



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**Obtenção e caracterização bioquímica de uma H⁺-ATPase (Tipo P)
presente na membrana obtida de *Streptococcus mutans***

Prislaine Pupolin Magalhães

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: **Química**.

RIBEIRÃO PRETO -SP

2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**Obtenção e caracterização bioquímica de uma H⁺-ATPase (Tipo P)
presente na membrana obtida de *Streptococcus mutans***

Prislaine Pupolin Magalhães

Orientador: Prof. Dr. Pietro Ciancaglini

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: **Química**.

RIBEIRÃO PRETO –SP

2005

Magalhães, Prislaine Pupolin.

Obtenção e caracterização bioquímica de uma H⁺-ATPase (Tipo P) presente na membrana obtida de *Streptococcus mutans*
Ribeirão Preto, 2005.

p. 93: il; 30 cm

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

da Universidade de São Paulo, Área de concentração: Química.

Orientador: Ciancaglini, Pietro.

1. H⁺-ATPase. 2. *Streptococcus mutans*. 3. Acidurância. 4. Fosfoenzima.

Dedico à minha mãe Vera Lúcia

...retorno ao antigo lar, o doce ninho da infância distante, e o encontro vazio.

Percorro os cômodos, que me pareciam grandes, e alcanço o quintal dos jogos primaveris. Tudo está deserto, silencioso e triste.

Sento-me à soleira da porta e recordo-me...

Subitamente, ouço-lhe a voz canora chamando por mim.

Seu exemplo de ação constante, porém, contagia-me, levando-me a correr, a cantar e a servir com alegria.

Quantas saudades, mamãe!

Gostaria de dizer-te que foste e és o exemplo fecundo, que me fortalece, e toda vez que vejo as estrelas brilhando nos céus, eu me pergunto qual delas és tu.

Agradecimentos Especiais

A Deus, por guiar meus passos e estar comigo em todos os momentos.

Ao meu filho Henrique, luz da minha vida, que muitas vezes acalmou meu coração com seus carinhos, seus sorrisos e sua presença tão querida.

Ao Ricardo, meu amor, amigo e companheiro, pela dedicação, companheirismo e pelo grande homem que é. Esta tese é tão minha quanto sua...

A todos meus familiares...

*Com carinho especial ao meu pai José Carlos, por seu amor,
dedicação e carinho.*

*Aos meus irmãos Priscila e Demétrio, e meus sobrinhos,
Patrícia, Douglas e a pequena Lara... vocês são muito especiais
para mim.*

*Ao meu sogro Prof. Dr. Aparecido e minha sogra Prof^a.
Maísa pelo exemplo acadêmico de persistência, dedicação e
coragem.*

Ao Prof. Dr. Pietro Ciancaglini

Ainda lembro minha primeira vez no laboratório...

Tudo era tão distante... eu tão pequena....

Quanta dedicação!

Quanto exemplo!

Quanto apoio!

Logo...

Quantas oportunidades!

Hoje, me sinto grande...

E para ser sincera, isso é muito bom!

*Obrigada por todos os ensinamentos transmitidos durante
quase dez anos de convivência, pela confiança e pela
amizade.*

Meu carinho e respeito.

AGRADECIMENTOS

- À Capes pela bolsa concedida.
 - Aos amigos do laboratório: Ana Maria, Carol, Diguinho, Dudu, Hérica, Ivana, Katia, Liliani, Mariana, Maytê, Nilton, Roberto e Tony, pelo companheirismo, auxílios nas horas de sufoco e alegrias constantes. Sinceramente obrigada por tudo, vocês são ESPECIAIS.
 - Ao Prof. Dr. Geraldo Thedei Jr. (Gera) pela amizade e apoio científico durante o desenvolvimento do projeto.
 - A todos meus amigos (ficaria difícil citar todos!!!) pela amizade e carinho. Valeu gente!!!
 - Ao Prof. Dr. Roy Eduard Larson da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, pela contribuição no uso de marcadores radioativos.
 - A Priscila, ao meu marido Ricardo e a Prof^a. Cíntia pela correção dos textos em inglês.
 - Aos docentes, técnicos, funcionários e demais pessoas do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP.
 - Ao CNPq, Capes e FAPESP pelos auxílios concedidos ao laboratório.
 - Enfim, agradeço a todos que torceram por mim e que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.
-

“Nenhum ato de bondade, por menor que seja, jamais será um desperdício”.
Ghandi

ÍNDICE

Abreviaturas	XI
Abstract	XII
Resumo	XV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Cárie e <i>Streptococcus mutans</i>	1
1.1.1 Acidogênia	4
1.1.2 Acidurância	4
1.2 ATPases	5
1.2.1 ATPases do tipo F	6
1.2.2 ATPases do tipo P	8
1.3 Solubilização de proteínas de membrana	15
2. OBJETIVOS	17
2.1 Objetivos gerais	17
2.2 Objetivos específicos	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Obtenção da linhagem <i>Streptococcus mutans</i>	18
3.2 Cultivo da bactéria	18
3.3 Obtenção das frações de membrana de <i>Streptococcus mutans</i>	18
3.4 Dosagem de Atividade da Lisozima	19
3.5 Dosagem de proteína	20
3.6 Determinação da atividade PNFFase	20
3.7 Determinação da atividade ATPase	20
3.8 Centrifugação em gradiente de densidade de sacarose	21
3.9 Dosagem de proteína da fração de membrana em gradiente de sacarose	21
3.10 Estabilidade da fração de membrana obtida de <i>S. mutans</i>	21
3.11 Solubilização da fração de membrana obtida de <i>S. mutans</i> com diferentes detergentes	22

3.12 Efeito da concentração de colato de sódio na solubilização da fração de membrana obtida de <i>S. mutans</i>	22
3.13 Efeito da concentração de proteína na solubilização da fração de membrana obtida de <i>S. mutans</i>	22
3.14 Efeito da temperatura de incubação na solubilização da fração de membrana obtida de <i>S. mutans</i>	23
3.15 Efeito do tempo de incubação na solubilização da fração de membrana obtida de <i>S. mutans</i>	23
3.16 Estabilidade do extrato bruto solubilizado com colato de sódio	23
3.17 Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)	23
3.18 Atividade fosfomonohidrolase em gel de eletroforese (SDS-PAGE) ..	23
3.19 Obtenção do intermediário fosforilado	24
3.20 Ação de inibidores sobre a atividade da fração de membrana e do extrato bruto solubilizado	24
3.21 Efeito do pH na atividade ATPase	24
3.22 Efeito da concentração do substrato na atividade ATPase do tipo P .	25
3.23 Efeito de EDTA e de íons metálicos na atividade ATPase do tipo P ..	25
3.24 Tratamento dos dados cinéticos	25
3.25 Microscopia óptica de fluorescência	25
4. RESULTADOS	27
5. DISCUSSÃO	65
6. BIBLIOGRAFIA	83
7. ADENDO	93

Abreviaturas

AMPOL-	2-amino-2-metil-1-propanol
ADP -	Adenosina-5'-difosfato
ATP -	Adenosina-5'-trifosfato
ATPase -	Adenosina-5'-trifosfatase
BSA-	Albumina de soro bovino
BIS-TRIS-	Bis-[2-hidroxietil]amino-tris[hidroximetil]metano
C ₁₂ E ₈ -	Polioxietileno-8-lauril éter
C ₁₂ E ₉ -	Polioxietileno-9-lauril éter
CHAPS	3-[(3-colamidopropil) dimetilamônio]-1-propanosulfonato
CHAPSO	3-[(3-colamidopropil) dimetilamônio]-2-hidroxi-1-propanosulfonato
Da -	Dalton
DCCD	N,N-diciclohexil carbadiimida
EDTA -	Ácido etilenodiamino tetracético
Hepes -	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina N-2-etano sulfônico
K _{0,5} -	Constante de dissociação aparente do complexo enzima-metal
kDa -	kilo Dalton
K _i	Constante de dissociação aparente do complexo enzima-inibidor
K _M -	Constante de Michaelis-Menten
MES-	ácido 2-N-morfolino etanosulfônico
MOPS	Ácido morfolino propano sulfônico
n -	Coeficiente de Hill
NEM-	N-etilmaleimida
PNFF-	p-nitrofenilfosfato
SDS-	Dodecil sulfato de sódio
TCA -	Ácido tricloroacético
Tris -	Tris-(Hidroximetil)-aminometano
Triton X-100-	t-octilfenoxipolietoxietanol
Triton X-114-	octilfenoxipoli-etoxietanol
TSA-	Ágar Trípico de Soja
Tween-20-	polioxietileno-sorbital monolaurato
U -	Unidade de atividade enzimática (nmol/min)
v -	Velocidade inicial
V _M -	Velocidade máxima

ABSTRACT

Dental caries can be defined as an infective disease, which occurs from the interaction between a series of factors, resulting in loss of mineralized structures of the dental element. *Streptococcus mutans* is the microorganism most frequently related to this disease, and this bacteria is considered to be acidogenic and aciduric, characteristics which are fundamental for its survival in the carie microenvironment.

S. mutans produces acids, such as lactic and acetic, with pKa values of 6.86 and 4.75, respectively. These acids reduce the microenvironment pH of the bacteria plate down to values lower than 5.0, thus demineralizing the dental enamel and initiating the cariogenic process. It is known that the ability of this microorganism to survive in acidic media depends on ATPases located in the plasma membrane, which are the main proteins responsible for cytoplasmatic proton extrusion.

F₁F₀-ATPase (F-type ATPase) is reported as the main enzyme responsible for proton translocating activity in the *S. mutans* membrane, which maintains a pH difference between the intra and extracellular media of up to three pH units.

On the other hand, fungi and plants transport the protons derived from their metabolism through a P-type H⁺-ATPase. This enzyme is constituted by one polypeptide chain around 100 kDa, presenting ten transmembrane domains and processing a reactional mechanism for active transport, in which ATP is hydrolyzed to ADP and inorganic phosphate (Pi) via intermediate covalent β -aspartil phosphate.

Recent assays associated with complete genome sequencing of *S. mutans* strongly suggest the existence of another ATPase that translocates H⁺ in the *S. mutans* membrane (a putative P-type ATPase, which presented high homology to the *N. crassa* H⁺-ATPase; Blast Results: score= 222 bits (566) Expect 3e-56).

To prove the existence of this enzyme, *S. mutans* cells obtained from the "André Tosello" Foundation, classified by ATCC under the number 25175, were cultivated in complete medium and the methodology was standardized for the obtention of the membrane fractions. Values of ATPase activity in the order of 120 U/mg were obtained in membranes extracted from cells with 12 hours of cultivation. The membrane fraction, when submitted to sucrose gradient, showed a single protein peak with ATPase activity and relative homogeneity.

Solubilization tests were performed using several detergent classes. The best results were obtained by employing 50 mM of sodium cholate in 1.5 mg/mL of protein, and incubated for 15 minutes at 4°C.

The SDS-PAGE profile of the membrane fraction and the solubilized extract showed that the detergent chosen efficiently solubilized the 100 kDa band. After renaturation, the SDS-PAGE showed three bands with phosphomonoesterase activity. Among them, the 100 kDa band was not visualized in the presence of orthovanadate and lansoprazole. Finally, one single band of approximately 200 kDa for the phosphoenzyme was detected and it also did not appear in the presence of this P-type ATPase inhibitors. The molecular weight found for the phosphoenzyme, when compared to the band found for the phosphomonoesterase activity, suggests “dimerization”, which is a common characteristic for P-type ATPases.

Studies employing specific ATPase inhibitors of different classes were performed for the characterization of the membrane fraction and the solubilized extract. The inhibition values obtained showed that this membrane fraction has P- and F-type ATPases in a 60 to 40% proportion, respectively. The P-type ATPase was inhibited by orthovanadate (60% of total ATPase activity) and the F-type ATPase was inhibited in the complementary proportion by oligomycin and DCCD.

Measuring the levels of P- and F-type ATPase activity present in *S. mutans* membrane fraction during the growth in complete media or in complete media in the presence of oligomycin 5 µg/mL, we observed that the F-type ATPase activity was constant whereas the P-type ATPase activity was enhanced during the growth of *S. mutans*.

The kinetic characterization of the P-type ATPase present in *S. mutans* membrane was performed by inhibiting all F-type ATPase activity, using oligomycin 4 µg/mL in the reactional medium of ATPase activity assays.

The dependence of ATP concentration in the P-type ATPase revealed high ($K_{0.5} = 0.27$ mM) and low ($K_{0.5} = 3.31$ mM) affinity sites for ATP, exhibiting positive cooperativity and a specific activity of about 74 U mg⁻¹.

Equimolar concentrations of ATP and magnesium ions showed a behavior similar to that described for ATP concentration in saturating conditions of Mg²⁺ (high affinity site, $K_{0.5} = 0.10$ mM, and low affinity site, $K_{0.5} = 2.12$ mM), exhibiting

positive cooperativity and a specific activity of about 68 U mg^{-1} . In fact, the *S. mutans* P-type ATPase formed 200 kDa dimers during its catalytic cycle as observed for SDS-PAGE of the phosphoenzyme.

Sodium, potassium, ammonium, calcium and magnesium ions stimulated the enzyme, showing a single saturation curve, and all exhibiting positive cooperativities, whereas inhibition of ATPase activity was observed for zinc ions and EDTA.

The kinetic characteristics revealed that this proton extrusion enzyme is characterized as Type-III A ATPases, as the H^+ -ATPases found in yeast and plants.

The partial structural and kinetic characterization, revealed the existence of a H^+ or H^+ -ion antiport ATPase of the P-type that acts in association with F_1F_0 -ATPase. We may then conclude that the mechanism of proton extrusion through the plasma membrane of *S. mutans* is due to at least two enzymes, thus explaining the marked acidurance of this microorganism during its growth in acid media.

RESUMO

A cárie dental pode ser definida como uma doença de natureza infecto-contagiosa que decorre da interação de uma série de fatores, resultando na perda de estruturas mineralizadas do elemento dentário. *Streptococcus mutans* é o microorganismo mais freqüentemente relatado com esta doença. Esta bactéria é considerada acidogênica e acidúrica, características que são imprescindíveis para que sobreviva no ambiente da cárie.

S. mutans produz ácidos como láctico e acético que apresentam valores de pKa de 6,86 e 4,75, respectivamente. Esses ácidos reduzem o pH do microambiente da placa bacteriana, atingindo valores abaixo de 5,0, desmineralizando o esmalte do dente, iniciando assim o processo cariogênico. Sabe-se que a capacidade deste microorganismo de sobreviver em meios ácidos depende de ATPases localizadas na membrana plasmática, que são as principais responsáveis pela extrusão citoplasmática dos prótons provenientes de seu metabolismo anaeróbico.

A F₁F₀-ATPase (ATPase do tipo F) é descrita como a principal enzima responsável pela atividade translocadora de prótons na membrana de *S. mutans*, a qual mantém uma diferença de pH entre o meio extracelular e o intracelular, de até 3 unidades de pH.

Por outro lado, fungos e plantas transportam os prótons provenientes de seu metabolismo através de uma H⁺-ATPase do tipo P. Esta enzima é constituída por uma cadeia polipeptídica ao redor de 100 kDa, a qual apresenta dez domínios transmembrana possuindo um mecanismo reacional característico para transporte ativo, no qual o ATP é hidrolisado a ADP e fosfato inorgânico (Pi), via intermediário covalente β-aspartil fosfato.

Estudos recentes associados com o seqüenciamento completo do genoma de *S. mutans* sugerem fortemente a existência de outra ATPase translocadora de H⁺ na membrana de *S. mutans* (uma possível ATPase do tipo P, que apresentou alta homologia com H⁺-ATPase de *N. crassa*; Blast Results: score= 222 bits (566) Expect 3e-56).

Para comprovar a existência desta enzima, células de *S. mutans* obtidas da Fundação “André Tosello” classificadas pela ATCC sob o número 25175 foram cultivadas em meio completo e padronizou-se a metodologia para a obtenção das frações de membrana. Valores de atividade ATPase da ordem de

120 U/mg foram obtidos em membranas extraídas de células com 12 horas de cultivo. A fração de membrana quando submetida em gradiente de sacarose mostrou apenas um pico protéico com atividade ATPase e relativa homogeneidade.

Os testes de solubilização foram feitos utilizando-se várias classes de detergentes. Melhores resultados foram obtidos empregando-se 50 mM de colato de sódio em 1,5 mg/mL proteína, por 15 minutos de incubação à 4 °C.

O perfil eletroforético protéico da fração de membrana e do extrato bruto solubilizado, mostrou que o detergente escolhido solubiliza eficientemente a banda de 100 kDa. Após renaturação, o gel de eletroforese apresentou três bandas para atividade fosfomonohidrolase, dentre elas a banda de 100 kDa, não sendo mais visualizada na presença de ortovanadato ou lanzoprazol. Finalmente, uma única banda de aproximadamente 200 kDa para a fosfoenzima foi detectada e esta também não aparece na presença destes inibidores de ATPases do tipo P. A massa molecular encontrada para fosfoenzima quando comparada com a banda obtida para atividade fosfomonohidrolase sugere uma dimerização, característica comum para outras ATPases do tipo P.

Estudos empregando-se inibidores específicos de várias classes de ATPases foram realizados para caracterizar a fração de membrana e o extrato bruto solubilizado. Os valores de inibição obtidos confirmam que esta fração de membrana contém ATPases do tipo P e F em uma proporção de 60% e 40% respectivamente. A ATPase do tipo P foi inibida por ortovanadato (60% da atividade ATPase total) e a ATPase do tipo F foi inibida em proporção complementar por oligomicina e DCCD.

Estudando-se os níveis de atividade ATPase do tipo F e P presente na fração de membrana de *S. mutans* durante crescimento em meio completo ou meio completo na presença de 5 µg/mL de oligomicina, podemos observar que a atividade ATPase do tipo F permanece constante, enquanto que a atividade ATPase do tipo P aumenta.

A caracterização cinética da atividade ATPase do tipo P presente na membrana de *S. mutans* foi realizada inibindo-se toda a atividade do tipo F, onde os ensaios de atividade foram realizados na presença de 4 µg/mL de oligomicina.

A dependência da concentração de ATP na atividade ATPase do tipo P revelou um sítio alta ($K_{0,5} = 0,27$ mM) e um de baixa afinidade ($K_{0,5} = 3,31$ mM) exibindo efeitos cooperativos e atividade específica de 74 U mg^{-1} . Concentrações equimolares de ATP e íons magnésio mostraram um comportamento similar ao encontrado para ATP em concentrações saturantes de magnésio (sítio de alta afinidade, $K_{0,5} = 0,10$ mM, e sítio de baixa afinidade, $K_{0,5} = 2,12$ mM), também exibindo efeitos cooperativos e atividade específica de 68 U mg^{-1} . De fato, a ATPase do tipo P de *S. mutans* formou dímeros de 200 kDa durante o seu ciclo catalítico conforme observado para fosfoenzima em gel de eletroforese.

Íons sódio, potássio, amônio, cálcio e magnésio estimularam a atividade ATPase da enzima, mostrando uma única curva de saturação, todas exibindo efeitos cooperativos. Por outro lado, íons zinco e EDTA inibiram a atividade ATPase. As características cinéticas revelam que esta enzima extrusora de prótons pode ser classificada como uma ATPase do subtipo IIIA, como as H^+ -ATPases encontradas em fungos e plantas.

As caracterizações parciais, tanto estrutural quanto cinética, mostraram a existência de uma H^+ ou H^+ , íon *antiport* ATPase do tipo P que atua em associação com F_1F_o -ATPase. Podemos concluir então que o mecanismo de extrusão de prótons através da membrana plasmática de *S. mutans* é constituído por pelo menos duas enzimas, explicando assim a marcante acidurância desse microorganismo durante seu crescimento em meio ácido.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Cárie e *Streptococcus mutans*

A cárie dental figura entre as mais significantes doenças contagiosas crônicas humanas que afeta, principalmente, países sub-desenvolvidos e populações de baixa renda, além de pacientes imunocomprometidos, entre outras situações (Krasse, 1998). Assim, pode ser definida como uma doença de natureza infecto-contagiosa que decorre da interação de uma série de fatores (primários e secundários), resultando na perda de estruturas mineralizadas do elemento dentário (Marsh, 2003).

Dentre os fatores primários que contribuem para a instalação e desenvolvimento da cárie, podemos citar: Hospedeiro: hipoplasias de esmalte e dentina, alterações de posição do dente no arco dentário e carência de maturação pós-eruptiva, facilitam a instalação da microbiota e seu desenvolvimento; Dieta: uma dieta carente de vitaminas, rica em carboidratos, irregular quanto ao aspecto de número, quantidade e qualidade de ingestões leva a alterações físico-químicas (pH, viscosidade, capacidade de tamponamento) do ambiente bucal; Microbiota bucal (biofilme): é normal a existência de uma microbiota na cavidade bucal, composta por várias espécies de bactérias, fungos e vírus; Tempo: a persistência das alterações da microbiota, no hospedeiro e na dieta, só poderá levar ao desenvolvimento da cárie desde que prevaleça por determinado período de tempo, o qual varia de indivíduo para indivíduo. Tais fatores primários associados, atuando na superfície dentária, levam ao desenvolvimento da cárie (Marsh, 2003).

Além disso, sabe-se que fatores secundários, tais como: saliva, flúor e higiene bucal, também têm grande influência no desenvolvimento da cárie dentária, funcionando como moduladores dos fatores primários (Krasse, 1998). Esses fatores associados levam a destruição das superfícies mineralizadas do dente, facilitando a instalação de microorganismos que poderão levar ao desenvolvimento da cárie, podendo chegar a proporções de comprometimento da vitalidade dental e da estabilidade do elemento dental no complexo maxilo-mandibular (Menaker, 1980).

A certeza da participação de microorganismos no desenvolvimento da cárie vem sendo descrita há mais de dois séculos. Com base em estudos

subseqüentes, sabe-se que existem microorganismos específicos relacionados à cárie, fazendo com que a placa bacteriana de natureza cariogênica seja constituída de uma microbiota anaeróbica, Gram positiva sacarolítica, representada basicamente pelos *Streptococcus mutans* (Ilustração 1), principalmente em se tratando dos estágios iniciais da doença. Como descrito por Loesche (1986), o *S. mutans* é um microorganismo altamente cariogênico e a sua colonização se faz presente nas fases precoces da vida, logo após a erupção dos dentes. É importante ressaltar, que a colonização pelo *S. mutans* tem predileção por dentes cuja anatomia é rica em áreas retentivas (Weyne, 2001).

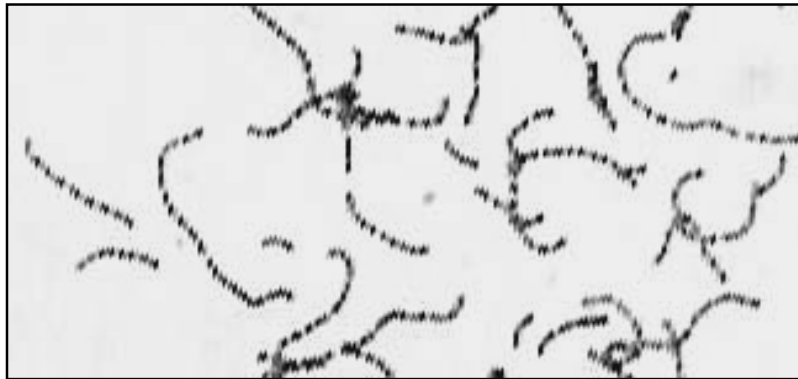


Ilustração 1. Microscopia óptica de *Streptococcus mutans*, coradas pelo método de Gram.

Van Houte et al. (1991) também demonstraram uma correlação entre o potencial acidogênico da placa dental e a presença de *Streptococcus* não-*mutans* capazes de acidogênese em baixo pH. No entanto, é conhecido que o *Streptococcus mutans* compreende uma parte substancial da contagem de células presentes na placa dental sujeita ao desenvolvimento de cárie e sua importância na etiologia da cárie dental é indiscutível (Mikkelsen et al., 1981).

Clarke em 1924 foi quem descobriu a associação de *S. mutans* com a doença, mas a sua importância na etiologia da cárie foi subseqüentemente questionada, e assim na época a *S. mutans* desapareceu da literatura dental. Por volta de 40 anos depois da descoberta original, o papel primário da *S. mutans* na patogenia da cárie, a infecção e a natureza de transmissão dessa doença foram definitivamente estabelecidos (Krasse, 1966; Edwardson, 1968;

Loesche et al., 1975).

O biofilme bucal (ou placa bacteriana) forma-se naturalmente no dente e sua presença é normalmente benéfica, pois contribui para estimular as defesas inatas do hospedeiro e consiste numa barreira contra outros microorganismos patogênicos. Assim, no biofilme sadio encontram-se muitas espécies bacterianas, tais como *Streptococcus sanguis*, *S. oralis*, *S. mitis*, *Actinomyces naeslundii*, etc. (Marsh, 1993). Já, no caso de ocorrência de cárie, outros gêneros bacterianos podem predominar, além de *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus*, uma vez que o desenvolvimento desta patologia foi detectado mesmo na ausência dessas espécies (Boyar et al., 1989; Marsh et al., 1989).

Baseado na homologia do DNA, os *Streptococcus* são divididos em sete espécies: *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. rattii*, *S. criceti*, *S. downey*, *S. ferus* e *S. macacae*. Dessas espécies, *S. mutans* e *S. sobrinus* são considerados os agentes primários do processo cariogênico em humanos, mas em particular *S. mutans* é a espécie mais freqüentemente isolada da cavidade oral humana (Koga et al., 2002).

A odontologia moderna busca além de tratar o paciente portador da cárie, fornecer informações que permitam ao indivíduo evitar o desenvolvimento da mesma, com medidas preventivas. Atualmente, além desse trabalho informativo ou de conscientização, tem sido dado ênfase ao estudo de métodos de controle do desenvolvimento e proliferação da microbiota causadora da cárie.

Recentemente, existe um grande empenho nas pesquisas para se desenvolver uma vacina efetiva e segura contra cárie. Essa pesquisa tem sido facilitada com o progresso da biologia molecular, da clonagem, caracterização funcional dos fatores virulentos da *S. mutans* e avanços em estudos imunológicos da mucosa, tais como o desenvolvimento de sofisticados sistemas carregadores de antígenos que estimulam a indução de respostas da imunoglobulina A salivar (Hajishengaleis e Michalec, 1999).

