases virulence factors in colonization, survival and tissue destruction. **J. dent. Res.**, v. 63, n. 1, p. 412-21, Jan./June. 1984.
21. SNYDERMAN, R. Role for endotoxin and complement in periodont tissue destruction. **J. dent. Res.**, v. 51, n. 2, p. 356-61, 1972.
22. TAICHMAN, N.S. Ultrastructural alterations in the local Shwartzman reaction. **Lab. Invest.**, v. 14, n. 8, p. 2160-76, Aug. 1965.
23. WALLINDER, I.B.; NEUJAHN, H.Y. Cell wall and peptidoglycan from *Lactobacillus fermenti*. **J.Bact.**, v. 105, n. 3, p. 918-26, Mar. 1991.
24. WILTON, J.; ALMEIDA, O.P. The comparative inflammatory effect of dental plaque, lipopolysaccharide, lipoteichoic acid, dextran and levan on leukocytes in the mouse periodontal cavity. In: LEHNER, T.; CIMANOSI, G. **The borderland between caries and periodontal**. London, Academic Press, 1980. Cap. 6, p. 83-97.