Duas características são consideradas imprescindíveis entre os microorganismos que sobrevivem no ambiente de cárie: a **acidogênia** e a **acidurância** (Köhler et al., 1995).

1.1.1 Acidogênia

Acidogênia é definida como a capacidade de geração de ácidos a partir, principalmente, de fontes de carbono tais como a sacarose, frutose, glicose, etc. Entre os ácidos formados, destacam-se o ácido láctico e o acético, que compreendem mais de 95% do total de ânions ácidos produzidos por *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus*, assim como por outras espécies de ocorrência na cárie (Chestnutt et al., 1994). Como já descrito acima, *S. mutans*, produz ácidos como láctico e acético que apresentam valores de pKa de 6,86 e 4,75, respectivamente. Esses ácidos reduzem o pH da placa bacteriana, obtendo valores abaixo de 5,5, desmineralizando o esmalte do dente, iniciando assim o processo cariogênico (Marsh, 2003).

Várias espécies de *Streptococcus* (*gordonii*, *sanguis*, *vestibularis*), além do *Enterococcus faecalis* apresentaram potencial acidificante *in vitro* na presença de solução de sacarose e hidroxapatita pulverizada. No entanto, a acidogênia nesses microorganismos foi consideravelmente menor que o potencial acidificante mostrado pelos gêneros *mutans* e *sobrinus* de *Streptococcus*. Essas duas linhagens foram capazes de acidificar o ambiente, *in vitro* (partindo de pH 6,5 chegando em pH 4,2), em apenas 30 minutos de incubação. Conforme esperado, associado com essa maior liberação de ácidos, o potencial desmineralizante dessas duas espécies (medindo-se a liberação de cálcio da hidroxapatita presente na mistura de incubação) foi sensivelmente maior. Esses estudos foram realizados em suspensões de células em meios com apenas sacarose e hidroxapatita, sem levar em conta se outros fatores poderiam influenciar no processo de crescimento e acidificação, entre eles a fonte de carbono empregada, a presença de elementos tamponantes e o pH inicial do cultivo (Marsh, 2003).

1.1.2 Acidurância

Acidurância refere-se à capacidade de determinados microorganismos de resistir a ambientes relativamente ácidos. Portanto, apesar de não existir dúvidas que a acidogênia provém do metabolismo dos açúcares, o mecanismo pelo qual os microorganismos do biofilme bucal resistem a ambientes muito ácidos (acidurância) ainda não está totalmente caracterizado.

Como foi demonstrado recentemente, dependendo do tempo em que uma

cultura de *S. mutans* permanece em pH 4,2-4,0, a divisão celular será bloqueada e a produção de ácidos (pela via glicolítica) será reduzida em pelo menos 60%. Especial destaque deve ser dado à enzima enolase da via glicolítica, que em baixos valores de pH se encontra inibida, em aproximadamente 60%, o que vai limitar a velocidade dessa via metabólica num percentual semelhante, mesmo que as demais enzimas não estejam inibidas, como é o caso da hexoquinase e da fosfofrutoquinase, que são as duas principais enzimas reguladoras da via catabólica (Takahashi et al., 1997). Estes autores também demonstraram que, após o restabelecimento de condições neutras de pH, as enzimas da via glicolítica retomam sua atividade, restabelecendo a produção de ácidos e o crescimento celular, uma vez que apenas 20-30% das células perderam sua viabilidade pela permanência em pH ácido (Takahashi et al., 1997). Assim, o *S. mutans* tem uma grande capacidade de acidurância, mas os mecanismos nela envolvidos ainda não estão totalmente elucidados.

Um outro mecanismo envolvido na acidurância, que está sendo caracterizado em *S. mutans*, envolve a produção de uma série de proteínas conhecidas comumente como proteínas de *stress*, dentre as quais se destacam as *HSP* (*Heat Shock Proteins*). Além das proteínas *HSP*, foi recentemente demonstrado que *S. mutans* induz a síntese de 36 novas proteínas em resposta a mudança no pH de cultivo. Alguns autores supõem que essas proteínas devam fazer parte de ATPases de membrana, atuando como moduladoras da atividade ATPase extrusora de prótons (Jayaraman et al., 1997).

1.2 ATPases

S. mutans possui estratégias moleculares específicas que as tornam capazes de se adaptar rapidamente a mudanças bruscas de pH. Em adição, as bactérias são capazes de modular o seu pH local, especialmente em biofilmes, por regulação de genes envolvidos com a produção de ácido ou base. As enzimas translocadoras de prótons deste microorganismo, podem ser ativadas em baixos valores de pH para que a bactéria possa continuar a crescer (Marsh, 2003). Sabe-se também que essa capacidade de sobreviver em meios ácidos depende de ATPases localizadas na membrana plasmática, que são as

principais responsáveis pela extrusão citoplasmática dos prótons (Köhler et al., 1995; Takahashi et al., 1997; Quivey et al., 2000).

1.2.1 ATPases do tipo F

Microorganismos aeróbicos, sintetizam ATP através de uma ATPase translocadora de prótons (F_1F_o -ATPase). Em contraste, bactérias anaeróbicas como estreptococos orais, que não possuem cadeia respiratória, produzem ATP por glicólise na ausência de oxigênio. Nesses casos, ocorre a hidrólise de ATP pela F_1F_o -ATPase, localizada na membrana plasmática, resultando na extrusão eletrogênica de prótons. A função da ATPase translocadora de prótons presente na membrana de *S. mutans* (ATPase do tipo F) é regular os valores de pH, com o propósito de manter a diferença de pH entre o meio intra e o meio extracelular (Suzuki et al., 2000).

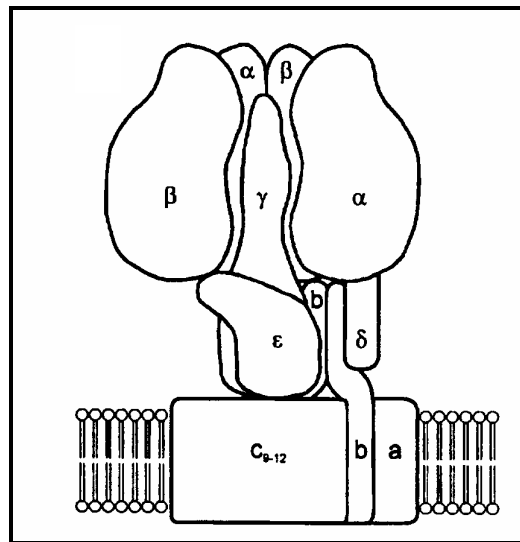


Ilustração 2. Diagrama do complexo estrutural da F_1F_o -ATPase de *Escherichia coli*. Uma subunidade α e uma subunidade β foram omitidas para melhor visualização da subunidade γ (Weber e Sênior, 1997).

A F_1F_o -ATPase é descrita como a principal responsável pela atividade translocadora de prótons em *S. mutans*. A ATPase do tipo F de *S. faecalis* já foi purificada (Schnebli e Abrams, 1970) e recentemente o operon que codifica as subunidades dessa enzima em *S. mutans* também foi clonado e seqüenciado (Smith et al., 1996). É consenso, no entanto, que esta ATPase de membrana

seria uma das responsáveis pela manutenção de uma diferença de pH entre o meio extracelular e o intracelular, de até 3 unidades e uma vez que o pH intracelular ideal para a glicólise em *S. mutans* foi determinado como sendo 7,0 e o ambiente de cárie pode apresentar pH menor que 4. Apesar da extensa literatura, o papel da F_1F_0 -ATPase na membrana plasmática de *S. mutans* ainda não está claro, podendo ter outras funções bioquímicas na bactéria (Suzuki et al., 2000).

A subunidade F_1 - desta ATPase apresenta massa molecular ao redor de 385 kDa a qual é constituída por 5 subunidades distintas, α , β , λ , δ , e ϵ com massas moleculares de 60, 55, 37, 20 e 12 kDa, mantendo a relação de 3:3:1:1:1, respectivamente. Este protômero pode hidrolisar tanto ATP, GTP quanto ITP. Já a subunidade F_0 desta ATPase é constituída por um domínio altamente hidrofóbico, constituído por três diferentes proteínas denominadas de a, b e c, apresentando massas moleculares de 30, 17 e 8 kDa, respectivamente (Ilustração 2). Este domínio é o responsável pela formação do canal de translocação do H^+ na membrana da bactéria e a subunidade c se liga a N,N-diciclohexil carbadiimida (DCCD), um potente inibidor da atividade ATPase translocadora de H^+ (Heefner, 1982, Weber e Sênior, 1997).

Kühnert e Quivey (2003) descreveram a caracterização genética e expressão do operon da ATPase do tipo F e os resultados mostraram que a síntese da ATPase do tipo F de *S. mutans* e *S. sanguis* é induzida pelos baixos valores de pH.

A inibição da F_1F_0 -ATPase por oligomicina tem sido bem descrita para ATP sintases de mitocôndrias e rodobactérias. Seu modo de inibição não é totalmente esclarecido, mas é conhecido que ocorre uma interação hidrofóbica entre a oligomicina e o complexo F_0 , bloqueando o canal e o movimento dos prótons através da membrana plasmática (Hensel et al., 1996; Suzuki et al., 2000).

Suzuki et al. (2000), mostraram uma cepa mutante deste microrganismo com 50% da atividade F_1F_0 -ATPase, que foi capaz de crescer e acidificar o pH de cultivo de 7 para 4 e ao mesmo tempo manter o pH intracelular neutro. Estes microrganismos apresentaram apenas um atraso no crescimento quando comparado com a cepa selvagem. Esses resultados sugerem a presença de mecanismos alternativos para eliminação dos prótons

intracelulares produzidos pelo metabolismo anaeróbico deste microorganismo.

1.2.2 ATPases do tipo P

As ATPases do tipo P fazem parte de uma grande família de proteínas de membrana que hidrolisam ATP para o transporte ativo de cátions através das membranas celulares. A H^+ -ATPase de membrana plasmática de fungos e plantas é estruturalmente e funcionalmente do tipo P, tal como a Na^+,K^+ -ATPase, H^+,K^+ -ATPase e Ca^{2+} -ATPase de células de animais, possuindo um mecanismo reacional característico no qual o ATP é hidrolisado a ADP e fosfato inorgânico (Pi), via intermediário covalente β -aspartil fosfato (Morsomme e Boutry, 2000; Ambesi et al., 2000). A H^+ -ATPase de membrana plasmática hidrolisa ATP para transportar prótons, o que aparentemente é a sua função fisiológica mais importante. O aumento na diferença de pH e conseqüentemente no potencial através da membrana plasmática são requeridos pelos transportes secundários que são diretamente dependentes da força próton-motora (Lutsenko e Kaplan, 1995; Moller et al., 1996; Morsomme e Boutry, 2000).

ATPases do tipo P podem ser constituídas por uma única cadeia polipeptídica, como as H^+ -ATPase, H^+,K^+ -ATPase e Ca^{2+} -ATPase ou estruturas complexas constituídas de heterosubunidade, como a Na^+,K^+ -ATPases, tendo como característica comum uma subunidade responsável pela atividade catalítica (Morsomme e Boutry, 2000; Ambesi et al., 2000; Kaplan, 2002).

A Na^+,K^+ -ATPases são constituídas de duas subunidades, α e β : a subunidade α é constituída por dez domínios transmembrana e é a subunidade responsável pela atividade enzimática do complexo (Lingrel et al., 1997; 1998; Kaplan, 2002); já a subunidade β é constituída por um único domínio transmembrana onde a extremidade N-terminal está voltada para o citoplasma e a C-terminal para o lado extracelular (Jorgensen et al., 1998). Esta subunidade apresenta função estrutural e é considerada como a subunidade reguladora da enzima (Skou e Esmann, 1992; O'Brien et al., 1994; Pressley, 1996). Finalmente, é descrito a presença de um proteolípídeo γ que é constituído por apenas um domínio transmembrana, com a extremidade N-terminal voltada para o meio extracelular e a C-terminal voltada para o

citoplasma. Esta subunidade possui características hidrofóbicas associadas à Na^+, K^+ -ATPase, mas ela não é requerida para a atividade catalítica da enzima (Béguin et al., 1997; Jorgensen et al., 1998, Cornelius e Mahmmound, 2003).

A natureza molecular da H^+ -ATPase foi elucidada após a purificação de um polipeptídeo de 100 kDa dos fungos *Schizosaccharomyces pombe*, *Schizosaccharomyces cerevisiae* e *Neurospora crassa*. Este peptídeo, após sua reconstituição em lipossomos, foi capaz de formar um intermediário β -aspartil fosfato, possuindo uma atividade translocadora de prótons dependente de ATP (Morsomme e Boutry, 2000).

Modelos de topologia da H^+ -ATPase (Ilustração 3) mostraram a presença de 8 a 12 domínios transmembrana (Moller et al., 1996; Morsomme e Boutry, 2000). Baseado na análise de hidropatia e dados experimentais localizando os domínios amino e carboxi terminais na face citoplasmática da membrana, um modelo com dez segmentos transmembrana (M1-M10) é mais aceito para esta enzima (Ilustração 3). Além disso, a controvérsia acerca do número de vezes que a proteína atravessa a membrana foi recentemente diminuída pelo mapa tridimensional da H^+ -ATPase de membrana da *N. Crassa* com uma resolução de 8 Å por cristalografia eletrônica (Auer et al., 1998). Esses dados resultaram em um mapa com domínios que atravessam a membrana dez vezes com quatro regiões citoplasmáticas. Informações a respeito dos domínios transmembrana envolvidos no transporte de cátions vieram principalmente de estudos da Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático e da Na^+, K^+ -ATPase onde os domínios citoplasmáticos denominados M4, M5 e M6 estariam envolvidos no transporte de cátions (MacLennan et al., 1997; Jorgensen et al., 1998). O mecanismo para o transporte de próton pela H^+ -ATPase ainda não foi elucidado, apesar de estudos de mutagênese sítio dirigida terem sido realizados nas regiões transmembrana da H^+ -ATPase de levedura (Seto-Young et al., 1996; Dutra et al., 1998).

Além disso, análises de hidropatia também indicam um modelo topológico comum para as enzimas H^+ -ATPase de *N. Crassa*, Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático e da Na^+, K^+ -ATPase de membrana plasmática renal (Lutsenko e Kaplan, 1995), com o polipeptídeo de 100 kDa transmembrana onde quatro e seis segmentos hidrofóbicos estão próximos a porção N-terminal e C-terminal da molécula, respectivamente. Além disso, a região central presente no

citoplasma contém sítios fortemente conservados para a ligação de ATP e fosforilação (Ambesi et al., 2000).

A função específica da região N-terminal da H^+ -ATPase ainda não é bem conhecida. A região C-terminal da Na^+, K^+ -ATPase e Ca^{2+} -ATPase foi apontado como responsável pelas mudanças de conformação durante o ciclo catalítico (Lutsenko e Kaplan, 1994). Algumas mutações nesta região da H^+ -ATPase de leveduras mostraram-se defeituosas no acoplamento entre o transporte de próton e a hidrólise de ATP (Wach et al., 1996; Wang et al., 1996).

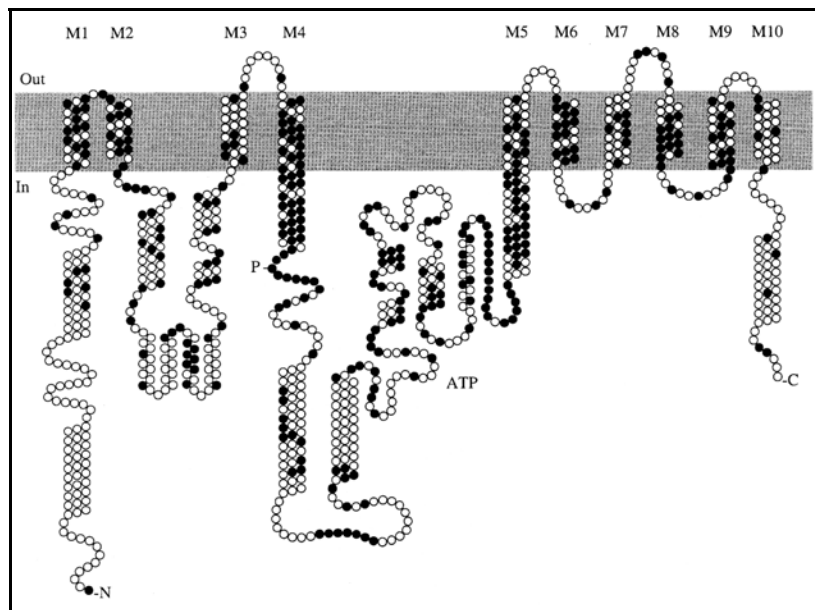


Ilustração 3. Modelo topológico de H^+ -ATPase de membrana plasmática de fungo. M1-M10, segmentos transmembrana; P, sítio de fosforilação; ATP, sítio de ligação do ATP; resíduos em negrito são comuns em vários gêneros e espécies de fungos conforme descrito por Ambesi et al. (2000).

A região C-terminal da H^+ -ATPase tem uma função regulatória na levedura (Eraso e Portillo, 1994) e em vegetais (Palmgren et al., 1990; 1991), atuando como um domínio auto-inibitório. É importante notar que dois pequenos proteolipídeos, Pmp1 e Pmp2, que estão associados na membrana com a cadeia polipeptídica de 100 kDa, foram apontados como reguladores da H^+ -ATPase de *S. cerevisiae*, *S. pombe* e *N. crassa* porém o mecanismo de regulação não foi demonstrado até o presente momento (Navarre et al., 1994).

Estudos recentes mostram que os segmentos transmembrana (M1-M10)

das ATPases do tipo P formam cinco voltas extracelulares curtas, com exceção da volta entre M7M8, e três principais porções citoplasmáticas: i) um grande domínio globular entre os segmentos M4 e M5, que contem cerca de 430 resíduos de aminoácidos, ii) uma calda N-terminal longa com cerca de 90 resíduos de aminoácidos e iii) uma alça com cerca de 120 resíduos de aminoácidos entre M2 e M3 (Rice et al., 2001; Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003). Estas porções citoplasmáticas estão arranjadas em três domínios globulares (ver Ilustração 4) denominados P (domínio de fosforilação), N (domínio de ligação de nucleotídeos) e A (domínio atuador), que apresentam similaridade estrutural com os domínios da Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático (Toyoshima et al., 2000; Rice et al., 2001; Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003). Os domínios N e P são formados por diferentes regiões da alça M4M5, e neles estão localizados, respectivamente, o sítio de ligação do ATP e o resíduo de aspartato que é fosforilado durante o ciclo reacional. O domínio A é formado pela alça M2M3 em interação com a cauda amino-terminal da subunidade α (Toyoshima et al., 2000; Jorgensen e Pedersen, 2001; Rice et al., 2001; Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003).

Recentemente, experimentos de proteólise com a H^+ -ATPase de membrana plasmática de *Neurospora Crassa* e a H^+, K^+ -ATPase gástrica têm sugerido que a maior parte da molécula está dentro da bicamada lipídica (Vigneron et al., 1995; Raussens et al., 1997; 1999). O domínio globular localizado entre M4 e M5 (domínio de ligação do ATP), contém o resíduo de aspartato que é fosforilado durante o ciclo catalítico (Pardo e Slayman, 1988).

A estrutura quaternária das H^+ -ATPases de fungos e vegetais ainda não foi totalmente elucidada. Após a solubilização com detergentes, foi proposto que a H^+ -ATPase do *S. Pombe* também formava um oligômero constituído de 8 a 10 monômeros (Dufour e Goffeau, 1980), enquanto a H^+ -ATPase purificada de *N. Crassa* formou hexâmeros estáveis. No entanto, a solubilização pode afetar a estrutura quaternária da proteína, resultando em outros estados de agregação (Chadwick et al., 1987; Auer et al., 1998; Morsomme e Boutry, 2000).

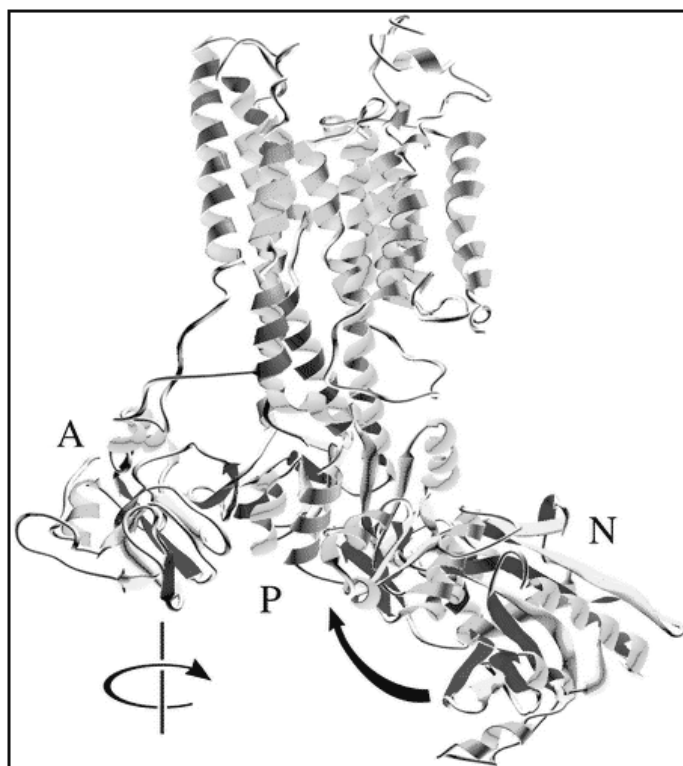


Ilustração 4. Estrutura representativa do arranjo da porção citoplasmática da subunidade α das ATPases do tipo P: domínios de fosforilação (P), de ligação de nucleotídeos (N) e atuador (A); *apud* Kaplan (2002).

Análises de cristalografia bidimensional (Ilustração 5), com uma resolução de 0,8 nm, de H^+ -ATPase obtidas de *N. crassa* crescidas em filmes de carbono foram recentemente elucidadas, e observou-se a presença de hexâmeros estáveis de H^+ -ATPase organizados de forma circular, com suas regiões citoplasmáticas voltadas para fora (Scarborough, 2000).

O ciclo catalítico proposto para a H^+ -ATPase está baseado principalmente nos modelos atuais para a Na^+,K^+ -ATPase e Ca^{2+} -ATPase de mamíferos. O esquema geral inclui dois estados conformacionais distintos da enzima denominados E_1 e E_2 . Há evidências de que estas duas conformações têm diferentes afinidades para cátions translocados. Similarmente, eles diferem em reatividade no sítio de ligação do nucleotídeo, que pode ser fosforilado pelo γ -fosfato do ATP na forma E_1 ou por P_i livre na forma E_2 (MacLennan et al., 1997).

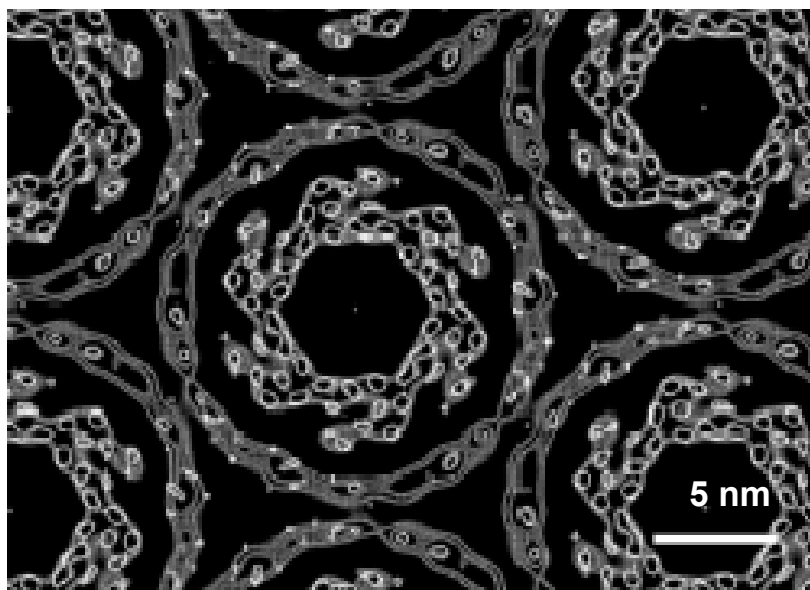


Ilustração 5. Imagem bidimensional dos hexâmeros obtida por densidade eletrônica de cristais de H⁺-ATPase, *apud* Scarborough, 2000.

O ciclo de reação da H⁺-ATPase está esquematizado na Ilustração 6. O ATP e o H⁺ se ligam à forma E₁ da enzima (passo 1). A ordem de ligação não é conhecida, apesar de que Blanpain et al. (1992) propuseram que a mudança da conformação de E₂ para E₁ é facilitada pela ligação do H⁺, seguida pela fixação do ATP. Um intermediário fosforilado de maior energia é formado e ADP é liberado (passo 2). Ocorre uma mudança na conformação de E₁ para E₂ (passo 3), seguida pela liberação do H⁺ para o exterior (passo 4). Finalmente fosfato (Pi) é liberado e a enzima retorna para a conformação E₂ (passo 5). O passo de transição entre E₂ e E₁ (passo 6) foi proposto como sendo limitante da velocidade do transporte ativo realizado por enzimas desta classe (Amory et al., 1982).

O vanadato, um análogo do estado de transição do fosfato, é um potente inibidor das ATPases do tipo P. Em baixas concentrações (da ordem de nanomolar) e na presença de íons magnésio o vanadato inibe a enzima ligando-se ao sítio de fosforilação, localizado no domínio citoplasmático da ATPase do tipo P (Fedosova et al., 1998). O vanadato devido a sua similaridade estrutural com fosfato mimetiza o estado de transição para a fosforilação/desfosforilação da enzima na forma E₂ bloqueando o ciclo catalítico da enzima (Morsomme e Boutry, 2000; Rice et al., 2001).

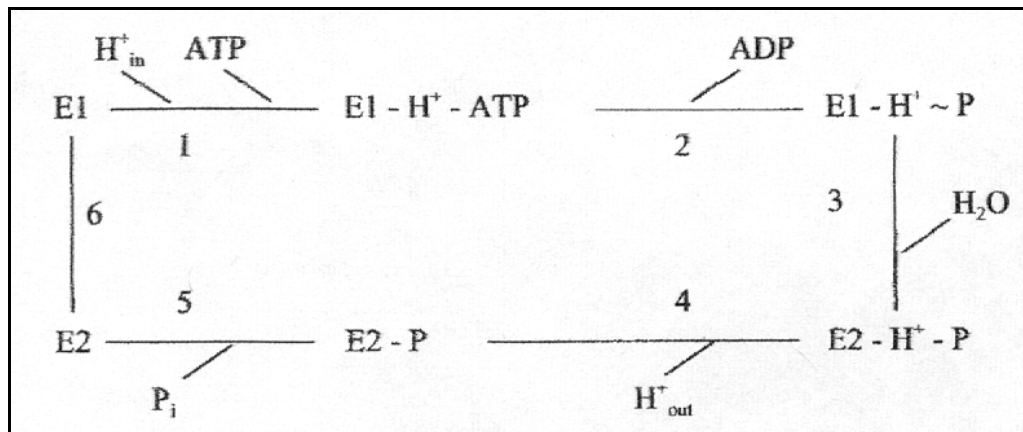


Ilustração 6. Ciclo reacional da H^+ -ATPase do tipo P, *apud* Morsomme e Boutry, 2000.

As ATPases do tipo P foram inicialmente classificadas em dois grupos principais (P_1 e P_2) baseado na especificidade de transporte de cátions. Os membros do grupo P_1 transportam metais pesados como Cu^{2+} , Cd^{2+} , e Hg^{2+} , enquanto os membros do grupo P_2 transportam cátions monovalentes e divalentes incluindo H^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+} . Por outro lado, uma KdpB-ATPase da *Escherichia coli*, que acumula íons potássio sob baixas concentrações destes íons em meio de cultura, compartilha características estruturais de ambos os grupos e então foi classificada como uma P_3 -ATPase. Analisando o genoma da *S. cerevisiae* foi encontrado um total de 16 ATPases do tipo P, dentre elas duas são P_1 -ATPases, nove P_2 -ATPases (incluindo duas H^+ -ATPases) e duas novas famílias de ATPases do tipo P, ainda com funções não totalmente elucidadas, descritas como P_4 (flipases e transportadores ABC) e P_5 (Lutsenko and Kaplan, 1995; Catty et al., 1997; Morsomme et al., 2000).

Recentemente, uma nova classificação para as ATPases do tipo P tem sido proposta baseada na análise filogenética destas enzimas (homologia estrutural), que podem ser divididas em cinco grandes grupos descritos como tipos I a V. Além disso, dentro destes grupos, um total de 10 diferentes subtipos ou classes podem ser encontrados. As H^+ -ATPases são classificadas como do tipo IIIA, que são bombas de H^+ encontradas quase exclusivamente em membrana plasmática de plantas e fungos. Estas ATPases são capazes de manter o pH intracelular ao redor de 6,6, contra um pH extracelular de 3,5, que

corresponde a um potencial de membrana ao redor de -180 mV (Axelsen and Palmagren, 1998; Kühlbrandt, 2004).

1.3 Solubilização de proteínas de membrana

Nos últimos trinta anos, o emprego de detergentes tem alcançado grande sucesso na solubilização de proteínas de membranas, podendo-se encontrar excelentes revisões sobre detergentes comumente usados na solubilização de proteínas de membrana, incluindo suas propriedades físicas (Marie et al., 2000).

Uma solubilização efetiva de proteínas de membrana envolve tanto a seleção do detergente adequado como a determinação de condições apropriadas para a solubilização. Os efeitos do pH e da temperatura também afetam marcadamente este processo. A compatibilidade do detergente com métodos preparativos específicos ou analíticos deve ser considerada, bem como a possível remoção do detergente no final da purificação (Santos e Ciancaglini, 2000).

A maioria dos detergentes, tanto iônicos (catiônicos ou aniônicos) como não-iônicos (neutros), são substâncias anfífilas solúveis. Quando o detergente é adicionado à água, ele forma uma monocamada na interface ar-água que está em equilíbrio com seus monômeros, ou com monômeros e os seus cristais líquidos na fase aquosa. Quando a concentração dos monômeros de detergente alcançam um nível crítico, e a temperatura é favorável, eles se associam formando micelas, onde a parte hidrofóbica das moléculas está voltada para o interior da micela, e a parte hidrofílica está direcionada para fora, na fase aquosa (Koepsell, 1986). A concentração de detergente acima da qual são formadas as micelas é denominada Concentração Micelar Crítica (CMC). A CMC é característica para cada detergente, e dependente da temperatura, força iônica, presença de álcoois e pH (Silvius, 1992). A formação das micelas requer também uma temperatura crítica, ou seja, Temperatura Micelar Crítica (CMT) que é dependente da natureza do detergente (Carey e Small, 1972).

De uma maneira geral, os detergentes não iônicos são freqüentemente empregados na solubilização de membranas lipoprotéicas, devido a três importantes fatores: (i) a sua eficiência no rompimento das interações lipídeo-

lipídeo e lipídeo-proteína; (ii) a sua ineficiência no rompimento de interações proteína-proteína e (iii) por serem menos desnaturantes que os detergentes iônicos (Tzagaloff e Penefsky, 1971; Helenius e Simons, 1975; Dufour e Goffeau, 1978; Helenius et al, 1979; Koepsell, 1986).

Outros detergentes que vêm sendo empregados nos estudos de solubilização de proteínas de membrana são os zwitteriônicos, que aparentemente são mais efetivos na solubilização das proteínas e não provocam a sua desnaturação, ao contrário dos outros tipos de detergentes (Hjelmeland, 1980).

Bowman et al. (1981) solubilizaram e purificaram a H⁺-ATPase de membrana plasmática de *Neurospora Crassa*. A enzima foi extraída da membrana pelo tratamento com 0,1% de deoxicolato e a posterior solubilização foi realizada com 0,6% de deoxicolato na presença de 45% de glicerol. A purificação da H⁺-ATPase, foi efetuada empregando-se um gradiente de glicerol, onde obteve-se um rendimento de 70 – 90%.

A lisolecitina também foi utilizada para solubilizar H⁺-ATPase de membranas plasmáticas de *Neurospora Crassa*, com uma eficiência de 30 a 40% na atividade ATPase. Este procedimento de extração requer o uso de inibidores de proteases, e geralmente tem sido utilizada a quimiostatina, que resulta no aumento da quantidade de ATPase ativa no final do procedimento de extração. Foi constatado, também, que o vanadato na presença de Mg-ATP pode aumentar significativamente a solubilização de moléculas de H⁺-ATPase ativas (Addison e Scarborough, 1981).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O objetivo do projeto de Doutorado foi demonstrar a presença de uma ATPase do tipo P com uma possível atividade no transporte de H^+ ou H^+ / íon na membrana de *S. mutans*, bem como sua caracterização cinética e estudar o papel dessa enzima durante o crescimento da bactéria.

2.2 Objetivos específicos

- Padronização de condições ótimas de cultivo de *Streptococcus mutans* para a obtenção da H^+ -ATPase (tipo P).
- Obtenção de uma fração de membrana rica em atividade ATPase do tipo P.
- Solubilização e caracterização estrutural da ATPase do tipo P.
- Estudo dos níveis de atividades ATPase do tipo P e F durante o crescimento de *S. mutans*.
- Caracterização cinética da ATPase do tipo P presente na membrana extraída de *S. mutans*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção da linhagem *Streptococcus mutans*

A linhagem de *Streptococcus mutans*, classificada sob o número 25175 pela ATCC (American Type Culture Collection), foi obtida da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello”, Campinas-SP. Esta linhagem foi utilizada para a obtenção da H⁺-ATPase. As células foram mantidas em estoque à -20°C em glicerol ou, para utilização freqüente, em placas de Petri com meio Trypticase Soy Agar (TSA) ou em Meio Completo conforme descrito por Harper e Loesche (1984), repicadas periodicamente e mantidas em refrigerador a 4°C.

3.2 Cultivo da bactéria

A bactéria foi cultivada em meio de crescimento comumente descrito na literatura e que permite o crescimento dos microorganismos com uma alta eficiência. Foram empregados os meios de cultivo descrito por Harper e Loesche (1984) ou meio a base de Trypticase Soy Agar (TSA), previamente autoclavados a 120°C por 20 minutos. Quando descrito foi adicionado 50 mM de Ácido morfolino propano sulfônico (MOPS) ou oligomicina 5 µg/mL.

Após plaqueamento e inoculação, foi procedida a microaerobiose pela “técnica da vela”, conforme descrito por Harper e Loesche (1984).

Para crescimento em meio líquido, foram empregados os mesmos meios de cultivo, sem a adição de ágar. Para ambas as situações foram efetuadas a 37°C. Inicialmente, foram realizados experimentos para verificar a cinética de crescimento efetuando leituras em A₇₀₀ (nm) e variação pH no meio de cultivo.

Para cultivo em meio líquido em grandes quantidades (entre 500 mL a 1 L), o meio foi acondicionado em balões de fundo chato contendo uma barra magnética, autoclavados e receberam o inóculo (uma cultura de 5-10 mL), processado conforme descrito acima, porém com agitação.

3.3 Obtenção das frações de membrana de *Streptococcus mutans*

As frações de membrana rica em H⁺-ATPase foram obtidas de acordo com a

metodologia descrita por Bender et al. (1986) com algumas modificações detalhadas a seguir e também descritas em Magalhães et al. (2003).

Cerca de 1,0 g (peso úmido) de células de *Streptococcus mutans* foram lavadas com 15 mL de água destilada e sedimentada em centrífuga clínica por 15 minutos, duas vezes. O pellet obtido foi ressuspenso em tampão MES 25 mM, pH 6,2 contendo 97 mM de tiocianato de sódio (Tampão de Preparação) até absorvância de 0,400 em 700 nm, homogeneizado em potter e em seguida foi adicionado 0,4 mg/mL de lisozima. A mistura foi deixada por 3 horas a 25°C com suave agitação e em seguida centrifugada a 9.000xg por 20 minutos a 4°C. O pellet obtido foi ressuspenso em 50 mL de Tampão MES 50 mM, pH 6,2 contendo 10 mM de MgSO₄ e 0,8 M de NaCl (Tampão Osmótico).

Esta solução foi sonicada por 20 minutos, com intervalos de 5 em 5 minutos para manter a temperatura por volta de 4°C, utilizando-se um sonicador de ponta Vibracell 600V, a 37% de amplitude. (O rompimento das células foi acompanhado em microscópio óptico). Em seguida foram adicionados 175 U/mL de DNAase e 250 µL/g de célula de coquetel de inibidor de proteases (Sigma P-8465) e deixado por 45 minutos à temperatura ambiente com agitação suave. O material assim obtido foi ultracentrifugado a 100.000xg por 1 hora a 4°C. O pellet que corresponde a fração de membrana rica em H⁺-ATPase foi ressuspenso em tampão MES 25 mM pH 6,2 e as membranas foram novamente tratadas com lisozima em uma proporção de 1:1 (p/p) por 2 horas à temperatura ambiente com agitação suave. Essa solução foi novamente ultracentrifugada a 100.000xg por 1 hora a 4°C e ressuspensa em 30 mL de Tampão Tris.HCl 50 mM, pH 7,5 contendo 10 mM de MgSO₄ (Tampão de Estoque). As frações de membrana foram imediatamente utilizadas ou armazenadas a -20°C.

3.4 Dosagem de atividade da lisozima

A atividade da lisozima (SIGMA L-6876) utilizada na preparação da fração de membrana foi realizada conforme descrito por Canfield (1963), utilizando-se uma suspensão de *micrococcus lisodeiKticus* como substrato. Uma unidade de enzima foi definida como sendo a variação de densidade ótica em 450 nm de 0,001 por

minuto em pH 6,2 a 25°C.

3.5 Dosagem de proteína

As concentrações de proteína foram determinadas pelo método descrito por Hartree (1972) na presença de SDS 2% (p/v) utilizando a soroalbumina bovina (BSA) como padrão.

3.6 Determinação da atividade PNFFase

A atividade p-nitrofenilfosfatase (PNFFase) da enzima foi determinada descontinuamente, a 37°C, através da liberação de p-nitrofenolato, em 410 nm ($\epsilon_{410 \text{ nm, pH } 7,5} = 17.600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), em um espectrofotômetro Spectronic Modelo Genesis 2 (Milton Roy). As condições padrões dos ensaios foram: Bis.Tris 50 mM, pH 6,5 contendo: PNFF 10 mM e MgCl_2 10 mM em um volume final de 1,0 mL (as condições ótimas foram determinadas). A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio reacional e interrompida pela adição de NaOH 1 M, em tempos preestabelecidos.

Em cada experimento foram incluídos controles sem a enzima para se estimar a hidrólise não enzimática do substrato. As determinações foram sempre feitas em duplicatas e tomando-se o cuidado de não hidrolisar mais que 5% de substrato. Uma unidade de enzima foi definida arbitrariamente como sendo 1 nmol de p-nitrofenolato liberado por minuto, nas condições padrões do teste.

3.7 Determinação da atividade ATPase

A atividade ATPase foi determinada descontinuamente, a 37°C, utilizando-se um espectrofotômetro Spectronic Modelo Genesis 2 (Milton Roy), pela dosagem do fosfato inorgânico liberado, em meio reacional Bis.Tris 50 mM, pH 6,5 (atividade ATPase total) ou 6,0 (atividade ATPase do tipo P), contendo ATP 5 mM, e MgCl_2 10 mM em volume final de 1,0 mL. A reação foi sempre iniciada pela adição de enzima ao meio reacional e interrompida pela adição de solução gelada de TCA 30% (p/v), em tempos reacionais preestabelecidos (as condições ótimas de cinética foram determinadas variando-se também a quantidade de enzima no

meio reacional).

Para a determinação da atividade ATPase do tipo P os experimentos foram sempre realizados na presença de oligomicina 4 µg/mL no meio reacional.

Os tubos foram, então, colocados em banho de gelo para diminuir a hidrólise do ATP e imediatamente centrifugados por 10 minutos. Em seguida, foi efetuada a dosagem de fosfato, seguindo o método descrito por Heinomen e Lahti (1981). Em cada experimento foram incluídos controles sem a enzima para se estimar a hidrólise não enzimática do substrato. As determinações foram sempre feitas em duplicatas e tomando-se o cuidado de não hidrolisar mais que 5% de substrato. Uma unidade de enzima foi definida arbitrariamente como sendo 1 nmol de fosfato liberado por minuto, nas condições padrões do teste.

3.8 Centrifugação em gradiente de densidade de sacarose

Uma amostra de fração de membrana extraída de *S. mutans* (contendo 1,0 mg de proteína) foi aplicada sobre um gradiente contínuo de sacarose de 1-50% (p/v) em tampão Tris.HCl 5mM pH 7,5. Após 4 horas de ultracentrifugação a 180.000xg usando um rotor vertical (Mod. P65VT3) de uma ultracentrífuga Hitachi (Mod. 55PT-72), a 4°C e alíquotas de 0,5 mL foram coletadas utilizando-se um coletor calibrado. De cada fração foram retiradas alíquotas para dosagem de proteína conforme descrito em 3.9, atividade e ATPase conforme descrito em 3.7 percentagem de sacarose por refratometria.

3.9 Dosagem de proteína da fração de membrana em gradiente de sacarose

As concentrações de proteína das alíquotas coletadas no gradiente de sacarose foram determinadas seguindo o método de Read e Northcote (1981) utilizando a soroalbumina bovina (BSA) como padrão.

3.10 Estabilidade da fração de membrana obtida de *S. mutans*

As frações de membrana (1 mg/mL de proteína), foram mantidas a -4°C durante pelo menos 30 dias. A determinação da atividade ATPase residual foi realizada pela adição da enzima ao meio reacional, durante este período,

conforme descrito em **3.7**.

3.11 Solubilização da fração de membrana obtida de *S. mutans* com diferentes detergentes.

Alíquotas de 1,0 mL de membrana (1,5 mg/mL) em tampão Tris.HCl 50 mM, pH 7,5 contendo 10 mM de MgSO₄, foram incubadas com concentrações de detergentes (acima da concentração micelar crítica), tempos e temperatura previamente estabelecidos. Em seguida cada alíquota foi ultracentrifugada à 100.000xg por 1 hora, a 4°C. O extrato bruto solubilizado foi obtido no sobrenadante da ultracentrifugação e o pellet, por sua vez, foi ressuspenso no mesmo volume do tampão de homogeneização e em seguida essas frações foram analisadas em relação a concentração de proteína (conforme descrito em **3.5**) e a atividade ATPase (conforme descrito em **3.7**).

3.12 Efeito da concentração de colato de sódio na solubilização da fração de membrana obtida de *S. mutans*.

Alíquotas com concentração protéica de 1,5 mg/mL de membrana, foram incubadas com diferentes concentrações de Colato de Sódio variando de 20 a 80 mM, em tampão Tris.HCl 50 mM, pH 7,5. Em uma determinada temperatura e após um tempo preestabelecido, cada alíquota foi ultracentrifugada à 100.000xg por 1 hora, a 4°C, e analisada conforme descrito em **3.5** e **3.7**.

3.13 Efeito da concentração de proteína na solubilização da fração de membrana obtida de *S. mutans*.

Alíquotas de 1,0 mL de membrana, apresentando concentrações de proteína variando de 0,5 a 2,0 mg/mL, em tampão Tris.HCl 50 mM, pH 7,5, foram incubadas com Colato de Sódio (50 mM). Em uma determinada temperatura e após um tempo preestabelecido, cada alíquota foi ultracentrifugada à 100.000xg por 1 hora, a 4°C, e analisada conforme descrito em **3.5** e **3.7**.

3.14 Efeito da temperatura de incubação na solubilização da fração de membrana obtida de *S. mutans*.

Alíquotas de 1,0 mL de membrana (1,5 mg/mL) em tampão Tris.HCl 50 mM, pH 7,5, foram incubadas com Colato de Sódio (50 mM) em diferentes temperaturas. Em tempos preestabelecidos cada alíquota foi ultracentrifugada à 100.000xg por 1 hora, a 4°C, e analisada conforme descrito em 3.5 e 3.7.

3.15 Efeito do tempo de incubação na solubilização da fração de membrana obtida de *S. mutans*.

Alíquotas de 1,0 mL de membrana (1,5 mg/mL) em tampão Tris.HCl 50 mM, pH 7,5, foram incubadas a temperatura 4°C com Colato de Sódio (50 mM). Em tempos preestabelecidos cada alíquota foi ultracentrifugada à 100.000xg por 1 hora, a 4°C, e analisada conforme descrito em 3.5 e 3.7.

3.16 Estabilidade do extrato bruto solubilizado com colato de sódio

O extrato bruto solubilizado foi mantido a -4°C durante pelo menos 30 dias. A atividade ATPase residual foi determinada conforme descrito em 3.5 e 3.7.

3.17 Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada de acordo com Laemmli (1970), utilizando-se nitrato de prata (Blum et al., 1987) ou Coomassie Brilliant Blue R-250 para coloração de proteínas. As amostras, quando necessário, foram concentradas utilizando-se micro-concentradores (MICROCON 30) e posteriormente aplicadas no gel de poliacrilamida a 7% (p/v) com gel de empilhamento 5% (p/v). Foram utilizados como padrão de massa molecular: Miosina (205 kDa); β -galactosidase (116 kDa); fosforilase b (97 kDa); soro albumina bovina (66 kDa); ovoalbumina (45 kDa); anidrase carbônica (29 kDa).

3.18 Atividade fosfomonohidrolase em gel de eletroforese (SDS-PAGE)

A eletroforese foi realizada conforme descrito em 3.17, e as proteínas foram renaturadas incubando-se o gel em tampão Tris.HCl 5 mM pH 7,5 três vezes por

trinta minutos. A atividade fosfohidrolítica no gel foi detectada em tampão Bis.Tris 50 mM, pH 6,0, contendo ATP 5 mM, MgCl₂ 10 mM, 0,12% Fast Blue RR-salt e 0,12% α -naftilfosfato, a 37°C, e quando indicado, acrescidos com ortovanadato (3 μ M) ou lanzoprazol (50 μ M).

3.19 Obtenção do intermediário fosforilado

As misturas reacionais contendo 50 μ g de proteína total na fração de membrana em tampão Bis-Tris 50 mM, pH 6,0 contendo 10 mM MgCl₂, 2 μ Ci de [³²P]ATP e 5 mM de ATP frio foi incubada por 5 min, a 37°C. Quando indicado, a esta mistura foi adicionado ortovanadato (3 μ M) ou lanzoprazol (50 μ M). A reação foi sempre iniciada pela adição de enzima ao meio reacional e interrompida pela adição de solução gelada de TCA 50% (p/v). O precipitado protéico foi obtido por centrifugação a 20.000 x g por 10 minutos a 4°C, dissolvido no tampão desnaturante e neutralizado por vapores de amônia. A eletroforese foi realizada de acordo com o método descrito por Laemmli (item 3.17). O intermediário fosforilado foi visualizado por autoradiografia dos géis revelados com nitrato de prata e secos, que foram expostos por cinco dias em um “storage phosphor screen”, e em seguida a imagem foi processada utilizando um STORM 840 PhosphorImager (Molecular Dynamics).

3.20 Ação de inibidores sobre a atividade da fração de membrana e do extrato bruto solubilizado

Este estudo foi realizado utilizando-se os seguintes inibidores: ortovanadato, lanzoprazol, oligomicina, DCCD, azida de sódio, NEM, bafilomicina, ouabaína, tapsigargina, furosemida e ácido etacrínico. As soluções dos inibidores foram previamente preparadas no mesmo tampão do meio reacional e a atividade ATPase da enzima foi determinada como descrito no item 3.7.

3.21 Efeito do pH na atividade ATPase

O efeito do pH sobre a atividade ATPase da enzima foi determinado no intervalo de pH compreendido entre 5,0 e 9,0 utilizando-se os seguintes tampões:

MES (pH 5,0-6,0), Bis-Tris (pH 6,0-6,5), Imidazol (pH 6,5-7,5), Tris.HCl (pH 7,0-9,0) e AMPOL (pH 8,5-9,0), todos na concentração final de 50 mM. A atividade ATPase foi determinada conforme descrito no item 3.7. Para a determinação do efeito do pH na atividade ATPase do tipo P, os experimentos foram realizados na presença de oligomicina 4 $\mu\text{g/mL}$ no meio reacional, conforme já descrito anteriormente.

3.22 Efeito da concentração do substrato na atividade ATPase do tipo P

O estudo do efeito da concentração do ATP e do Mg-ATP sobre a atividade enzimática da fração de membrana foi realizado conforme o descrito no item 3.7, variando as concentrações de 0,01 a 10 mM. Para a determinação do efeito da concentração do substrato na atividade ATPase do tipo P os experimentos foram realizados na presença de oligomicina 4 $\mu\text{g/mL}$ no meio reacional.

3.23 Efeito de EDTA e de íons metálicos na atividade ATPase do tipo P

Os efeitos de EDTA e de íons magnésio, cálcio, sódio, potássio, amônio e zinco na atividade ATPase do tipo P foram estudados para a atividade ATPase do tipo P conforme descrito no item 3.7, variando-se a concentração dos mesmos. Os experimentos foram realizados na presença de oligomicina 4 $\mu\text{g/mL}$ no meio reacional.

3.24 Tratamento dos dados cinéticos

Os parâmetros cinéticos de hidrólise dos substratos, obtidos nas diferentes condições experimentais: K_m (constante de Michaelis Menten), V_M (velocidade máxima), $K_{0,5}$ (constante de dissociação aparente do complexo enzima-ligante) e n (coeficiente de Hill), foram ajustados empregando-se o programa Sigraf (Leone et al., 1992).

3.25 Microscopia óptica de fluorescência

Células de *Streptococcus mutans* foram cultivadas em meio completo por 12 horas. As células foram centrifugadas a 9.000xg por 20 minutos a 4°C e

ressuspensas e incubadas por 10 minutos em uma solução aquosa de alaranjado de acridina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

As células foram submetidas à microscopia de fluorescência em um microscópio NIKON Eclipse E-800, utilizando-se os filtros Texas red e Fit-c. As imagens (com um aumento de 100 vezes) foram adquiridas em o auxílio de uma câmera digital NIKON DXM-1200 acoplada ao microscópio do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da FMRP-USP

4. RESULTADOS

A linhagem de *Streptococcus mutans* classificada pela ATCC (American Type Culture Collection) sob o número 25175 foi escolhida para a obtenção da H⁺-ATPase de membrana plasmática. As bactérias foram cultivadas conforme descrito em 3.2 de Materiais e Métodos, em meio não tamponado e em meio acrescido com 50 mM de MOPS, pH 7,0, denominado simplesmente como meio tamponado.

O crescimento de *S. mutans* apresentou um comportamento característico para cultivo de bactérias (Figura 1), ou seja, uma fase inicial denominada de fase inicial de 4 horas de duração, seguida por uma fase log onde o crescimento exponencial, também foi de 4 horas e então, a fase estacionária, onde não há aumento do número células. Observamos que o crescimento da bactéria em meio tamponado foi maior em cerca de 50%, quando comparado com o crescimento em meio não tamponado. É importante ressaltar que a curva de crescimento foi monitorada até 14 horas de cultura (resultados não mostrados) e observou-se que ambas culturas se mantiveram na fase estacionária a partir de 10 horas de crescimento.

Quando monitoramos o decaimento do pH dos meios de cultura, podemos observar que o pH do meio não tamponado diminuiu mais rapidamente quando comparado com o meio tamponado, conforme esperado (Figura 2). Além disso, no final da fase log da curva de crescimento, os valores de pH atingem valores de aproximadamente 4,2 depois de 10 horas de cultura, para as duas condições de cultura estudadas.

Com o objetivo de se obter uma fração de membrana rica em atividade ATPase, após várias tentativas e adequações de condições experimentais, foi padronizada uma metodologia que está detalhada em 3.3 de Materiais e Métodos. Esta metodologia requer o uso de lisozima, a qual é muito utilizada para a remoção de paredes bacterianas, uma vez que a *S. mutans* possui uma parede celular bem espessa, característica de bactéria Gram-positiva.

A atividade da lisozima foi quantificada conforme descrito em 3.4 de Materiais e Métodos, e a atividade encontrada foi de 3.780 U/mg, utilizando-se uma suspensão de *micrococcus lisodeikticus* como substrato (Figura 3). A remoção da parede por esta enzima facilitou o trabalho subsequente de solubilização da membrana, a qual ficou mais acessível à ação dos

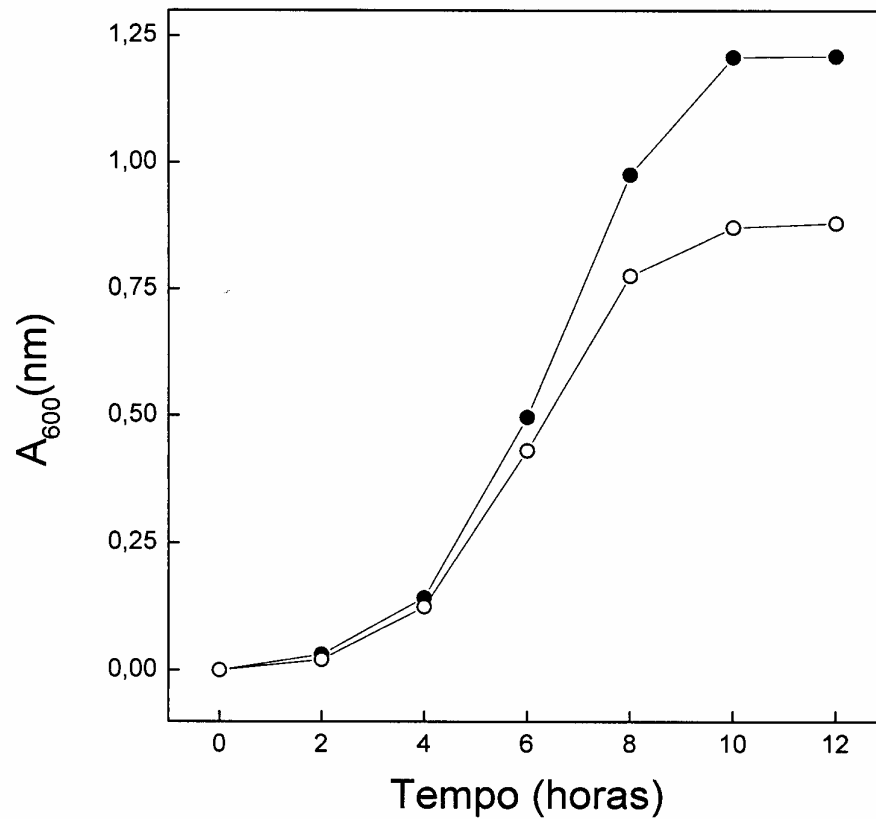


Figura 1. Curva de Crescimento da *S. mutans*. Células (ATCC 25175) foram cultivadas conforme descrito no item 3.2 em Materiais e Métodos e em diferentes intervalos de tempo, mediu-se a absorbância da cultura em 600 nm. (○) meio completo e (●) meio completo tamponado com MOPS 50 mM pH 7,0.

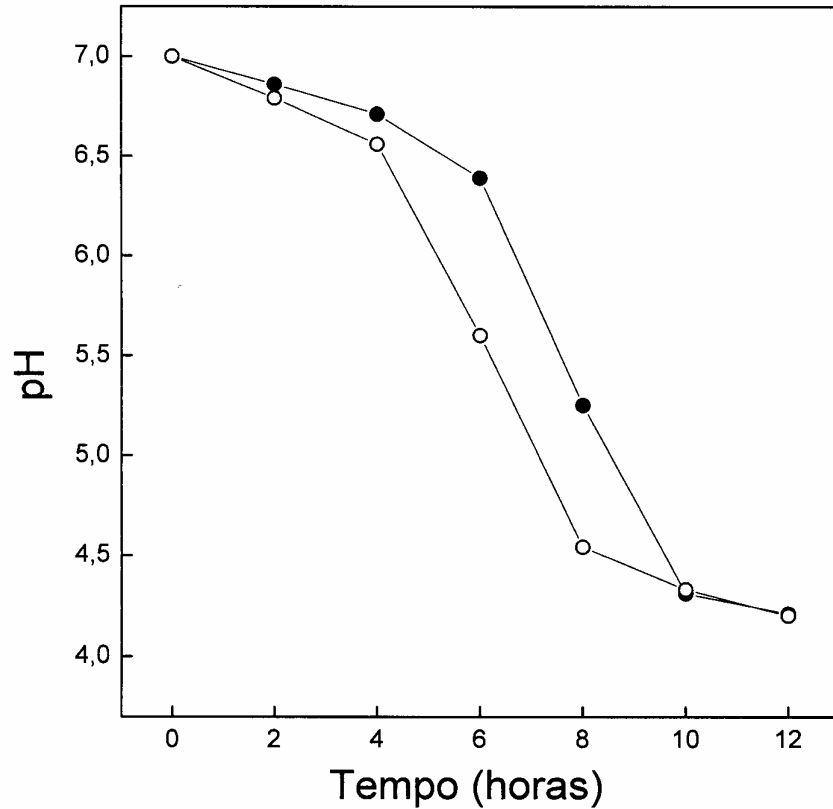


Figura 2. Variação de pH no meio de cultura durante o crescimento de *S. mutans*. Células (ATCC 25175) foram cultivadas conforme descrito no item 3.2 em Materiais e Métodos e em diferentes intervalos de tempo, mediu-se o pH do meio de cultura. (○) meio completo e (●) meio completo tamponado com MOPS 50 mM pH 7,0.

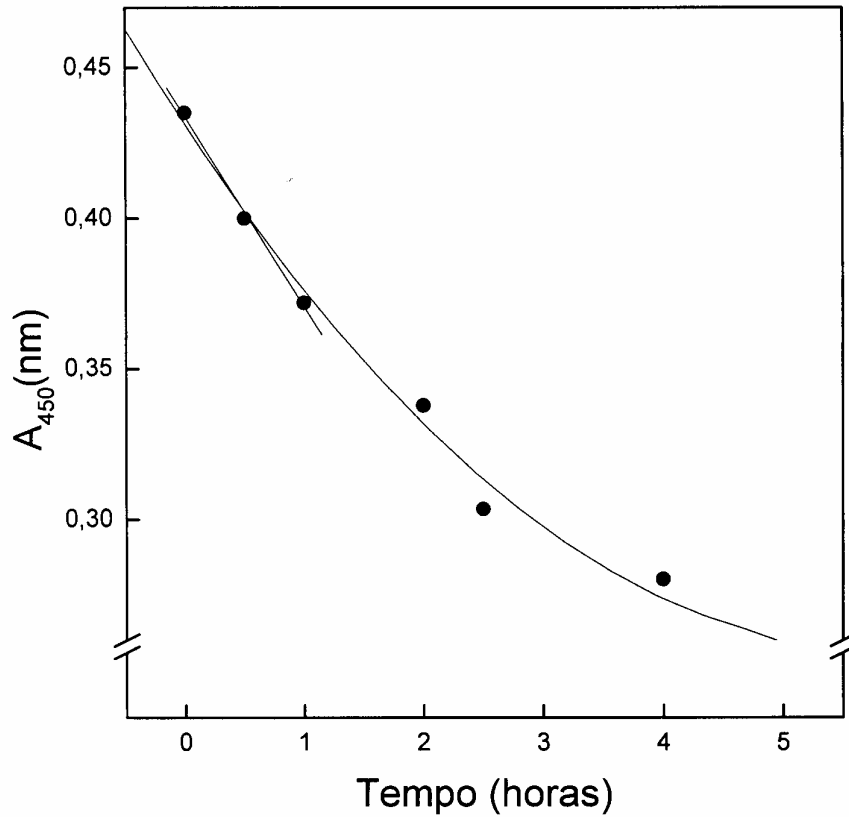


Figura 3. Atividade da lisozima foi determinada empregando-se uma suspensão de *micrococcus lisodeikticus* como substrato. A atividade da lisozima foi determinada conforme descrito no item 3.12 em Materiais e Métodos, utilizando-se uma amostra contendo 1,0 mg/mL de lisozima.

detergentes.

Uma vez padronizada a metodologia de extração da fração de membrana, coletamos amostras de *S. mutans* em diferentes intervalos de tempo de cultura, ou seja, durante as três fases de crescimento, tanto para meio de cultura tamponado quanto para o meio não tamponado. A atividade ATPase obtida em função do tempo de cultura e dos diferentes meios está mostrada na Tabela I. A fração de membrana que apresentou maior atividade ATPase foi aquela obtida com 12 horas de crescimento em meio não tamponado. É importante ressaltar que as extrações das frações de membrana, cujas atividades estão apresentadas na Tabela I, foram realizadas iniciando-se com a mesma quantidade de massa úmida de células, obtida do crescimento da bactéria em meio tamponado e não tamponado. Assim, o aumento de atividade ATPase (U/mg) encontrado para o meio não tamponado é significativo e resulta em um aumento de aproximadamente 45%, quando comparado ao meio tamponado. Desta forma, esta condição de cultivo (12 horas, meio não tamponado) foi padronizada para obtenção das células e subsequente extração das frações de membrana.

Tabela I: Atividade ATPase das frações de membrana de *S. mutans*. Células (ATCC 25175) foram cultivadas em meio completo tamponado com MOPS 50 mM, pH 7,0, ou não tamponado. As frações de membrana foram isoladas em diferentes intervalos de tempo, partindo-se de uma mesma massa úmida conforme descrito no item 3.3 em Materiais e Métodos. As dosagens de proteína e a atividade ATPase foram determinadas conforme descrito no item 3.5 e 3.7 em Materiais e Métodos, respectivamente.

Tempo de cultura (horas)	Atividade ATPase (U/mg)		Proteína (mg/mL)	
	Meio não tamponado	Meio tamponado	Meio não tamponado	Meio tamponado
8	59,36	55,66	0,65	0,78
10	55,96	48,66	0,63	0,58
12	104,26	71,03	0,67	0,62

A fração de membrana, rica em atividade ATPase, apresentou pH ótimo de hidrólise de ATP ao redor de 7,0 (Figura 4) e foi relativamente estável, perdendo apenas 5% da atividade ATPase, após um período de 30 dias, quando armazenada a -20°C .

As frações de membrana obtidas nas condições padronizadas resultaram em preparações com atividade específica de hidrólise de ATP de aproximadamente 120 U/mg e muito baixa atividade de fosfomonohidrolase quando o PNFF foi utilizado como substrato (1 U/mg).

Na Figura 5 é mostrada a centrifugação em gradiente de densidade de sacarose, 10 a 50% (p/v), da fração de membrana extraída de *S. mutans*. Nessa Figura podemos observar a obtenção de um pico protéico predominante, relativamente simétrico, que apresenta atividade ATPase em 15% (p/v), que corresponde a densidade de 1,06 (g/mL). Vale a pena comentar que esse pico reunido é inibido cerca de 60% por 3 μM de vanadato e somente 40% por 4 $\mu\text{g/mL}$ de oligomicina. Podemos observar também a presença de um pico relativamente pequeno, em 35 % (p/v), que também apresentou atividade ATPase.

A dependência da atividade ATPase na fração de membrana em função da concentração total de proteína no meio reacional mostrou ser linear até aproximadamente 60 μg de proteína total no tubo, para concentrações de ATP de 5 mM. Além disso, o resultado obtido sugere que nestas condições experimentais as velocidades medidas são de fato velocidades iniciais, uma vez que, o consumo de substrato foi menor que 5% (resultados não mostrados).

Estudando-se o efeito do tempo de reação na atividade ATPase da fração de membrana de *S. mutans* (60 μg), observamos que nos primeiros 20 minutos de reação, a liberação de fosfato inorgânico pela hidrólise de ATP também foi linear com um consumo de substrato sempre menor que 5% (resultados não mostrados).

Obtida a fração de membrana de *S. mutans* com uma boa reprodutibilidade e em maior quantidade, iniciamos estudos de solubilização empregando-se diferentes detergentes e adequando as condições ótimas de solubilização, variando-se a relação proteína/detergente, tempo de incubação e

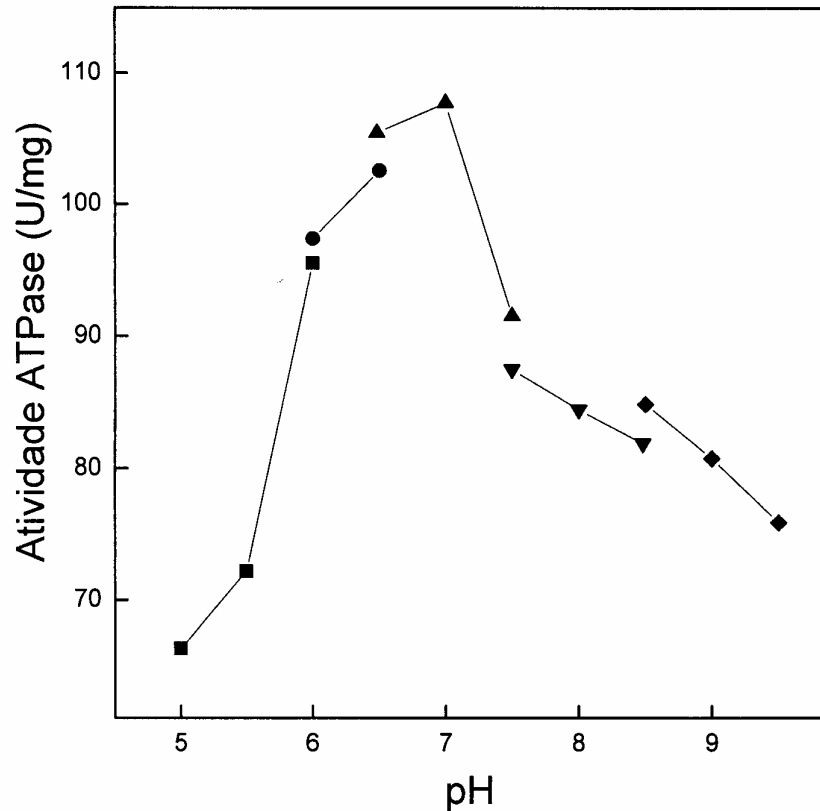


Figura 4. Determinação do pH ótimo de hidrólise de ATP pela fração de membrana da *S. mutans* na faixa de pH entre 5,0 e 9,5 utilizando-se os seguintes tampões: (■) MES (pH 5,0-6,0), (●) BIS-TRIS (pH 6,0-6,5), (▲) Imidazol (pH 6,5-7,5), (▼) Tris (pH 7,0-9,0) e (◆) AMPOL (pH 8,5-9,5). As atividades foram determinadas em 50 mM do tampão apropriado, contendo $MgCl_2$ 10 mM e ATP 5 mM como descrito no item 3.7 de Materiais e Métodos, utilizando-se de 50 μg de proteína.

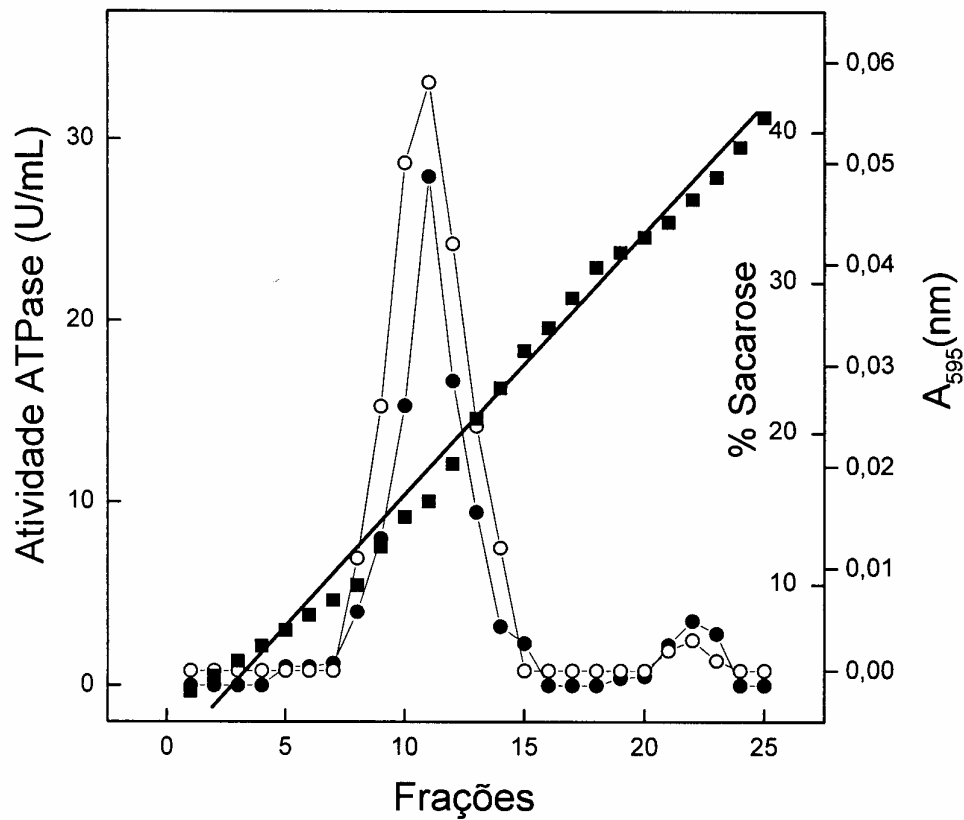


Figura 5. Centrifugação em gradiente de densidade de sacarose da fração de membrana extraída de *S. mutans*. Uma amostra (1,0 mg de proteína) foi aplicada sobre um gradiente contínuo de sacarose de 1-50% (p/v) em tampão Tris-HCl 5 mM pH 7,5. Após 4 horas de ultracentrifugação a 4°C, alíquotas de 0,5 mL foram coletadas e analisadas quanto à concentração de proteína (○) A_{595} (nm) e (■) percentagem de sacarose. A atividade ATPase (●) e a concentração de proteína foram determinadas conforme descrito nos itens 3.7 e 3.9 de Materiais e Métodos, respectivamente.

temperatura.

Quando analisamos os resultados obtidos na Tabela II, podemos observar uma maior eficiência em proteína solubilizada para colato de sódio, Triton X-100, Triton X-114 e SDS. Apesar do polidocanol, CHAPS e deoxicolato de sódio também apresentarem uma boa atividade ATPase no extrato bruto solubilizado, eles solubilizaram uma pequena quantidade de proteína presente na fração de membrana. Os demais detergentes estudados não apresentaram significantes quantidades de atividade ATPase ou proteína no extrato bruto solubilizado.

Tabela II: Efeito de diferentes detergentes na solubilização da fração de membrana de *S. mutans*. A dosagem de proteína e as atividades foram determinadas conforme descrito em 3.5 e 3.7 de Materiais e Métodos, respectivamente. A atividade ATPase específica de 100% corresponde a 120,0 U/mg e a concentração de proteína do ensaio foi de 1,5 mg/mL.

Detergentes	(mg/mL)	Proteína Solubilizada (%)	Atividade ATPase (%)
SDS	10,0	24,6	56,0
Triton X-114	10,0	11,0	34,2
Colato de Sódio	21,5	31,0	42,4
Triton X-100	10,0	13,7	24,2
Glucopironosídeo	17,5	9,1	8,3
CHAPS	5,0	7,9	22,4
CHAPSO	5,0	7,7	9,1
C ₁₂ E ₈	1,0	7,4	13,8
Deoxicolato de Sódio	4,0	7,2	22,4
Tween 20	10,0	6,4	17,4
Polidocanol	10,0	6,3	29,3

Todos os extratos brutos obtidos com os diferentes detergentes foram menos estáveis em relação a atividade ATPase do que a fração de membrana. Os melhores resultados com relação à estabilidade, foram obtidos utilizando-se 50 mM de colato de sódio, que após 15 dias de armazenamento a -4°C, perdeu

50 % da atividade ATPase total (Figura 6). Como para os demais extratos solubilizados este tempo médio de inativação foi atingido com cerca de 3 dias, o colato de sódio foi o detergente escolhido para a otimização das condições de solubilização para a obtenção da ATPase solubilizada, mesmo apresentando um baixo rendimento.

Inicialmente a fração de membrana de *S. mutans* foi incubada por 15 minutos a 4°C com concentrações crescentes de detergente (Figura 7). Após esse período de incubação o material foi ultracentrifugado e o sobrenadante, que corresponde à proteína solubilizada, foi analisado quanto à concentração protéica e sua correspondente atividade ATPase. Como pode ser observado, quando incubamos 1,5 mg/mL de proteína total da fração de membrana com diferentes concentrações de detergente (0 a 80 mM), a quantidade de proteína solubilizada foi crescente até 80 mM. Vale a pena ressaltar que acima desta concentração de detergente a quantidade de proteína obtida no extrato bruto solubilizado permanece constante, mantendo valores de 0,4 mg/mL (resultados não mostrados). Quando analisamos a atividade ATPase do extrato bruto solubilizado, podemos observar que a mesma aumenta progressivamente e atinge um máximo entre 40-60 mM de colato de sódio.

Mantendo agora a concentração de colato de sódio em 50 mM, analisamos a concentração ótima de fração de membrana no processo de solubilização (Figura 8). Assim, a fração de membrana de *S. mutans* foi incubada por 15 minutos a 4°C com concentrações crescentes de proteína total presente na fração de membrana (0 a 2,0 mg/mL). Neste estudo, a quantidade de proteína solubilizada segue uma relação linear com o aumento da proteína total presente na fração de membrana, porém quando a concentração de proteína alcança 1,5 mg/mL, a atividade ATPase atinge um máximo de cerca de 60 U/mg.

Mantendo-se agora as concentrações de proteína em 1,5 mg/mL e 50 mM de detergente, realizamos um estudo variando-se a temperatura de solubilização, mantendo-se 15 minutos de incubação. Como podemos observar na Figura 9, o detergente é mais eficiente na solubilização de proteínas em temperaturas mais elevadas, mas por outro lado a atividade ATPase do extrato bruto solubilizado diminui com o aumento da temperatura de incubação.

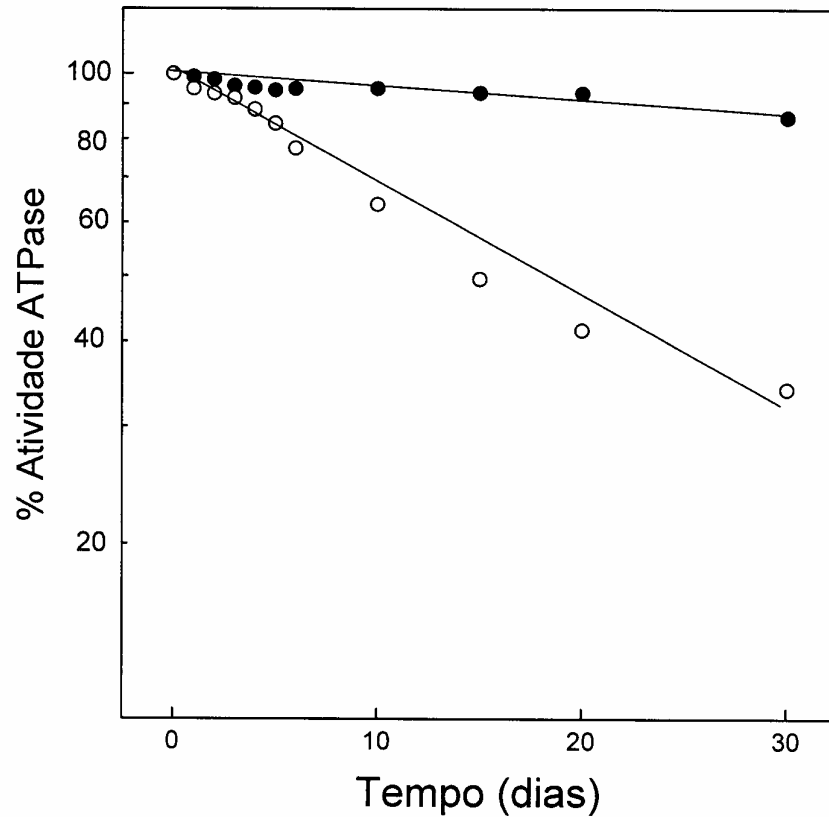


Figura 6. Estabilidade da fração de membrana obtida de *S. mutans* e do extrato bruto solubilizado com colato de sódio 50 mM. Alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo preestabelecidos e a atividade ATPase foi determinada como descrito no item 3.7 de Materiais e Métodos, utilizando-se 50 μg de proteína total da membrana (●) e 20 μg de proteína no extrato bruto solubilizado (○).

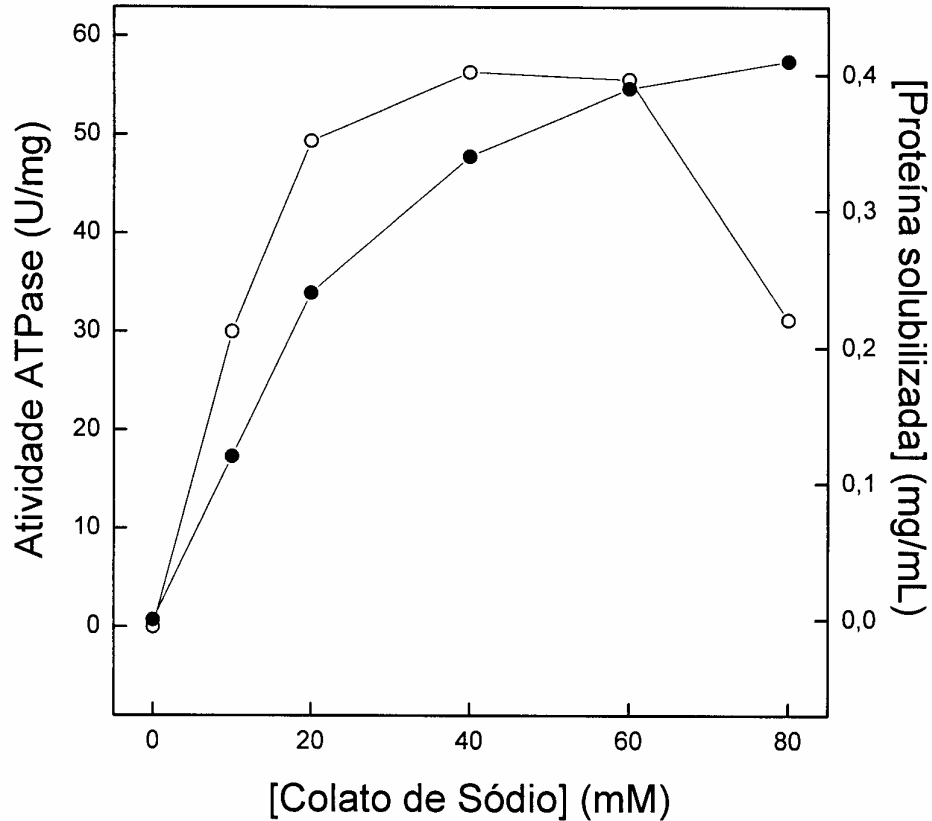


Figura 7. Efeito da concentração de colato de sódio na solubilização da fração de membrana de *S. mutans*. Alíquotas contendo 1,0 mg/mL de proteína total da fração de membrana foram incubadas em tampão Tris.HCl 50 mM pH 7,5, contendo MgSO₄ 10 mM, por 15 minutos, a 4°C com diferentes concentrações do detergente e ultracentrifugadas durante 1 hora a 100.000xg a 4°C. O sobrenadante foi analisado quanto: (○) atividade ATPase e (●) proteína solubilizada.

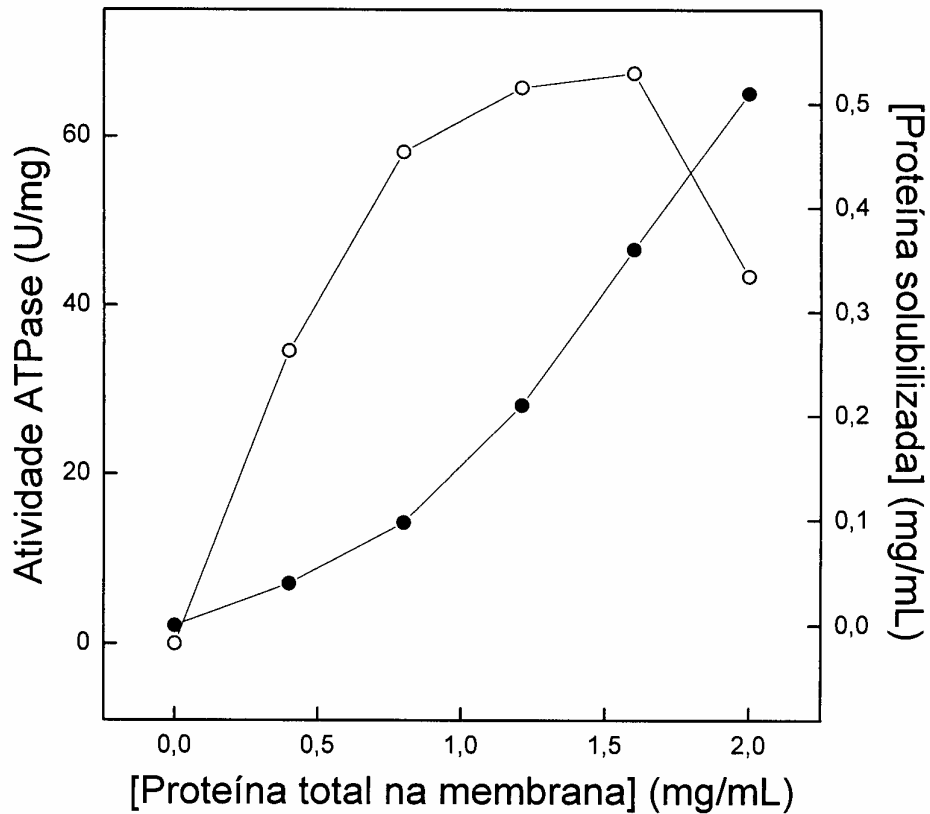


Figura 8. Efeito da concentração de proteína na solubilização da fração de membrana de *S. mutans*. Aliquotas contendo diferentes concentrações de proteína total da fração membrana foram incubadas em tampão Tris.HCl 50 mM pH 7,5, contendo MgSO₄ 10 mM e colato de sódio 50 mM por 15 minutos, a 4°C e ultracentrifugadas durante 1 hora a 100.000xg a 4°C. O sobrenadante foi analisado quanto: (○) atividade ATPase e (●) proteína solubilizada.

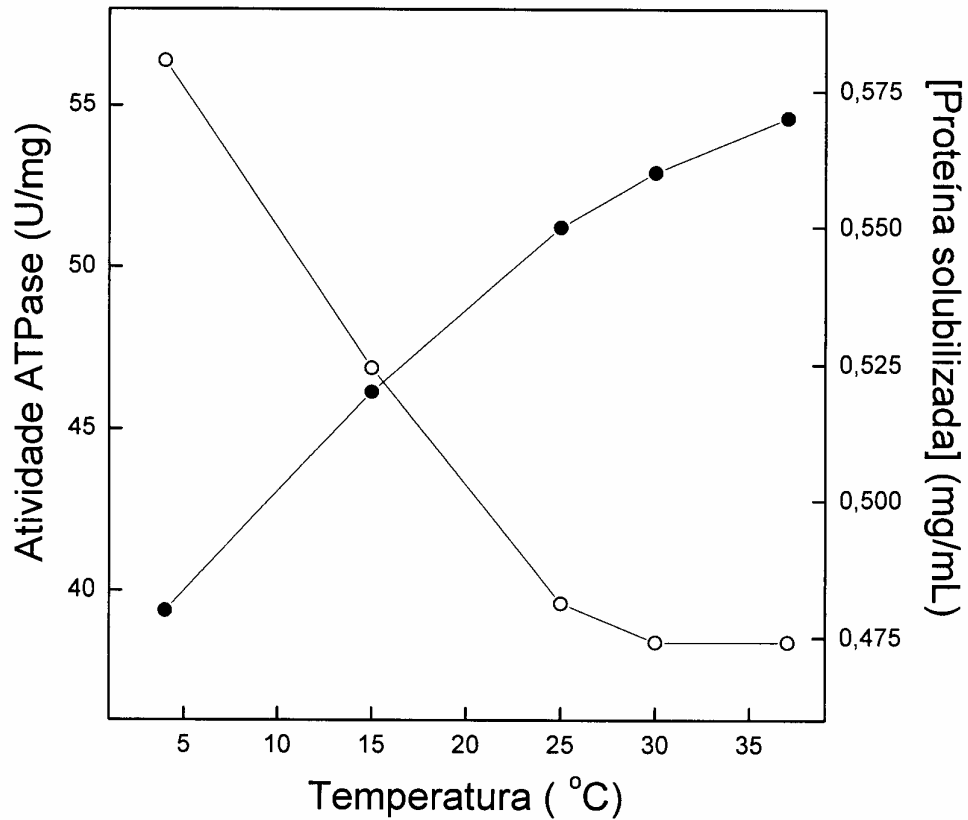


Figura 9. Efeito da temperatura de incubação na solubilização da fração de membrana de *S. mutans*. Aliquotas contendo 1,5 mg/mL de proteína total da fração de membrana, foram incubadas em tampão Tris.HCl 50 mM, pH 7,5, contendo MgSO₄ 10 mM e colato de sódio 50 mM, por 15 minutos, em diferentes temperaturas e ultracentrifugadas durante 1 hora a 100.000xg, a 4°C. O sobrenadante foi analisado quanto: (○) atividade ATPase e (●) proteína solubilizada.

Finalmente, mantendo-se a temperatura em 4°C, 1,5 mg/mL de proteína e 50 mM de detergente, foi otimizado o tempo de incubação no processo de solubilização (Figura 10). Neste caso, a concentração de proteína solubilizada aumenta concomitantemente com o aumento do tempo de incubação, mas a atividade ATPase diminuiu cerca de 30% após a primeira hora de incubação da proteína com o detergente, e partir desse período permanece praticamente constante. Assim, podemos concluir que a solubilização foi instantânea, isto é, acontece imediatamente após a simples mistura da fração de membrana com o detergente, e o aumento do tempo pode acarretar em processos de desnaturação da enzima resultando em uma inativação da atividade ATPase da proteína solubilizada.

Na condição ótima de solubilização da fração de membrana com colato de sódio 50 mM, a concentração de proteína solubilizada foi de aproximadamente 30% e a atividade ATPase ao redor de 45%. A enzima solubilizada também apresentou um pH ótimo de hidrólise de ATP entre 6,0 e 6,5 (Figura 11). É importante ressaltar que em todas as etapas do processo de otimização da solubilização o pellet ressuspensão, que correspondente à fração de membrana não solubilizada, também foi sempre analisado em relação à concentração de proteína e atividade ATPase (resultados não mostrados).

A dependência da atividade ATPase em função da concentração total de proteína solubilizada no meio reacional mostrou ser linear até aproximadamente 70 µg de proteína total no tubo, para concentrações de ATP de 5 mM. Além disso, o resultado obtido sugere que, nestas condições experimentais, as velocidades medidas são de fato velocidades iniciais, uma vez que o consumo de substrato foi menor que 5%. Quando se estudou o efeito do tempo de reação na atividade ATPase do extrato bruto solubilizado com colato de sódio 50 mM, observou-se que nos primeiros vinte minutos de reação, a liberação de fosfato inorgânico, pela hidrólise de ATP, também foi linear com um consumo de substrato sempre menor que 5% (resultados não mostrados).

Na Tabela III são mostrados os efeitos de inibidores específicos sobre a atividade ATPase da fração de membrana e do extrato bruto solubilizado com colato de sódio 50 mM.

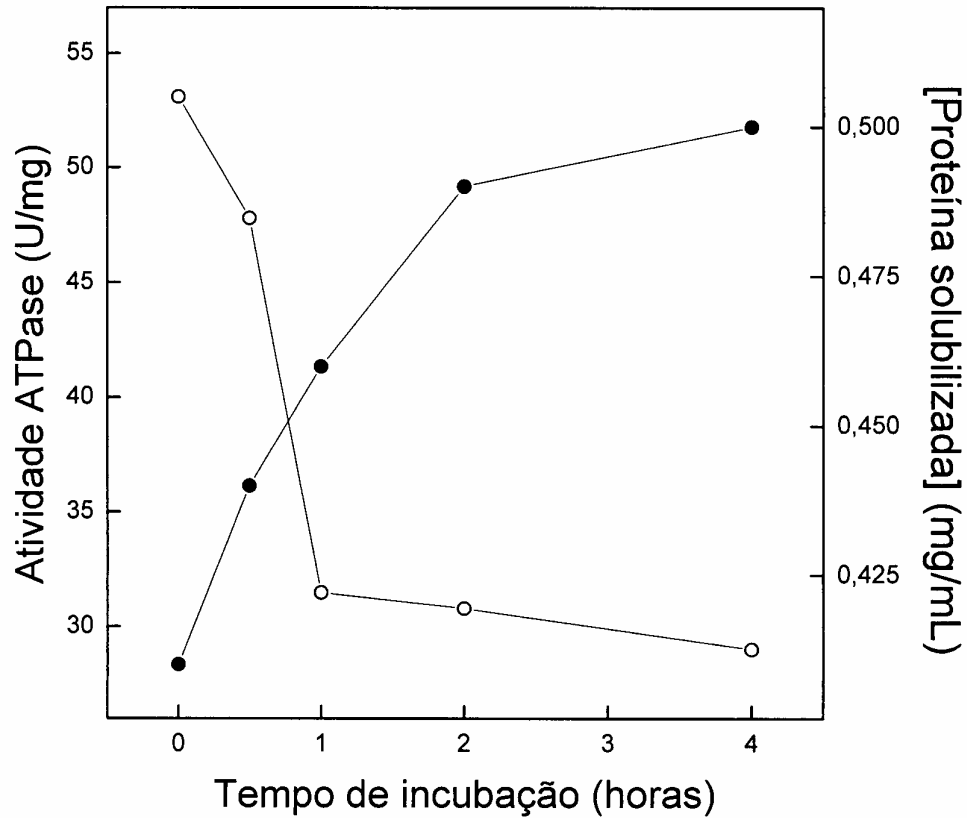


Figura 10. Efeito do tempo de incubação na solubilização da fração de membrana de *S. mutans*. Alíquotas contendo 1,5 mg/mL de fração de membrana foram incubadas em tampão Tris.HCl 50 mM pH 7,5, contendo MgSO₄ 10 mM e colato de sódio 50 mM, a 4°C, em diferentes tempos de incubação e ultracentrifugadas durante 1 hora a 100.000xg a 4°C. O sobrenadante foi analisado quanto: (○) atividade ATPase e (●) proteína solubilizada.

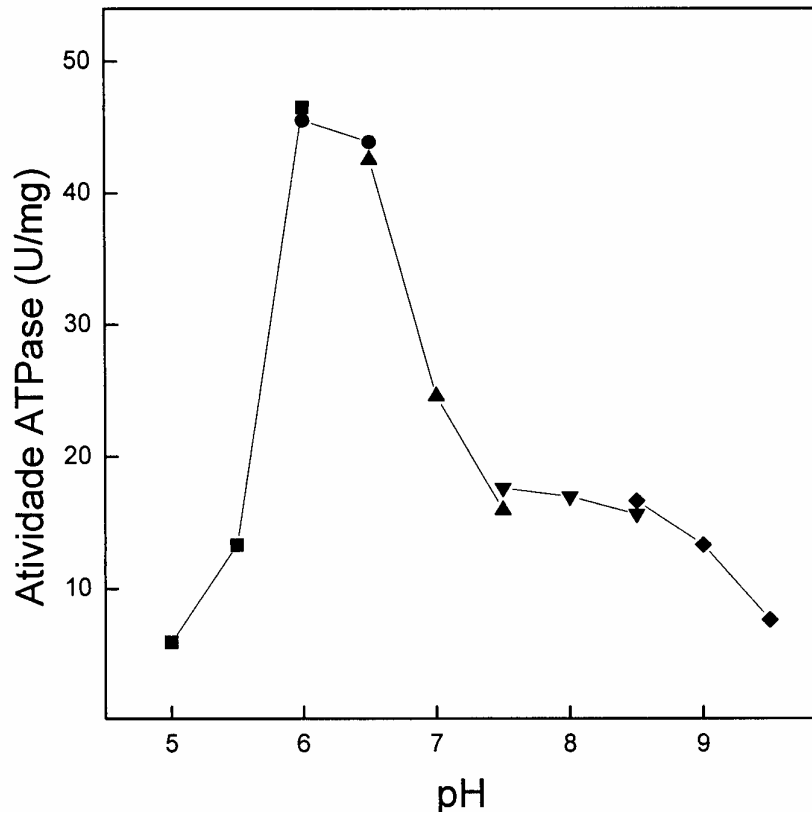


Figura 11. Determinação do pH ótimo de hidrólise de ATP pelo extrato bruto solubilizado com colato de sódio 50 mM na faixa de pH entre 5,0 e 9,5 utilizando-se os seguintes tampões: (■) MES (pH 5,0-6,0), (●) BIS-TRIS (pH 6,0-6,5), (▲) Imidazol (pH 6,5-7,5), (▼) Tris (pH 7,0-9,0) e (◆) AMPOL (pH 8,5-9,5). As atividades foram determinadas em 50 mM do tampão apropriado, contendo $MgCl_2$ 10 mM e ATP 5 mM como descrito no item 3.7 de Materiais e Métodos, utilizando-se de 20 μg de proteína.

Ortovanadato, inibidor clássico de ATPase do tipo P, inibiu 59% e 82% a atividade ATPase da fração de membrana e do extrato bruto solubilizado, respectivamente. Lansoprazol, inibidor de H^+,K^+ -ATPase, inibiu cerca de 44% da atividade ATPase presente na fração de membrana e cerca de 90% da atividade presente no extrato bruto solubilizado.

Tabela III: Ação de diversos inibidores na atividade ATPase da fração de membrana de *S. mutans* e do extrato bruto solubilizado com colato de sódio 50 mM. A atividade ATPase foi realizada conforme descrito em 3.7 de Materiais e Métodos, 100% corresponde a 120,0 U/mg e 53,9 U/mg, para fração de membrana e extrato bruto solubilizado, respectivamente.

Inibidor	Concentração	(% Inibição atividade ATPase)	
		Membrana	Extrato Solubilizado
Ortovanadato	3,0 μ M	58,9	82,4
Lansoprazol	50 μ M	44,1	91,2
Oligomicina	4,0 μ g/mL	40,4	70,1
DCCD	150 μ M	32,9	7,0
Azida de Sódio	0,1 mM	13,8	21,1
NEM	5,0 mM	8,2	45,0
Bafilomicina	2,0 μ M	66,9	78,9
Ouabaína	2,0 mM	10,2	4,4
Tapsigargina	0,1 μ M	5,6	28,2
Furosemida	2,0 mM	39,2	9,7
Ácido Etacrínico	2,0 mM	36,7	28,9

Oligomicina, inibidor de F_1F_0 -ATPase, reduziu em 40% e 70% a atividade ATPase da fração de membrana e do extrato bruto solubilizado, respectivamente. DCCD, também um inibidor do canal de prótons, bloqueador da subunidade F_0 da F_1F_0 -ATPase, inibiu aproximadamente 33% e 7% da atividade ATPase da fração de membrana e do extrato bruto solubilizado, respectivamente. Azida de sódio, outro inibidor da ATPase do tipo F, apresentou valores de inibição da atividade ATPase ordem de 13% para a

fração de membrana e 21% para o extrato bruto solubilizado. NEM, inibidor irreversível de canal de prótons, inibiu cerca de 50% a atividade ATPase do extrato bruto solubilizado e não apresentou efeito significativo para fração de membrana, enquanto bafilomicina, inibidor de V-ATPases, inibiu cerca de 70% da atividade ATPase total, tanto para fração de membrana quanto para o extrato bruto solubilizado.

Furosemida, inibidor de Na⁺-ATPase, inibiu cerca de 40% a atividade ATPase da fração de membrana e não apresentou efeito significativo no extrato solubilizado. Ácido etracrínico, inibidor de Na⁺-ATPase e K⁺-ATPase, apresentou valores de inibição da ordem de 30% tanto para a fração de membrana quanto para o extrato bruto solubilizado. Finalmente, ouabaína, inibidor específico de Na⁺,K⁺-ATPase, e tapsigargina, inibidor de Ca²⁺-ATPase, não apresentaram efeitos significativos na atividade ATPase da fração de membrana.

A eletroforese em condições desnaturantes (Figura 12) mostrou que 50 mM de colato de sódio solubiliza as proteínas presentes na fração de membrana, uma vez que os perfis eletroforéticos são praticamente similares. Nesta Figura (linha 3) também podemos observar que a banda correspondente 100 kDa é mais intensa no extrato bruto solubilizado, quando comparado com a fração de membrana, aplicando-se a mesma quantidade de proteína no gel de eletroforese.

As bandas protéicas presentes na fração de membrana também foram identificadas em gel de eletroforese através da atividade fosfomonohidrolase da amostra. Neste caso foram observadas três bandas de atividade com 100, 55 e 35 kDa (Figura 13, linha 2). Também podemos observar que somente a intensidade da banda de 100 kDa reduz significativamente quando acrescentamos 3 µM de ortovanadato no meio reacional (Figura 13, linha 3). Resultados similares foram observados na presença de 50 µM de lanzoprazol (resultados não mostrados).

O SDS-PAGE da fração de membrana extraída de *S. mutans* previamente incubada com $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP, revelada por autoradiografia, mostrou apenas a presença de uma banda para fosfoenzima, com massa molecular de aproximadamente 200 kDa (Figura 14, linha 2), a qual não foi detectada quando o experimento foi realizado na presença de ortovanadato (Figura 14,

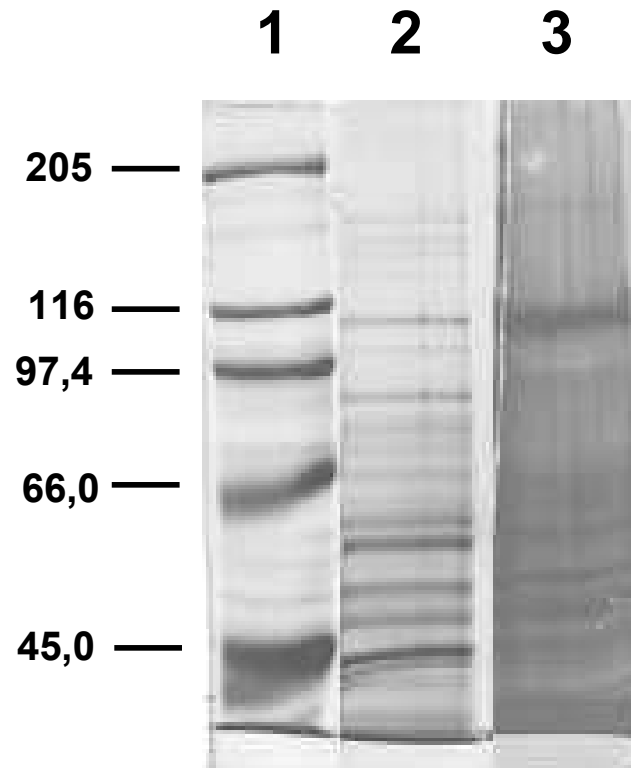


Figura 12. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes. A eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% foi realizada conforme descrito no item 3.17 de Materiais e Métodos. 1: Padrões de peso molecular (kDa); 2: Fração de membrana da *S. mutans*; 3: Extrato bruto solubilizado com colato de sódio 50 mM. Os géis foram revelados com nitrato de prata.

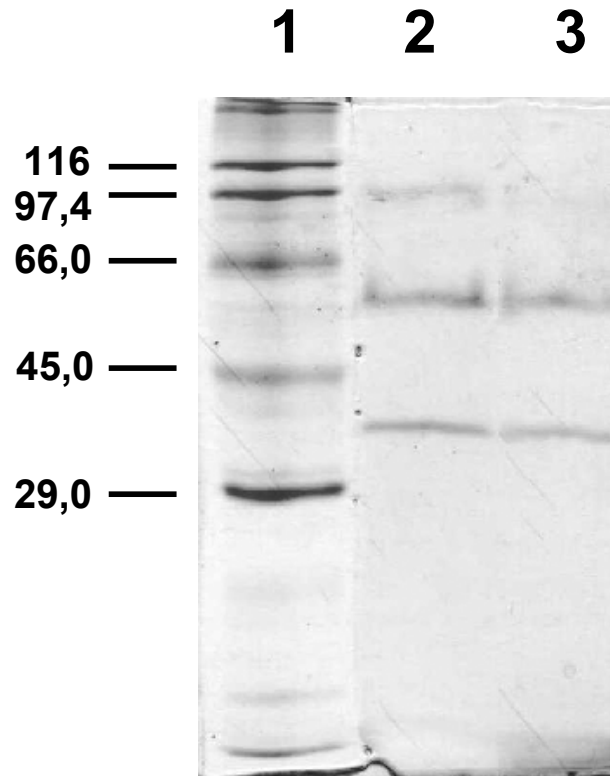


Figura 13. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes. A eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% foi realizada e as proteínas foram renaturadas conforme descrito no item 3.18 de Materiais e Métodos. 1: Padrões de peso molecular (kDa), corado com nitrato de prata; 2: A atividade fosfomonohidrolítica no gel correspondente ao extrato bruto solubilizado com colato de sódio 50 mM; 3: Atividade fosfomonohidrolítica no gel correspondente ao extrato bruto solubilizado com colato de sódio 50 mM, adicionando-se 3,0 μ M de ortovanadato no meio reacional.

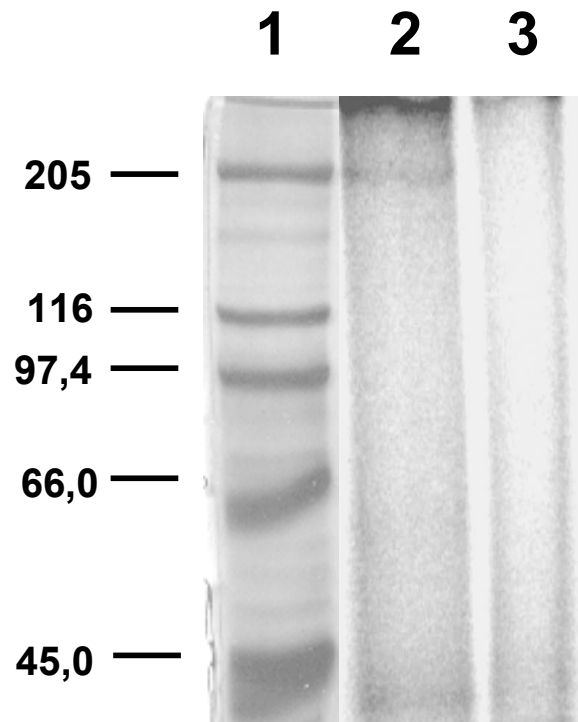


Figura 14. Eletroforese em gel de poliacrilamida 7% em condições desnaturantes. 1: Padrões de peso molecular em kDa corado com nitrato de prata; 2: Autoradiografia do intermediário fosforilado obtido conforme descrito em 3.19 de Materiais e Métodos; 3: Autoradiografia obtida na presença de 3,0 μM de ortovanadato em meio reacional.

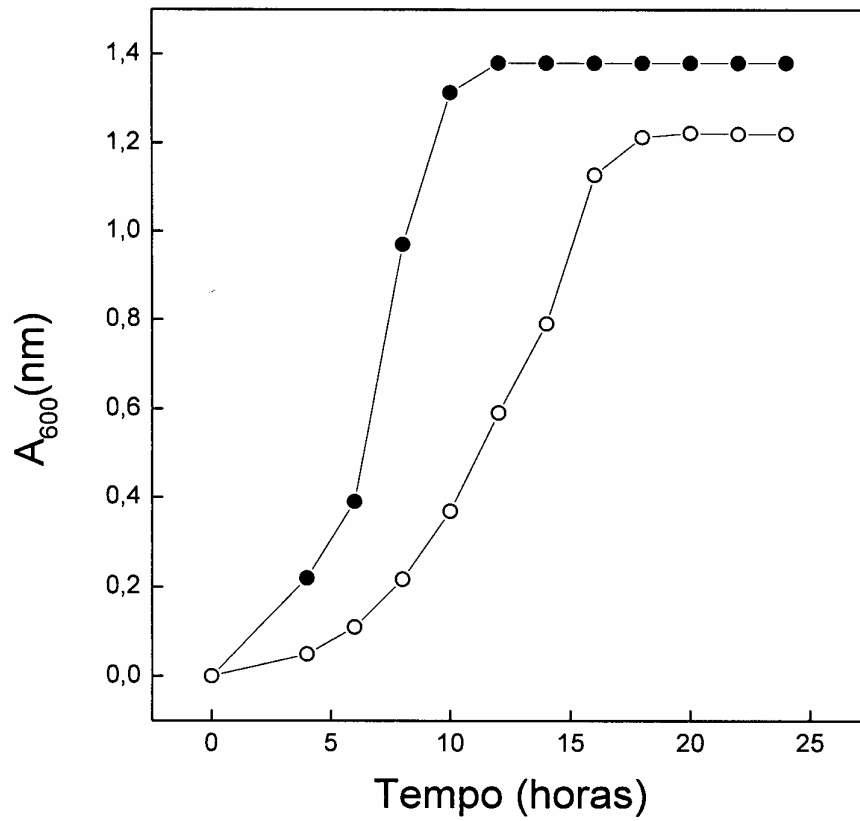


Figura 15. Curva de Crescimento da *S. mutans*. Células (ATCC 25175) foram cultivadas em: (●) meio completo e (○) meio completo contendo oligomicina 5 µg/mL conforme descrito no item 3.2 em Materiais e Métodos. Em diferentes intervalos de tempo, mediu-se a absorbância da cultura em 600 nm.

linha 3) e lansoprazol (resultados não mostrados) no meio reacional, além de uma banda que aparentemente não entra no gel e permanece no topo.

Na Figura 15 é mostrada a curva de crescimento de *S. mutans* na ausência e na presença de oligomicina 5 µg/mL em função do tempo de cultura. Para o crescimento realizado na ausência de oligomicina, foi observada uma fase inicial de quatro horas, seguida de uma fase log de 8 horas de duração e por fim a fase estacionária. Na presença de oligomicina foi observado que principalmente as fases inicial e log foram mais prolongadas quando comparadas com a curva realizada na ausência de inibidor (controle). Esse atraso observado foi de aproximadamente 8 horas e o crescimento das células na presença de oligomicina foi ligeiramente menor (cerca de 10 %). Em ambas as condições ocorrem uma diminuição do pH concomitantemente com o crescimento da bactéria. Além disso, a acidificação também foi cerca de 10% menor na presença de oligomicina no meio de cultura (Figura 16), mantendo o mesmo atraso de 8 horas observado para a o crescimento das culturas.

A Tabela IV mostra os níveis de atividade ATPase do tipo P e F presente nas frações de membrana de *S. mutans*, durante o crescimento em meio completo ou meio completo na presença 5 µg/mL de oligomicina, obtidas em diferentes fases de cultura. Vale a pena ressaltar que, em todas as preparações foram utilizados o mesmo peso úmido de células, com o objetivo de se obter concentrações protéicas semelhantes em todas as preparações de fração de membrana, onde foram determinadas as atividades do tipo P e F, utilizando-se inibidores específicos no meio reacional conforme detalhado em Materiais e Métodos (na presença de 4 µg/mL de oligomicina determinou a atividade ATPase do tipo P e na presença de 3 µM de ortovanadato a atividade do tipo F).

A atividade ATPase específica da curva de crescimento controle aumenta 100% da fase inicial para a fase estacionária. Em ambas as curvas de crescimento, a atividade ATPase do tipo F contribui com 68%, 45% e 35% da atividade ATPase total nas fases inicial, log e estacionária, respectivamente, enquanto que a atividade do tipo P contribui com 32%, 47% e 63% da atividade ATPase total nas mesmas fases. Um comportamento similar foi obtido quando a atividade específica da célula (atividade ATPase/mg célula úmida) foi

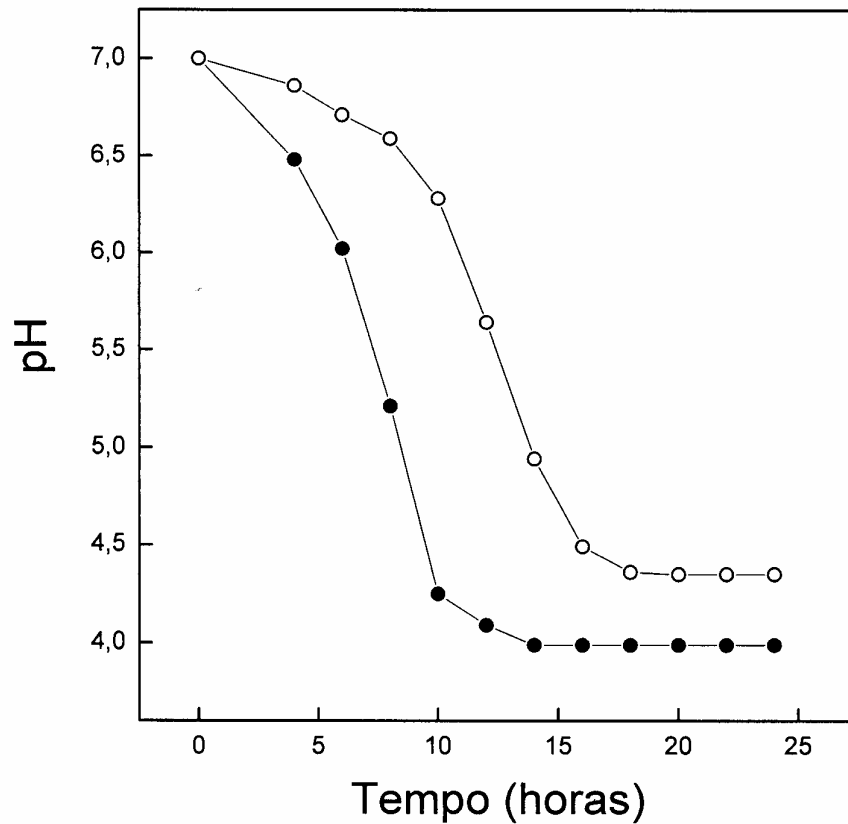


Figura 16. Variação de pH no meio de cultura durante o crescimento de *S. mutans*. Células (ATCC 25175) foram cultivadas conforme descrito no item 3.2 em Materiais e Métodos e em diferentes intervalos de tempo, mediu-se o pH do meio de cultura. (●) meio completo e (○) meio completo contendo oligomicina 5 µg/mL.

analisada.

A atividade ATPase total das membranas das células cultivadas na presença de oligomicina foi de até 60% menor, a qual refletiu nas atividades específicas do tipo P e F, quando comparadas com as obtidas em meio completo (Tabela IV). Pode ser enfatizado que, dentro destas condições, a atividade ATPase do tipo F permanece praticamente constante durante a curva de crescimento, correspondendo cerca de 40% da atividade ATPase total nas fases inicial, log e estacionária, enquanto que a atividade ATPase do tipo P aumenta cerca de 60% na fase estacionária, quando comparado com a fase inicial. Observações similares foram observadas quando se analisou a atividade específica por peso de célula, comprovando que o processo de extração aparentemente não está afetando ou inativando as atividades ATPase do tipo P e F.

Tabela IV: Níveis de atividade ATPase do tipo F e P presente nas frações de membrana de *Streptococcus mutans* durante crescimento em meio completo ou meio completo na presença de 5 µg/mL de oligomicina. As frações de membrana foram isoladas em diferentes intervalos de tempo, partindo-se de uma mesma massa úmida conforme descrito no item 3.3 em Materiais e Métodos. As dosagens de proteína e as atividades foram determinadas conforme descrito em 3.5 e 3.7 de Materiais e Métodos, respectivamente.

Condição de Crescimento	Cultura (horas)	Proteína (mg/mL)	Atividade ATPase					
			Total		Tipo F		Tipo P	
			U/mg Proteína	U/mg Célula	U/mg Proteína	U/mg Célula	U/mg Proteína	U/mg Célula
Controle	6	3,33±0,07	88,2 ± 1,8	9,0 ± 0,19	60,3 ± 1,1	6,2 ± 0,09	28,3 ± 0,4	2,9 ± 0,05
	10	3,13±0,06	164,3 ± 3,3	15,6 ± 0,12	73,6 ± 1,3	6,4 ± 0,21	78,0 ± 0,9	7,4 ± 0,04
	14	2,93±0,06	167,8 ± 3,2	14,5 ± 0,21	58,9 ± 0,9	5,0 ± 0,09	106,2 ± 1,8	9,2 ± 0,06
Oligomicina (5 µg/mL)	10	1,72±0,04	73,6 ± 1,5	6,3 ± 0,12	33,8 ± 0,6	2,9 ± 0,06	35,2 ± 0,7	3,0 ± 0,04
	18	2,53±0,08	65,3 ± 1,1	5,4 ± 0,14	24,1 ± 0,3	2,0 ± 0,03	41,6 ± 0,8	3,5 ± 0,04
	24	3,11±0,05	89,6 ± 1,7	7,6 ± 0,17	33,9 ± 0,4	2,9 ± 0,05	57,8 ± 0,9	4,9 ± 0,05

Devido aos baixos valores de rendimento em proteína e atividade ATPase (tipo P), bem como a relativa instabilidade da enzima solubilizada, executamos a caracterização cinética da ATPase do tipo P na fração de membrana de *S. mutans*. Para esta finalidade efetuamos os ensaios de cinética na presença de 4 µg/mL de oligomicina (inibidor de atividade do tipo F). Deve ser ressaltado

que e a adição de 3 μM de ortovanadato no mesmo meio reacional inibe a atividade ATPase remanescente.

O pH ótimo obtido para hidrólise de ATP da ATPase tipo P presente na fração de membrana foi 6,0, como mostrado na Figura 17.

O efeito da concentração de ATP (Figura 18) na atividade ATPase do tipo P presente na fração de membrana em pH 6,0, na presença de concentrações saturantes de Mg^{2+} (10 mM), revelou dois sítios de hidrólise para ATP: um sítio de alta afinidade ($K_{0,5} = 0,27$ mM) e um sítio de baixa afinidade ($K_{0,5} = 3,3$ mM), ambos com efeitos cooperativos, que correspondem aproximadamente a 25% e 75% da atividade ATPase total, respectivamente (Tabela V). Concentrações acima de 10 mM de ATP inibiram a atividade ATPase (resultados não mostrados).

Tabela V: Parâmetros cinéticos da hidrólise do ATP e Mg^{2+} -ATP pela ATPase do tipo P obtida de *S. mutans*, em meio reacional tamponado com BIS-TRIS 50 mM, pH 6,0, contendo oligomicina 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e diferentes concentrações de íons conforme descrito em 3.22 de Materiais e Métodos. A reação foi iniciada pela adição de 40 μg de proteína total de membrana.

Sítio de Afinação	Parâmetros para ATP			Parâmetros para Mg^{2+} -ATP		
	$K_{0,5}$ (mM)	V_M (U/mg)	n	$K_{0,5}$ (mM)	V_M (U/mg)	n
Alta	0,27 \pm 0,008	18,3 \pm 0,4	1,7	0,10 \pm 0,002	17,4 \pm 0,5	2,4
Baixa	3,31 \pm 0,062	73,8 \pm 1,5	2,8	2,12 \pm 0,042	67,6 \pm 2,4	1,5

Concentrações equimolares de ATP e Mg^{2+} mostraram um comportamento similar ao observado para concentrações saturantes de Mg^{2+} (Figura 19), onde efeitos cooperativos também foram observados (Tabela V). Vale a pena ressaltar que também se observou inibição da atividade ATPase para concentrações de Mg^{2+} -ATP acima de 10 mM (resultados não mostrados).

Na Tabela VI estão mostrados os parâmetros cinéticos para estimulação da atividade ATPase do tipo P da fração de membrana de *S. mutans* pelos íons estudados. Vale a pena ressaltar que os íons Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} e Al^{3+} em concentrações de 0,1 mM a 100 mM, não afetaram significativamente

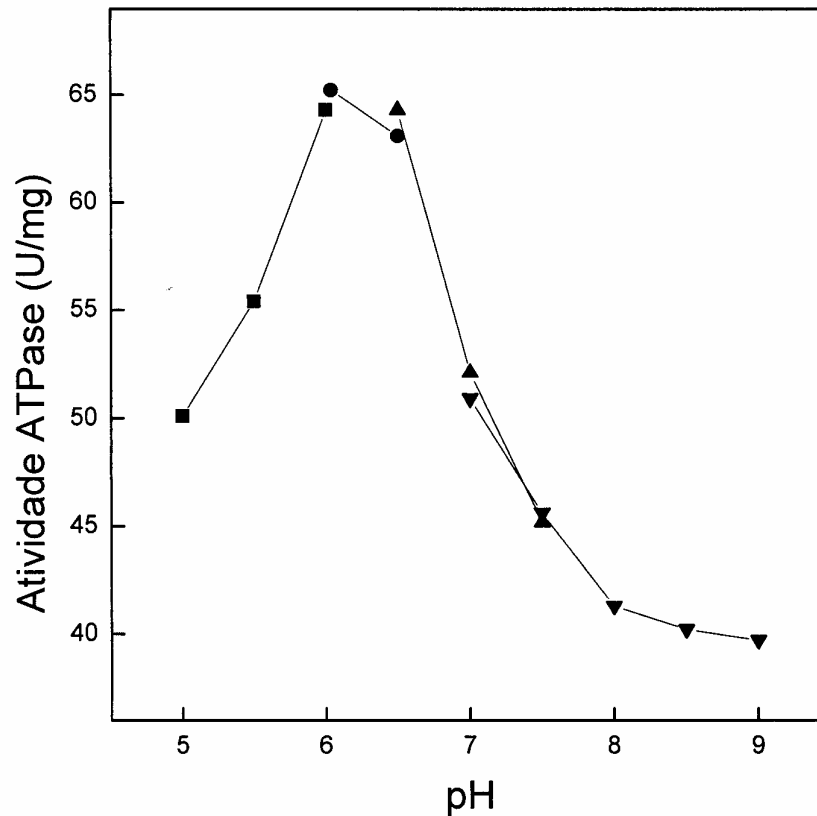


Figura 17. Determinação do pH ótimo de hidrólise de ATP da ATPase do tipo P obtida de *S. mutans* na faixa de pH entre 5,0 e 9,5 utilizando-se os seguintes tampões: (■) MES (pH 5,0-6,0), (●) BIS-TRIS (pH 6,0-6,5), (▲) Imidazol (pH 6,5-7,5) e (▼) Tris (pH 7,0-9,0). As atividades foram determinadas em 50 mM do tampão apropriado, contendo $MgCl_2$ 10 mM, ATP 5 mM e oligomicina 4 $\mu g/mL$. A reação foi iniciada pela adição de 50 μg de proteína.

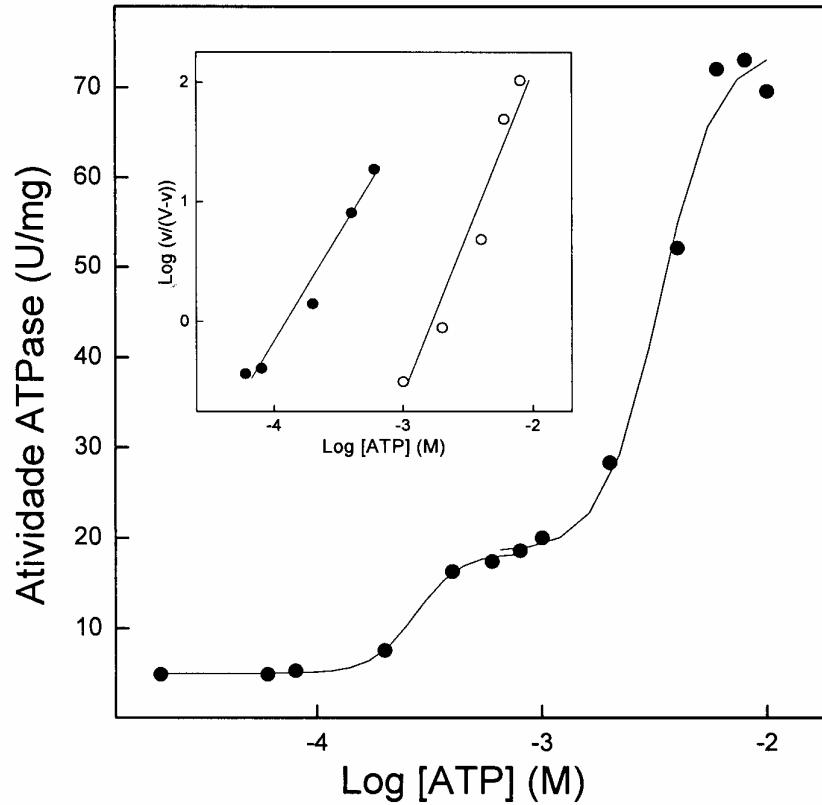


Figura 18. Efeito da concentração de ATP na atividade ATPase do tipo P obtida da fração de membrana de *S. mutans*. A reação foi efetuada em tampão BIS-TRIS 50 mM, pH 6,0, contendo $MgCl_2$ 10 mM e oligomicina 4 $\mu g/mL$. A reação foi iniciada pela adição de 50 μg de proteína. Inserção: Representação de Hill para interação do substrato com a enzima: (●) sítios de alta afinidade (○) sítios de baixa afinidade.

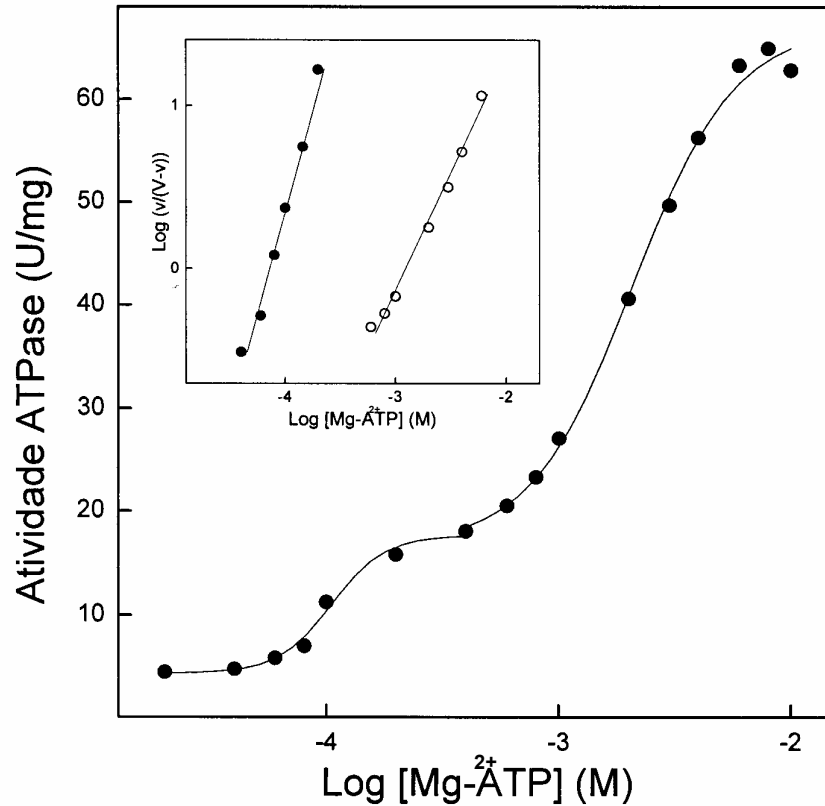


Figura 19. Efeito da concentração de Mg-ATP na atividade ATPase do tipo P obtida da fração de membrana de *S. mutans*. A reação foi efetuada em tampão BIS-TRIS 50 mM, pH 6,0, contendo oligomicina 4 $\mu\text{g/mL}$. A reação foi iniciada pela adição de 50 μg de proteína. Inserção: Representação de Hill para interação do substrato com a enzima: (●) sítios de alta afinidade (○) sítios de baixa afinidade.

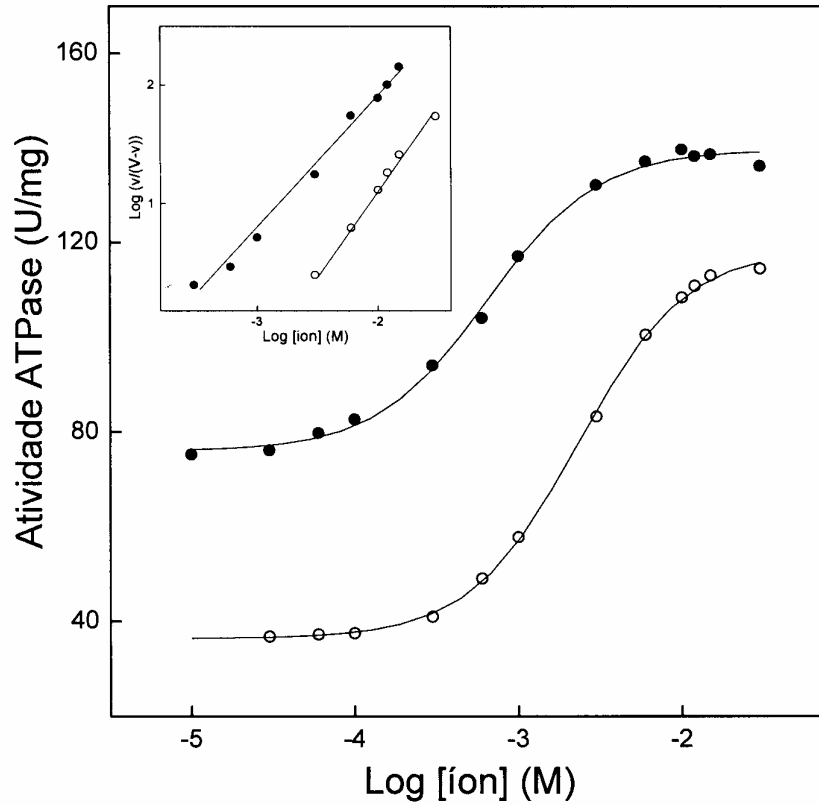


Figura 20. Efeito da concentração dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} na atividade ATPase do tipo P obtida da fração de membrana de *S. mutans*. A reação foi efetuada em tampão BIS-TRIS 50 mM, pH 6,0, contendo ATP 5 mM, MgCl_2 10 mM e oligomicina 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A reação foi iniciada pela adição de 50 μg de proteína. Inserção: Representação de Hill para os resultados obtidos: (●) Ca^{2+} e (○) Mg^{2+} .

(variação de mais ou menos 5%) a atividade ATPase.

A dependência da concentração de Mg^{2+} na atividade ATPase do tipo P da fração de membrana na presença de concentrações saturantes de ATP (5 mM) apresentou uma única curva de saturação (Figura 20). Aumentando-se a concentração de íons magnésio de 0,1 mM a 100 mM a atividade ATPase é estimulada, atingindo V_M de 116 U/mg, exibindo efeitos cooperativos ($n= 1,4$, inserção Figura 20) e $K_{0,5}= 2,2$ mM (Tabela VI). Excesso de íons magnésio (acima de 50 mM) inibem a atividade ATPase (resultados não mostrados).

Na Figura 20 é mostrado o efeito dos íons cálcio na atividade ATPase da fração de membrana na presença de concentrações saturantes de ATP (5 mM) e Mg^{2+} (10 mM). Aumentando-se a concentração de íons cálcio de 0,1 mM a 100 mM observamos uma estimulação da atividade ATPase (140 U/mg), exibindo efeitos cooperativos ($n= 1,1$, inserção Figura 20) e $K_{0,5}= 0,6$ mM (Tabela VI). Excesso de íons cálcio (50mM) inibiram a atividade ATPase (resultados não mostrados).

Tabela VI: Parâmetros cinéticos de estimulação da atividade ATPase do tipo P pelos íons Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} sob diferentes condições experimentais. O meio reacional foi tamponado com BIS-TRIS 50 mM, pH 6,0, contendo ATP 5 mM e oligomicina 4 μ g/mL, variando-se a concentração de íons metálicos conforme descrito em Materiais e Métodos. A reação foi iniciada pela adição de 40 μ g de proteína total de membrana.

íon	Parâmetros Cinéticos		
	$K_{0,5}$ (mM)	V_M (U/mg)	n
Na^+	0,26±0,005	96,8±1,6	1,2
K^+	0,21±0,003	128,4±3,1	1,8
NH_4^+	3,6±0,041	115,5±3,7	1,2
Ca^{2+}	0,6±0,013	139,7±2,9	1,1
Mg^{2+}	2,2±0,037	116,7±2,5	1,4

O efeito dos íons potássio na atividade ATPase (tipo P) da fração de membrana obtida de *S. mutans* está mostrado na Figura 21. Em concentrações saturantes de ATP (5 mM) e íons magnésio (10 mM), a

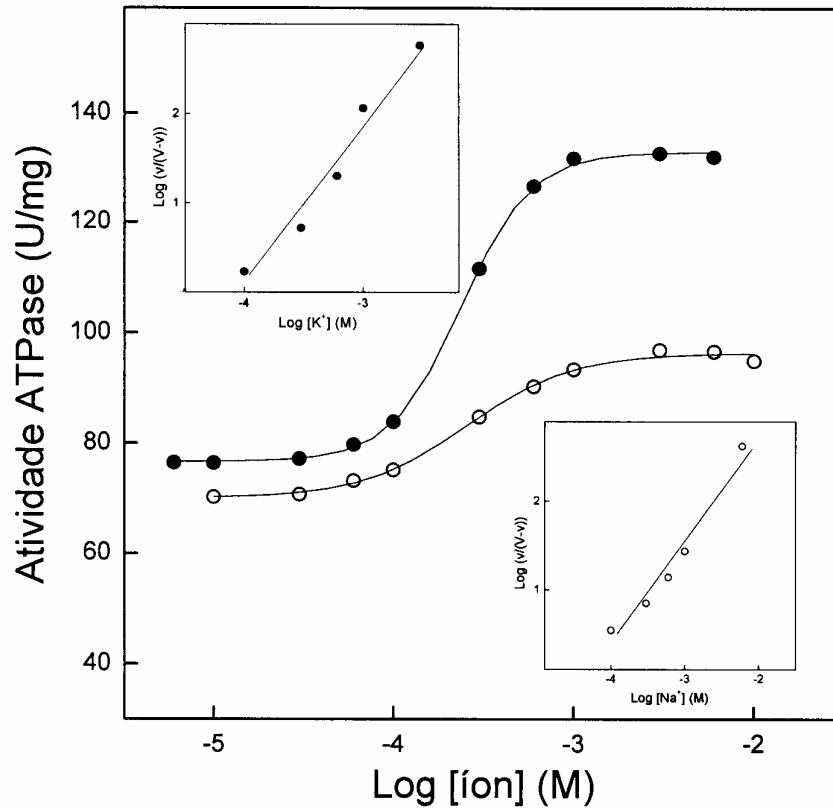


Figura 21. Efeito da concentração dos íons K^+ e Na^+ na atividade ATPase do tipo P obtida da fração de membrana de *S. mutans*. A reação foi efetuada em tampão BIS-TRIS 50 mM, pH 6,0, contendo ATP 5 mM, $MgCl_2$ 10 mM e oligomicina 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A reação foi iniciada pela adição de 50 μg de proteína. Inserção: Representação de Hill para os resultados obtidos: (●) K^+ e (○) Na^+ .

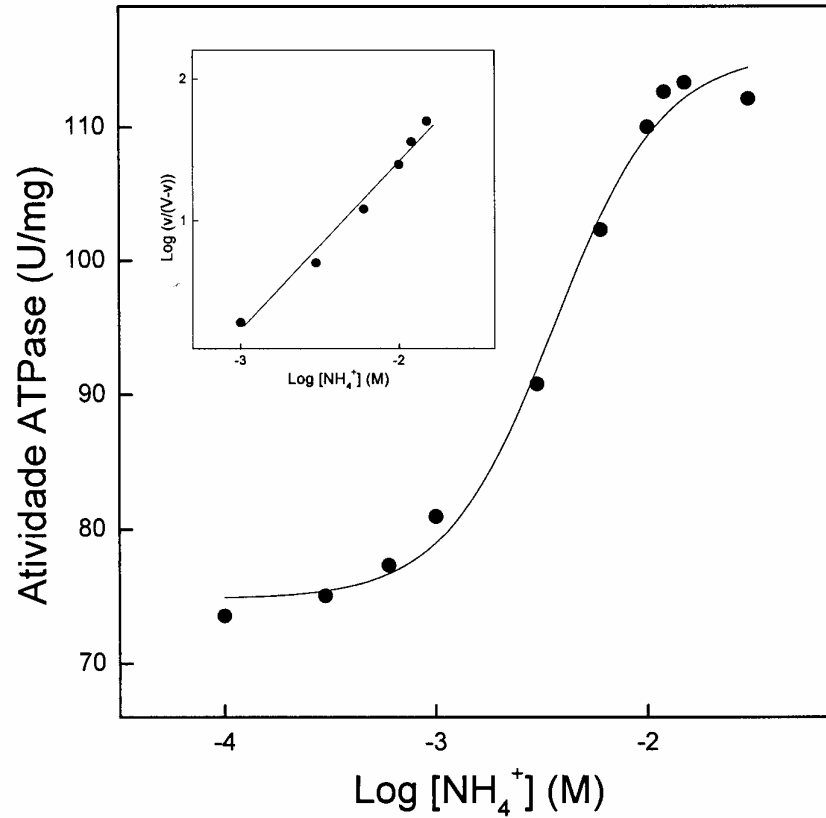


Figura 22. Efeito da concentração do íon NH_4^+ na atividade ATPase do tipo P obtida da fração de membrana de *S. mutans*. A reação foi efetuada em tampão BIS-TRIS 50 mM, pH 6,0, contendo ATP 5 mM, MgCl_2 10 mM e oligomicina 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A reação foi iniciada pela adição de 50 μg de proteína. Inserção: Representação de Hill para os resultados obtidos.

atividade ATPase foi estimulada por íons potássio apresentando uma única curva de saturação com $V_M = 128$ U/mg e $K_{0,5} = 0,21$ mM, também exibindo efeitos cooperativos ($n = 1,8$, inserção Figura 21).

Sob concentrações saturantes de ATP (5mM) e Mg^{2+} (10 mM), a atividade ATPase do tipo P também foi estimulada por íons sódio (Figura 21). Efeitos cooperativos foram observados e a hidrólise de ATP apresentou uma única curva de saturação com $V_M = 97$ U/mg e $K_{0,5} = 0,26$ mM (Tabela VI).

A ATPase do tipo P foi estimulada por íons amônio em concentrações saturantes de ATP e Mg^{2+} (Figura 22), apresentando uma única curva de saturação com $V_M = 115$ U/mg e $K_{0,5} = 3,6$ mM, exibindo efeitos cooperativos (inserção Figura 22 e Tabela VI).

Os efeitos de EDTA e íons zinco na atividade ATPase do tipo P são mostrados na Figura 23. Para íons zinco obtivemos uma única curva de inibição, apresentando $K_{0,5}$ de aproximadamente 0,05 mM. EDTA inibiu fortemente a atividade ATPase do tipo P da enzima (sendo 1 μ M suficiente para inibir aproximadamente 65% da atividade ATPase do tipo P), também exibindo uma única curva de inibição apresentando $K_{0,5}$ de aproximadamente 0,1 mM.

O efeito de inibidores específicos sobre a atividade ATPase do tipo P da fração de membrana de *S. mutans*, ou seja, na presença de 4 μ g/mL de oligomicina no meio reacional contendo ATP 5 mM e $MgCl_2$ 10 mM, está sumarizado na Tabela VII. Ortovanadato e lanzoprazol, inibidores de ATPase do tipo P e de H^+, K^+ -ATPase, respectivamente, inibiram praticamente toda a atividade ATPase do tipo P presente na fração de membrana obtida de *S. mutans*. Já, os baixos valores de inibição da atividade ATPase do tipo P obtidos para ouabaína, tapsigargina, furosemida e ácido etacrínico sugerem que a fração de membrana obtida de *S. mutans* não apresenta contaminações por $Na^+ - K^+$, Ca^{2+} , Na^+ e K^+ -ATPase. DCCD e NEM (bloqueadores de canal de prótons) inibiram a atividade ATPase do tipo P em 24,8 % e 61,0% respectivamente, enquanto que a bafilomicina inibiu 83,2%. Baixas concentrações de DMSO ou etanol não afetaram a atividade ATPase do tipo P (resultados não mostrados).

Finalmente, células obtidas com 12 horas de cultivo em meio completo (fase estacionária) foram analisadas em microscópio de fluorescência

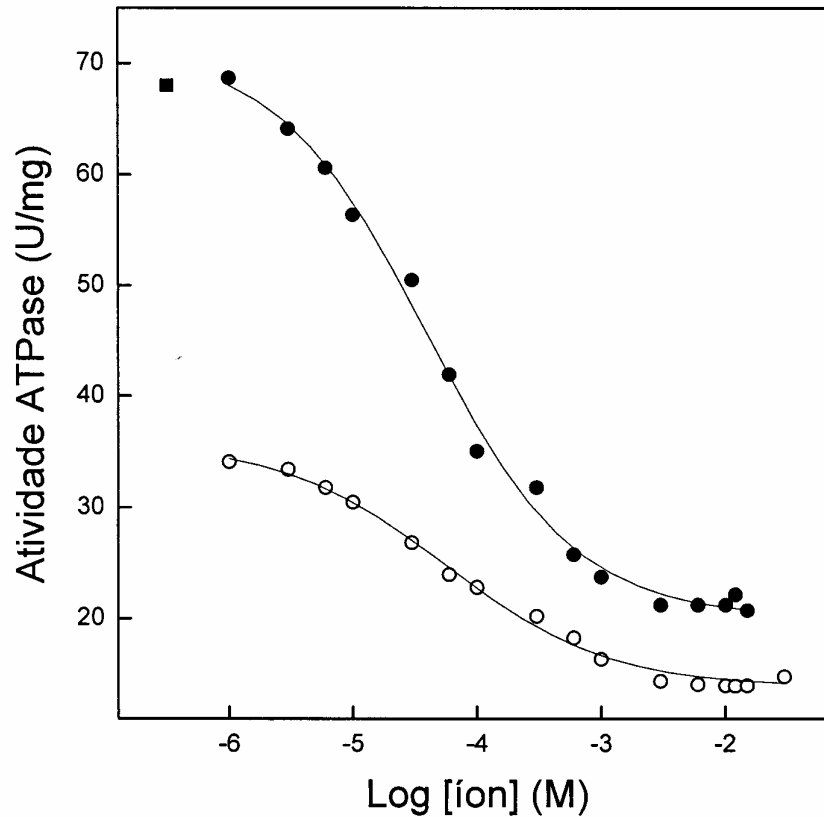


Figura 23. Efeito da concentração de Zn^{2+} e EDTA na atividade ATPase do tipo P obtida da fração de membrana de *S. mutans*. A reação foi efetuada em tampão BIS-TRIS 50 mM, pH 6,0, contendo $MgCl_2$ 10 mM e oligomicina 4 $\mu g/mL$. A reação foi iniciada pela adição de 50 μg de proteína. Inserção: Representação de Hill para os resultados obtidos: (●) Zn^{2+} e (○) EDTA. (■) Atividade ATPase em meio reacional na ausência de Zn^{2+} e EDTA (Controle).

utilizando-se alaranjado de acridina como corante, conforme detalhado no item 3.25 de Materiais e Métodos. Observa-se na imagem (Figura 24) cocos enfileirados em cadeia, característico de estreptococos, tanto com emissão de fluorescência verde, indicando que o pH intracelular está neutro, quanto vermelha, indicando que o pH está ácido.

Tabela VII: Efeito de diferentes inibidores na atividade ATPase do tipo P da fração de membrana de *S. mutans* na presença de oligomicina 4 µg/mL. A atividade ATPase foi realizada conforme descrito em 3.7 de Materiais e Métodos, sendo que 100% corresponde a 72,0 U/mg.

Inibidores	Concentração	Inibição (%)
Ortovanadato	3 µM	98,1
Lanzoprazol	50 µM	87,3
DCCD	150 µM	24,8
NEM	5 mM	61,0
Azida de Sódio	0,1 mM	5,3
Ouabaína	2,0 mM	5,0
Tapsigargina	0,1 µM	8,0
Furosemida	2,0 mM	2,7
Acido Etacrinico	2,0 mM	1,1
Bafilomicina	2,0 µM	83,2

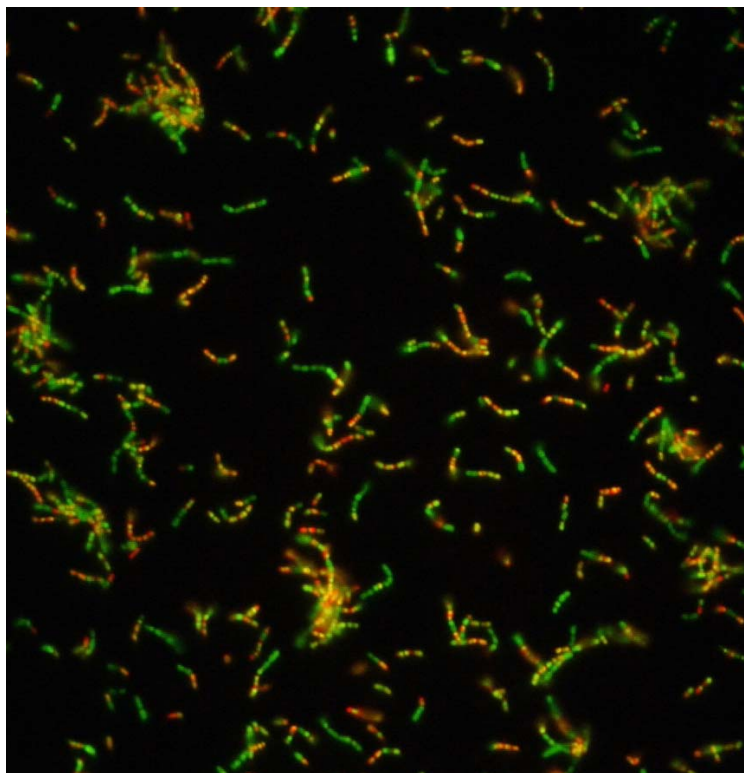


Figura 24. Microscopia de fluorescência de células de *S. mutans* obtidas em 12 horas de cultivo na presença de alaranjado de acridina 50 $\mu\text{g/mL}$ como descrito no item 3.25 de Materiais e Métodos.

5. DISCUSSÃO

Cáries dentais são resultantes da desmineralização do dente, principalmente do esmalte e da dentina, por ácidos produzidos pela fermentação de açúcares em bactérias. Um grupo de bactérias orais conhecido como *Streptococcus*, é indicado como agente etiológico primário de cáries dentais humanas. Dentro deste grupo, *Streptococcus sobrius* e especialmente *Streptococcus mutans* são as espécies mais comumente isoladas de humanos (Loesche, 1986).

Sabe-se que a extrusão citoplasmática dos prótons provenientes do metabolismo de *S. mutans* depende, pelo menos em parte, de ATPases localizadas na membrana plasmática, que seriam as responsáveis pela acidificação do meio externo, mantendo o pH intracelular neutro. Estas enzimas, à custa da hidrólise de ATP, transportam de maneira efetiva os prótons para fora da membrana da bactéria, viabilizando assim o seu crescimento (Heefner, 1982; Andersen e Vilsen, 1990; Belli e Marquis, 1991; Carafoli; 1991; Hamilton e Buckley, 1991; Inesi e Kirtley, 1992; Vigneron et al., 1995; Köhler et al., 1995; Takahashi et al., 1997; Quivey et al., 2000).

Apesar da F_1F_0 -ATPase ter sido amplamente estudada e descrita como a principal responsável por esse transporte ativo de prótons, os mecanismos envolvidos no crescimento desta bactéria ainda não foram totalmente elucidados (Takahashi et al., 1997).

Estudos recentes sugerem fortemente a existência de outra ATPase translocadora de H^+ e/ou outro mecanismo alternativo que mantenha o pH citosólico em pelo menos duas unidades acima do pH extracelular durante o crescimento da *S. mutans*. De fato, estudos mostram que mutações na subunidade β da F_1F_0 -ATPase, acarretaram em uma significativa redução da sua atividade ATPase (50% da atividade F_1F_0 -ATPase total), e não inviabiliza o crescimento da bactéria, apresentando apenas um atraso no crescimento quando comparado com a cepa selvagem. A atividade ATPase total nestas células também foi inibida em somente 50% usando DCCD, inibidor de canal de prótons (Suzuki et al., 2000). Uma possível alternativa para o crescimento da *S. mutans* nessas condições, seria a presença de outra H^+ -ATPase (possivelmente tipo P) como mecanismo alternativo de eliminação dos prótons intracelulares produzidos pelo metabolismo anaeróbico deste microorganismo.

É importante ressaltar que a maioria dos estudos sobre ATPases de membrana de *S. mutans* estão relacionados com a atividade total da fração de membrana, isto é, um somatório de atividades (tipo P e F), com exceções aos poucos estudos realizados com ATPase do tipo F de *S. mutans* purificada (Sutton e Marquis, 1987). Além disso, devido a carência de literatura sobre a presença de H⁺-ATPase (tipo P) realizando a extrusão de prótons na membrana plasmática de bactérias, será feita uma comparação com as bombas de prótons bem descritas para fungos e plantas, ou com outras ATPases do tipo P.

Quando uma determinada bactéria é inoculada num meio líquido de composição apropriada e incubada em temperatura adequada, o seu crescimento segue uma curva característica e definida (Daneo-Moore et al., 1975). De fato, as culturas de *S. mutans* em meio completo apresentaram um comportamento sigmoidal com três fases definidas (Figura 1). Realizamos a cultura em meio tamponado com MOPS 50 mM, pH 7,0 ou não tamponado, uma vez que o pH do meio de cultura é um fator importante para a atividade enzimática, e que de maneira geral, o pH intracelular neutro é requerido para o melhor desenvolvimento da cultura, em termos de velocidade de crescimento das células (Cadwell, 1995).

Na Figura 1 podemos observar que a bactéria cultivada em meio tamponado cresceu cerca de 40% a mais quando comparada com a cultivada em meio não tamponado. Isso provavelmente ocorre porque sua divisão celular, bem como a produção de ácidos provenientes de seu metabolismo anaeróbico pode ser bloqueada, dependendo do tempo que a cultura de *S. mutans* permanece em valores de pH baixo (Takahashi et al., 1997). Além disso, observamos um decréscimo menos acentuado do pH em meio tamponado quando comparado com o meio não tamponado, durante o crescimento da bactéria. Esse comportamento ocorreu principalmente na fase log, fase onde ocorre a divisão celular numa velocidade máxima. Na fase estacionária, a capacidade tamponante do MOPS provavelmente está baixa, fazendo com que os meios de cultura, tamponado e não tamponado, atinjam o mesmo valor de pH (Figura 2).

Uma vez otimizadas as condições de crescimento das células, utilizamos o procedimento descrito por Bender et al. (1986) para extração das frações de

membrana. Foram adaptados alguns tampões e condições de trabalho, com o objetivo de obter as frações de membrana em sua forma mais ativa, estável e livre de parede celular (Magalhães et al., 2003). Esta metodologia requer o uso de lisozima na presença de tiocianato de sódio para a eficiente remoção da parede celular, uma vez que Goodman et al. (1981) descreveram que a atividade desta enzima aumenta na presença destes sais inorgânicos.

Assim, estudamos a atividade ATPase das frações extraídas de células obtidas em diferentes tempos de cultura. As frações de membrana que apresentaram maiores valores de atividade ATPase foram extraídas de células obtidas na fase estacionária de crescimento, ou seja, com 12 horas em meio não tamponado (Tabela I). Este fato provavelmente está relacionado com a maior diferença de concentração de H^+ existente entre o meio intra e o extracelular para culturas em meio não tamponado, quando comparado com o meio tamponado (Figura 2), necessitando de uma maior atividade do transporte ativo primário ou de um número maior de moléculas de enzima para efetuar o transporte. Vale a pena ressaltar que experimentos de biologia molecular poderão confirmar esta segunda hipótese.

Em função destes resultados, o tempo de cultura para se obter frações de membrana de *S. mutans* ricas em atividade ATPase foi estimado em 12 horas, para células cultivadas em meio não tamponado, correspondendo portanto a fase final de crescimento de *S. mutans*. De fato, quando analisamos as células obtidas nesta fase por microscopia de fluorescência (Figura 24), podemos observar células com coloração amarelas e vermelhas, indicando assim a presença de células mortas.

Com o resultado obtido da centrifugação da preparação da fração de membrana da enzima em gradiente de sacarose (Figura 5), podemos sugerir que a fração de membrana obtida na presente metodologia encontra-se relativamente homogênea, pois apresentou um pico protéico predominante. Além disso, foi observado um pequeno pico que provavelmente são frações de membrana associadas à parede celular, uma vez que *S. mutans* é uma bactéria Gram positiva.

Na tentativa de se solubilizar essas frações de membrana extraídas de *S. mutans*, empregamos várias classes de detergentes, uma vez que a escolha correta do detergente é o primeiro passo para uma solubilização eficiente

(Jones, 1999; Maire et al., 2000).

Apesar do extensivo uso de detergentes na solubilização de proteínas de membrana (Yeagle, 1993; Maire et al., 2000), em relação a H⁺-ATPase, existe muito pouco na literatura relacionado a um estudo sistemático detalhado para a escolha de um detergente específico para a sua solubilização. Dentre as H⁺-ATPases do tipo P, a obtida de *N. crassa* é a mais estudada, uma vez que esta enzima foi solubilizada, purificada e reconstituída em lipossomos (Vigneron et al., 1995). Vale a pena ressaltar também que esta enzima foi solubilizada utilizando-se 15 mg/mL de lisolecitina, seguido por purificação em gradiente de densidade de glicerol, obtendo-se 97% de purificação (Smith e Scarborough, 1984).

Glucopiranosídeo, um surfactante não iônico, que possui alta CMC, o que torna fácil a sua futura remoção por diálise (Saito e Tsuchiya, 1984; Hanatani et al., 1984), quando empregado para a solubilização da fração de membrana de *S. mutans*, apresentou valores de somente 8% de recuperação da atividade ATPase (Tabela II).

Além do glucopiranosídeo, outros detergentes não iônicos tais como Triton X-100, Triton X-114 e o Tween 20 também foram empregados na solubilização da membrana obtida de *S. mutans*. Esses detergentes também possuem alta CMC e são considerados pouco desnaturantes (Jones, 1999). Dentre eles, o detergente que apresentou menor eficiência foi o Tween 20. Já o Triton X-100, quando comparado com o Triton X-114, foi mais eficiente com relação a quantidade de proteína solubilizada, mas por outro lado apresentou menor atividade ATPase (ver Tabela II).

Um exemplo da eficiência do emprego do Triton X-100, quando comparado com outros detergentes, foi descrito por Knol et al. (1998), o qual solubilizou e reconstituiu em lipossomos uma proteína transportadora de lactose de *Streptococcus thermophilus*. Além disso, Hugentobler et al. (1983) solubilizou a membrana extraída de *Streptococcus faecalis* utilizando Triton X-100 em uma concentração de 10% (p/v), obtendo 50% de solubilização das proteínas sensíveis a vanadato. Por outro lado, a presença de um anel aromático que absorve em 280 nm, impossibilita o monitoramento de proteínas durante as subseqüentes etapas de purificação, uma vez que resíduos de tirosina e triptofano, bem como as ligações peptídicas absorvem nessa mesma

faixa de comprimento de onda (Tiller et al., 1984). Por outro lado, o Triton X-114 possui a vantagem de ser facilmente removido por separação de fase induzida por temperatura (Hooper e Bashir, 1991). Os resultados obtidos (Tabela II) mostraram que o Triton X-100 e o Triton X-114 apresentaram relativa eficiência de recuperação da atividade ATPase nos ensaios de solubilização da fração de membrana de *S. mutans*.

A fração de membrana rica em atividade ATPase, quando incubada com $C_{12}E_8$ e polidocanol ($C_{12}E_9$), detergentes não iônicos, apresentou baixa solubilização em proteína para ambos detergentes. A quantidade de recuperação da atividade ATPase encontrada no extrato bruto solubilizado foi maior para polidocanol ($C_{12}E_9$) quando comparada com o $C_{12}E_8$ (Tabela II). Esta classe de detergentes, conhecida como polioxietilenos, é considerada como sendo “suaves” durante o processo de solubilização, isto é, não afetam os aspectos estruturais importantes das proteínas de membrana, e seu uso em solubilização de proteínas tem aumentado (Jones, 1999; Santos e Ciancaglini, 2000; Marie et al., 2000).

Já o SDS, um detergente iônico clássico, apresentou relativa eficiência na solubilização das frações de membrana, porém a atividade no extrato bruto solubilizado diminui cerca de 70% em um período de aproximadamente 24 horas (resultados não mostrados), o que tornou o seu uso inapropriado. Na verdade, é descrito que esse detergente solubiliza a maioria das membranas celulares, mas por outro lado, em concentrações milimolares, é um forte agente desnaturante (Jones, 1999). Outrossim, Daghasanli et al. (2004) relatou com bastante êxito o uso deste detergente nas etapas de solubilização e reconstituição de proteínas antigênicas presentes na membrana da *Pausteurella multocida*.

Detergentes zwitteriônicos a base de esteróides como CHAPS e CHAPSO, que são considerados pouco desnaturantes, também foram empregados para solubilização da fração de membrana extraída de *S. mutans*. Esses detergentes são caracterizados por possuírem uma fraca força iônica que é dependente do número de agregação e seu uso geralmente leva a uma menor inativação, quando comparados com detergentes hidrocarbônicos com o mesmo grupo cabeça hidrofílicos (Maire et al., 2000). Os resultados apresentados na Tabela II mostram que estes detergentes foram pouco

eficientes na solubilização das proteínas presentes na fração de membrana de *S. mutans*.

Colato e deoxicolato de sódio também são considerados bons agentes solubilizantes e não desnaturantes, possuindo relativamente alta CMC, o que faz com que possam ser removidos por diálise, e por isso eles são freqüentemente usados em reconstituição em lipossomos (Maire et al., 2000). Deoxicolato de sódio apresentou baixa eficiência na solubilização das proteínas presentes na fração de membranas da *S. mutans* e, por outro lado, o extrato bruto solubilizado com colato de sódio apresentou relativamente altos valores de proteína e recuperação da atividade ATPase presente no extrato bruto solubilizado, além da enzima se apresentar relativamente estável quando armazenado a -20°C (Figura 6). Assim, os resultados obtidos na tentativa de solubilização da fração de membrana de *S. mutans*, sugerem que, dentre os detergentes utilizados, o colato de sódio é o mais adequado (Tabela II).

Para se obter uma alta eficiência na solubilização de proteínas de membrana, uma vez escolhido o detergente, é importante obter as condições ótimas de solubilização, ou seja, relação proteína-detergente (p/p), tempo e temperatura de incubação durante a solubilização (Jones, 1999; Santos e Ciancaglini, 2000; Maire et al., 2000).

Assim, quando estudamos o efeito da concentração do detergente na solubilização da ATPase presente na fração de membrana, podemos observar que a concentração de proteína solubilizada aumenta concomitantemente com o aumento da concentração de detergente do ensaio, onde os valores de atividade ATPase máxima são obtidos entre 40 e 60 mM de colato de sódio e acima desta concentração ocorre uma diminuição da atividade ATPase (Figura 7). Este fato provavelmente ocorre devido ao excesso de detergente, que pode causar inativação ou desnaturação, uma vez que existe uma relação ótima de proteína/detergente durante o processo de solubilização, onde ocorre a capacidade máxima de solubilização (Maire et al., 2000).

Quando estudamos o efeito da concentração de proteína presente na fração de membrana no processo de solubilização (Figura 8), observamos que a atividade ATPase presente no extrato bruto solubilizado apresenta valores máximos quando incubamos o detergente com concentrações de proteína de 1,5 mg/mL. Além disso, concentrações maiores de proteína no ensaio causam

uma diminuição da atividade ATPase. Esses resultados também sugerem que a concentração de detergente do ensaio não é suficiente para solubilizar determinada quantidade de proteína, e nestas condições, ocorre diminuição da atividade ATPase presente no extrato bruto solubilizado, como descrito para outras ATPases do tipo P (Cornelius, 1991; Santos e Ciancaglini, 2000).

Sabe-se que a escolha do detergente mais adequado na solubilização de uma proteína, bem como as condições ótimas, possuem a finalidade de obter a enzima em uma forma solúvel, onde a maioria das propriedades funcionais não sejam alteradas significativamente (Skou e Esmann, 1992; Silvius, 1992; Rigaud et al., 1995; Santos e Ciancaglini, 2000; Maire et al., 2000).

Tanto a fração de membrana, rica em atividade ATPase, quanto o extrato bruto solubilizado apresentaram um pH ótimo de hidrólise de ATP entre 6,0 e 7,0 (ver Figuras 4 e 11) enquanto que o pH ótimo da F_1F_0 -ATPase varia entre 7,0 e 8,5 (Weber e Sênior, 1997). Estes resultados sugerem a presença de uma H^+ -ATPase diferente da F_1F_0 -ATPase, possivelmente uma ATPase do tipo P, uma vez que o pH ótimo descrito para a H^+ -ATPase do tipo P de membrana plasmática de *Neurospora Crassa* foi da ordem de 6,7 (Brooker e Slayman, 1982).

Estudos com inibidores específicos de várias classes de ATPases foram realizados tanto para fração de membrana, quanto para o extrato bruto solubilizado. Os resultados estão apresentados na Tabela III e fortemente sugerem a presença de uma ATPase do tipo P, uma vez que tanto a fração de membrana da *S. mutans* quanto o extrato bruto solubilizado com colato de sódio 50 mM foram fortemente inibidos com 3 μ M de ortovanadato. De fato, a H^+ -ATPase, como todas as ATPases do tipo P, são fortemente inibidas por ortovanadato, um análogo estrutural do estado de transição do fosfato quando ligado a enzima e que, devido à sua similaridade estrutural se liga ao sítio de fosforilação da enzima, bloqueando assim seu ciclo catalítico (MacGregor e Walker, 1993; Dafnis e Sabatini, 1994; Boxenbaum et al., 1998; Fedosova et al., 1998).

Bafilomicina A_1 , inibidor específico de ATPases do tipo vacuolares (Keeling et al., 1997), também inibe eficientemente a H^+ -ATPase de membrana plasmática. Vale a pena ressaltar que essa inibição é diretamente dependente da concentração de inibidor utilizada no meio reacional, ou seja, concentrações

da ordem de nmol inibe especificamente ATPases do tipo V e concentrações da ordem de μmol inibe outras H^+ -ATPases, como exemplo, as de membrana plasmática (tipo P), lisossomal e fagossomal (Tapper e Sundler, 1995). De fato, valores de inibição da atividade ATPase com $2 \mu\text{M}$ de bafilomicina da ordem de 70% foram obtidos para fração de membrana e extrato bruto solubilizado, sugerindo a presença de uma H^+ -ATPase. A inibição da fração de membrana por bafilomicina observada pode estar relacionada com uma interação inespecífica com a ATPase do tipo P presente na fração de membrana, uma vez que não temos H^+ -ATPase do tipo V em membranas plasmáticas de bactérias.

A F_1F_0 -ATPase é descrita como a principal responsável pela extrusão de prótons através da membrana de *S. mutans* (Belli e Marquis, 1991; Quivey et al., 2000). De fato, oligomicina, inibidor clássico de F_1F_0 -ATPase, inibiu cerca de 40% da atividade ATPase total presente na fração de membrana. Este composto inibe a enzima ligando-se à subunidade F_0 , responsável pelo domínio translocador de H^+ e quando solubilizada por detergentes, as subunidades desta enzima são separadas e o efeito inibitório da oligomicina desaparece, uma vez que a subunidade F_1 é responsável pela hidrólise de ATP (Curti e Uyemura, 1989). Esse composto inibiu cerca de 70% da atividade ATPase total presente no extrato bruto solubilizado, sugerindo uma interação inespecífica com a ATPase do tipo P, ou ainda, uma similaridade entre a região de ligação do inibido no canal extrusor de prótons de ambas enzimas. Na verdade, é complexo fazer comparações dos valores de inibição obtidos para o extrato bruto solubilizado com a fração de membrana, devido às interações não específicas dos diferentes compostos, sendo necessário futura purificação e ou estudo da fração de membrana com inibidores específicos associados.

Com relação aos valores de inibição observados para ouabaína, inibidor específico da Na^+, K^+ -ATPase (MacGregor e Walker, 1993), tanto na fração de membrana, quanto no extrato bruto solubilizado (Tabela III), existem dúvidas com relação a possíveis interações inespecíficas com outras ATPases ou a existência deste tipo de ATPase na membrana desta bactéria (Heefner, 1982). A primeira suposição se baseia no fato de existir uma relativa homologia entre a subunidade α da Na^+, K^+ -ATPase e a H^+ -ATPase (Scarborough, 1999; Scarborough, 2000; Morsomme e Boutry, 2000; Ambesi et al., 2000).

Quando estudamos a atividade ATPase na presença de lansoprazol, conhecido inibidor H^+,K^+ -ATPase gástrica que se liga covalentemente à enzima bloqueando a passagem de prótons através da membrana plasmática (Garnett, 1996), podemos observar que a inibição aumenta consideravelmente de 45% (membrana) para 90% (extrato bruto solubilizado), sugerindo a presença de uma H^+ -ATPase (tipo P), ou de uma H^+ -ATPase associada a um contra transporte (antiport), como por exemplo uma H^+,K^+ -ATPase ou H^+,Na^+ -ATPase (ver Tabela III).

A inibição provocada pelo ácido etacrínico (cerca de 30% na membrana e no extrato bruto solubilizado), sugere a presença de Na^+ -ATPase ou K^+ -ATPase na membrana extraída de *S. mutans*. Quando estudamos a inibição da atividade ATPase por Furosemida, que também é um inibidor específico da Na^+ -ATPase, obtivemos valores da ordem de 40% de inibição da atividade ATPase presente na fração de membrana (Tabela III). De fato, autores caracterizaram uma K^+ -ATPase presente na membrana de *Streptococcus faecalis*, fortemente inibida por vanadato ($K_i = 3 \mu M$) com massa molecular de 78 kDa (Fürst e Solioz, 1986). Além disso, uma Na^+,H^+ -ATPase também foi descrita como um mecanismo alternativo de extrusão de Na^+ na ausência de Na^+ -ATPase na membrana desse microorganismo (Kakinuma, 1987).

Ambudkar et al. (1986) também relataram a presença de uma Ca^{2+} -ATPase inibida por vanadato em *Streptococcus faecalis*, e reconstituíram esta enzima em lipossomos. Foram obtidos baixos valores de inibição da atividade ATPase empregando-se tapsigargina, inibidor específico de Ca^{2+} -ATPase (Thastrup et al., 1989; Norregaard et al., 1993; Ishii et al., 1994), sugerindo assim que, a membrana de *S. mutans*, possui baixas concentrações desta enzima, ou também pode estar ocorrendo interações inespecíficas deste inibidor com outras ATPases presentes nesta membrana (Tabela III).

Atividades em gel de eletroforese também reforçam a possibilidade da presença de uma ATPase do tipo P. De fato, a eletroforese realizada em condições desnaturantes (SDS-PAGE) da fração de membrana e do extrato bruto solubilizado mostrou um polipeptídeo de aproximadamente 100 kDa (Figura 12), com atividade catalítica (Figura 13), a qual perdeu intensidade quando adicionou-se ortovanadato (inibidor de ATPase do tipo P) ou lansoprazol (inibidor de H^+/K^+ -ATPase) no meio reacional, sugerindo que esse

polipeptídeo possa ser uma ATPase do tipo P, similar a descrita para fungos e plantas (Morsomme e Boutry, 2000; Ambesi et al., 2000; Scarborough, 2000). Esses resultados também sugerem que a ATPase descrita é um único polipeptídeo que contém um domínio catalítico e um canal transmembrana de extrusão de prótons.

A possibilidade dessa ATPase do tipo P presente nestas frações de membrana ser uma K^+ -ATPase (78 kDa) como descrito por Furst e Solioz (1986) foi excluída devido diferença na massa molecular, apesar de ambas serem fortemente inibidas por ortovanadato. As bandas com atividade catalítica de 55 e 35 kDa (ver Figura 13, linha 2), podem representar outras enzimas com atividade fosfomohidrolase presentes nessa fração de membrana, excluindo-se a possibilidade de ser a subunidade β de 55 kDa da F_1F_0 -ATPase, uma vez que a atividade dessa subunidade isolada, quando detectada, é muito pequena (Weber e Sênior, 1997; Gromet-Elhanan, 1992).

Uma vez que as ATPases do tipo P formam um intermediário fosforilado β -aspartil fosfato no seu ciclo catalítico (Smith e Hammes, 1988; Morsomme e Boutry, 2000; Ambesi et al., 2000), realizamos estudos com marcadores radioativos, neste caso $[\gamma^{32}\text{-P}]\text{ATP}$, que são ferramentas muito utilizadas para se estudar ATPases desta classe. Assim, em nossos resultados, uma banda para a fosfoenzima foi detectada e esta não aparece na presença de ortovanadato e lanzoprazol (Figura 14), sugerindo a presença de uma ATPase do tipo P. A massa molecular encontrada para fosfoenzima corresponde a um dímero (com aproximadamente 200 kDa) quando comparada com a banda obtida para atividade fosfomohidrolase, sugerindo uma forte agregação ou dimerização da fosfoenzima. Esta observação está consistente com resultados obtidos para outras ATPases do tipo P, uma vez esta classe de ATPases apresentam uma capacidade comum de formar dímeros, tetrâmeros e hexâmeros fortemente ligados, dependendo das condições experimentais. Assim, não surpreende encontrar uma massa para fosfoenzima que corresponde à forma dimérica, além disso, proteína glicosiladas e/ou com muitos domínios hidrofóbicos possuem uma grande tendência de se agregar, mesmo na presença de SDS (Goormaghtigh et al., 1986). Além disso, uma banda foi visualizada no topo do gel (Figura 14, linha 2), e esta pode estar

relacionada com a formação de agregados.

Alguns autores também descreveram a presença de dímeros para H⁺-ATPase de plantas e fungos, que resultaram em uma banda fosforilada com 230 kDa (Morsomme e Boutry, 2000). Também é relatado que esta H⁺-ATPase pode se encontrar ativa como monômeros (Goormaghtigh et al., 1986) e uma vez isolada de *N. crassa*, esta enzima forma hexâmeros estáveis (Auer et al., 1998; Toyoshima et al., 2000; Rhee et al., 2002). Além disso, Chadwick et al., 1987, também descreve formação de hexâmeros de 670 kDa, partido-se de monômeros de 105 kDa de H⁺-ATPase previamente purificados de *N. crassa*, e relacionou essa agregação com o mecanismo molecular no qual esta enzima catalisa a hidrólise de ATP para o transporte ativo de prótons.

Com o objetivo de estudar e entender o papel desta ATPase do tipo P, bem como o da F₁F₀-ATPase, durante o crescimento de *S. mutans*, cultivamos a bactéria na presença de 5 µg/mL oligomicina no meio de cultura.

Os resultados obtidos mostraram que o crescimento celular e conseqüente acidificação do meio de cultura não foram afetados pela presença do inibidor no meio de cultura (ver Figuras 15 e 16), não apresentando diferenças significativas para as diferentes condições de cultivo. Porém, na Figura 15, podemos observar um atraso de oito horas no crescimento da bactéria cultivada em meio líquido na presença de oligomicina, quando comparada com a cultivada em meio completo (controle). Este comportamento provavelmente ocorre porque, uma vez cultivada na presença de um inibidor específico de F₁F₀-ATPase, a bactéria desenvolve mecanismos alternativos para extrusão dos prótons provenientes do seu metabolismo anaeróbico, e isto requer um determinado intervalo de tempo para ocorrer (Suzuki et al., 2000).

Um mesmo atraso de 8 horas durante o crescimento de *S. mutans*, foi obtido quando se comparou culturas da cepa selvagem com mutantes deficientes em 50% da atividade F₁F₀-ATPase ou quando se adicionou Gramicidina D no meio de cultura de *S. mutans*, um ionóforo que aumenta a permeabilidade de íons monovalentes na membrana celular (Suzuki et al., 2000). Esses resultados sugerem que a presença de um inibidor específico de F₁F₀-ATPase no meio de cultura é aproximadamente equivalente à mutação específica no gene F₁F₀-ATPase ou a presença de um ionóforo no meio de cultura, que causam uma deficiência na extrusão dos prótons para o meio

extracelular, fazendo com que a célula desenvolva mecanismos adaptativos/alternativos durante seu crescimento.

De fato, os resultados apresentados na Tabela IV confirmam que a acidificação do meio de cultura está diretamente relacionada com um aumento da atividade ATPase (tanto para U/mg de proteína, quanto para U/mg massa celular) na membrana plasmática de *S. mutans*. Na verdade, autores também relatam que ocorre um aumento da atividade ATPase total presente na membrana, concomitantemente com a acidificação do meio de cultura (Belli e Marquis, 1991). Além disso, a maioria dos estudos relacionados com atividade ATPase em *S. mutans* foram feitos utilizando-se a atividade total das frações de membrana, isto é, um somatório das atividades ATPase do tipo P e F, com exceção aos poucos estudos realizados para a ATPase do tipo F purificada (Sutton e Marquis, 1987), e os resultados fortemente sugerem que a atividade ATPase do tipo F, neste caso, não é a responsável pelo aumento da atividade de extrusão de prótons através da membrana deste microorganismo.

Dos resultados apresentados na Tabela IV podemos concluir que somente a atividade do tipo P aumenta em função da acidificação extracelular, tanto para culturas em meio completo quanto para culturas em meio completo na presença de 5 µg/mL de oligomicina. Por outro lado, a atividade ATPase do tipo F permanece praticamente constante no decorrer do crescimento da bactéria, para ambas condições de crescimento.

Outros estudos também relataram que a expressão da ATPase do tipo F é auto regulável durante o crescimento em valores de pH ao redor de 5,0, resultando em um aumento na quantidade de ATPase presente na membrana da bactéria com a conseqüente acidificação do microambiente (Belli e Marquis, 1991; Quivey et al., 2000). Apesar da síntese da ATPase (tipo F) aumentar durante o crescimento da bactéria, podemos observar que a atividade destas enzimas permanecem constante no decorrer da curva de crescimento (Tabela IV). Uma hipótese que pode ser formulada para justificar esta observação, poderia ser a constante desnaturação da F_1F_0 -ATPase pelo pH ácido do meio de cultura durante a fase estacionária, que implicaria na necessidade do aumento da síntese (transcrição) desta enzima (Martín-Galiano et al., 2001; Kuhnert et al., 2004). Já a ATPase do tipo P, devido ao seu pH ótimo mais ácido, seria mais estável nestas mesmas condições, resultando em um

aumento da sua atividade ATPase para a contínua extrusão dos prótons, em condições de pH mais adversas.

Kuhnert e Quivey (2003) também descreve que a ATPase do tipo F é a principal determinante da acidurância encontrada em *S. sanguis* e *S. mutans*, e que diferenças no pH ótimo de hidrólise de ATP pela F_1F_0 -ATPase aparece ser a principal razão que *S. mutans* é mais tolerante aos baixos valores de pH quando comparado com *S. sanguis*. Os autores também descrevem que a indução da expressão e o aumento da atividade ATPase do tipo F é maior em *S. mutans* quando comparada com *S. sanguis*, menos cariogênica.

Os resultados apresentados até o presente momento, sugerem a presença de uma H^+ -ATPase do tipo P ou H^+ ,íon *antiport* ATPase na membrana plasmática de *S. mutans*, atuando em associação com a F_1F_0 -ATPase durante o crescimento de *S. mutans* em meio ácido. Devido ao baixo rendimento de solubilização protéica (Tabela II), além da instabilidade da atividade ATPase do tipo P obtida nos testes preliminares de purificação, realizamos a caracterização cinética desta enzima na fração de membrana, uma vez que esta ATPase do tipo P corresponde a uma grande parte da atividade ATPase total (60%) presente na membrana de *S. mutans* (Tabela III e Magalhães et al., 2003).

A caracterização cinética desta atividade ATPase do tipo P presente na membrana de *S. mutans* foi realizada na presença de 4 $\mu\text{g/mL}$ de oligomicina, inibindo assim toda a atividade do tipo F.

O procedimento usado em cinética do estado estacionário para investigar a interação entre ligantes e enzima, consiste em variar a concentração de um ligante e manter fixa a concentração dos outros. A comparação de parâmetros cinéticos (V_M , $K_{0,5}$ entre outros) é complexa e requer metodologias com rígidos controles e condições ótimas de pH, espécie tamponante, presença de diferentes íons, entre outros. O pH ótimo encontrado para H^+ -ATPase do tipo P foi 6,0 (Figura 17), similar ao descrito para H^+ -ATPase de membrana plasmática de *N. crassa* e *S. cerevisiae* (Brooker e Slayman, 1982; Bowman e Bowman, 1986; Supply et al., 1993). O valor de pH ótimo obtido para a ATPase do tipo P presente na fração de membrana (Figura 17) revelou ser muito semelhante ao obtido para a enzima solubilizada com colato de sódio (Figura 11). Por outro lado, mostrou valores de cerca de 1 unidade menor, quando

comparado com o valor de pH ótimo obtido para a atividade ATPase total presente na fração de membrana, isto é, um somatório das atividades do tipo P e F (Figura 4).

Quando analisamos os estudos de inibição da atividade ATPase na presença de oligomicina (Tabela VII), podemos observar que a fração de membrana de *S. mutans* é constituída basicamente por ATPases do tipo P e F, pois apresenta baixos valores de contaminação por $\text{Na}^+\text{-K}^+$, Ca^{2+} , Na^+ e K^+ -ATPase. O valor de inibição da atividade ATPase do tipo P obtido para bafilomicina A_1 , inibidor clássico de ATPases do tipo V, foi da ordem de 83%, mas como já discutido anteriormente, esse composto também inibe a H^+ -ATPase de membrana plasmática (Keeling et al., 1997; Tapper e Sundler, 1995).

Os estudos de inibição realizados para caracterizar a atividade ATPase do tipo P (na presença de oligomicina), mostraram baixos valores de contaminação por outras ATPases, conforme mostrado na Tabela VII. Estes valores de inibição quando comparados aos valores observados para a atividade ATPase total presente na fração de membrana bem como no extrato bruto solubilizado, mostrados na Tabela III, sugerem que as inibições inespecíficas observadas podem estar relacionadas com a atividade ATPase do tipo F.

O comportamento cinético da hidrólise de ATP pela ATPase do tipo P apresentou uma curva bifásica com efeitos cooperativos. Isto sugere a possibilidade de interação entre duas subunidades da enzima, uma vez que é descrita que a ATPase do tipo P presente na fração de membrana de *S. mutans* pode formar dímeros, conforme observado para a fosfoenzima (Figura 14 e Magalhães et al., 2003). Uma segunda hipótese seria a presença de dois sítios de hidrólise presentes em uma mesma cadeia polipeptídica da H^+ -ATPase.

Para a $\text{Na}^+\text{,K}^+$ -ATPase, outra ATPases do tipo P, também tem sido descrito um comportamento cinético muito semelhante, uma vez que esta enzima pode ser encontrada como um protômero ($\alpha\beta$), diprotômero ($\alpha\beta$)₂, equilíbrio protômero-diprotômero ou até mesmo como oligômeros de grande estrutura ($\alpha\beta$)₄, podendo existir um ou dois sítios catalíticos na subunidade α

desta enzima (Tsuda et al., 1998; Linnertz et al., 1998; Donnet et al., 2001; Santos e Ciancaglini, 2003).

O comportamento cinético para a hidrólise do ATP para a ATPase do tipo P extraída de *S. mutans* (Tabela V), é diferente do observado para a H⁺-ATPase de *N. crassa* a qual apresenta curvas monofásicas com um comportamento “Michaeliano” (Smith e Hammes, 1988; Rao e Slayman, 1993), com valor de K_M similar ao obtido para o sítio de baixa afinidade da enzima obtida de *S. mutans*.

Fürst e Solioz (1986) também fizeram uma caracterização estrutural e cinética de uma K⁺-ATPase com massa molecular 78 kDa, que apresentou maior afinidade para o ATP (K_M para Mg-ATP de 60 μM), quando comparada com a ATPase do tipo P de *S. mutans* (ver Tabela V).

A estimulação por concentrações equimolares de Mg-ATP (Figura 19) foi muito similar à estimulação encontrada para ATP em concentrações saturantes de íons magnésio (Figura 18 e Tabela V). Na verdade, o íon Mg²⁺ forma o complexo Mg-ATP em solução, que é o verdadeiro substrato de ATPases, especificamente do tipo P que possuem o sítio de ligação deste íon localizado próximo ao sítio de ligação de ATP na região citoplasmática (Scarborough, 2002). A forte inibição da atividade ATPase do tipo P encontrada para o EDTA (Figura 23) confirma esta hipótese. Embora o tratamento da enzima com EDTA seja uma técnica bastante utilizada na preparação de apoenzimas, este quelante além de remover os íons metálicos pode inativar irreversivelmente outras ATPases do tipo P (Santos e Ciancaglini, 2003).

Estudando-se o efeitos dos diferentes íons na atividade ATPase do tipo P presente na membrana de *S. mutans* (Tabela VI), podemos observar que esta atividade é estritamente dependente de íons magnésio, conforme apresentado na Figura 20. Nesta figura também podemos observar uma única curva de saturação para íons magnésio, com efeitos cooperativos e K_{0,5} cem vezes maior do que o descrito para H⁺-ATPase de *N. crassa*. Vale a pena ressaltar que, esta H⁺-ATPase de *N. crassa* foi capaz de hidrolisar ATP, mesmo na ausência de íons magnésio (Brooker e Slayman, 1983), enquanto que a K⁺-ATPase de *S. faecalis* perde aproximadamente 90% da sua atividade na ausência desses íons (Hugentobler et al., 1983).

Exceto pelo fato que os íons magnésio são indispensáveis para a atividade ATPase, a ATPase do tipo P obtida da fração de membrana de *S. mutans* não mostrou seletividade por nenhum dos íons estudados (Tabela VI), mas apresentou estimulações entre 50 e 100%, exceto por íons zinco que mostrou ser inibidor da atividade ATPase (Figura 23). Zinco por sua vez, é conhecido como inibidor da produção de ácidos em *S. mutans* e recentemente foi descrito que concentrações entre 0,01-0,1 mM não apenas inibe a produção de ácidos em meio de cultura, mas também sensibiliza as enzimas glicolíticas em células intactas (Phan et al., 2004).

A ATPase do tipo P foi estimulada 50% por íons NH_4^+ (Tabela VI). Além disso, em Na^+, K^+ -ATPase de vertebrados e crustáceos, íons NH_4^+ podem substituir íons K^+ durante a hidrólise de ATP na presença de íons Mg^{2+} . Existem também evidências que íons NH_4^+ substituem íons K^+ no transporte de Na^+ nesta enzima (Wall, 1996; Masui et al., 2003). Para bactérias, fungos e plantas não são descritas estimulações por íons NH_4^+ , e uma vez que observamos uma alta estimulação por íons NH_4^+ e K^+ (70 e 89% respectivamente), é possível que, para ATPase do tipo P de *S. mutans* a estimulação possa estar ocorrendo por este mesmo mecanismo.

O íon potássio possui um importante papel na regulação do pH intracelular em *Streptococcus*. Células de *S. faecalis* expõem prótons através da ATPase do tipo F (F_1F_0 -ATPase), gerando um potencial de membrana com interior negativo, e esta extrusão diminui consideravelmente na ausência de íons potássio (Heefner, 1982), sugerindo assim que este transporte de prótons estudado neste microorganismo é provavelmente realizado por uma H^+, K^+ -ATPase íon dependente. De fato, a atividade ATPase do tipo P foi estimulada em 70% na presença de íons potássio, além de ser fortemente inibida por 50 μM lansoprazol (Figura 21 e Tabela VII), sugerindo assim que a ATPase proposta no presente trabalho possa ser uma H^+, K^+ -ATPase.

A ATPase do tipo P de *S. mutans* mostrou uma estimulação de aproximadamente 100% com 50 mM de CaCl_2 e 43% com 50 mM de NaCl (ver Tabela VI). Por outro lado, estudos com ATPase do tipo F purificada da membrana de *S. mutans* mostraram que íons Ca^{2+} e Na^+ inibiram a atividade ATPase do tipo F em 72 e 96% respectivamente (Sutton e Marquis, 1987).

Esses resultados mostram que, ao contrário da ATPase do tipo F, a ATPase do tipo P presente na membrana de *S. mutans* é estimulada por esses íons.

Enquanto que a ATPase do tipo P foi estimulada pelos íons Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , NH_4^+ (Tabela VI), é descrito que a atividade ATPase total (tipo P e tipo F) de membranas de *Streptococcus* na presença de cátions divalentes (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+}) e monovalentes (K^+ , Na^+), mostraram inibição da atividade ATPase (Sutton e Marquis, 1987; Rimpilainen, 1987). Estes valores de inibições observados podem estar relacionados com o efeito somatório das diferentes ATPases, ou seja, tanto a ATPase do tipo P, quanto a ATPase do tipo F estão presentes nesta fração de membrana.

O mecanismo de hidrólise de ATP para ATPases do tipo P envolvem ciclos entre os estados E_1 e E_2 da enzima, e são classificados por possuir diferentes afinidades por nucleotídeos e íons transportados. Desta forma, a H^+ -ATPase do tipo P de membrana plasmática de *S. mutans* pode ser classificada como uma ATPase do subtipo IIIA, como as H^+ -ATPase encontradas em membranas plasmáticas de plantas e fungos. Esse grupo de ATPase bombeia prótons para fora da célula, gerando uma diferença de pH que juntamente com a extrusão do próton, pode cotransportar íons inorgânicos (Morsomme et al., 2000; Kühlbrandt, 2004).

Estes estudos associados fortaleceram as evidências que a enzima proposta neste trabalho possa ser uma H^+ ou H^+ , íon *antiport* ATPase que pode existir trabalhando em associação com F_1F_0 -ATPase, ou seja, excluindo H^+ durante o crescimento dessa bactéria (Magalhães et al., 2003). A atividade ATPase presente na membrana plasmática de *S. mutans* proveniente da H^+ -ATPase (tipo P) foi da ordem de 60% e a proveniente da F_1F_0 -ATPase (tipo F) correspondeu a 40%.

Estas conclusões foram fortalecidas após o recente seqüenciamento do genoma completo da linhagem UA159 de *S. mutans* (Ajdic et al., 2002), onde pode ser identificada uma possível ATPase do tipo P, que apresenta alta homologia com H^+ -ATPase de *N. crassa* (Blast Results: score= 222 bits (566) Expect 3e-56). Vale a pena ressaltar que o genoma completo desta linhagem apresentou as seguintes ATPases: transportadores ABC, Ca^{2+} -ATPase, Cd^{2+} -ATPase, Cu^{2+} -ATPase, Al^{3+} -ATPase e uma cátion-ATPase. Os transportadores ABC não apresentam atividade ATPase em pH 6,0, uma vez que o pH ótimo de

hidrólise descrito para essa classe de enzimas é ao redor de 8,0 (Ames et al., 2001). Sendo assim, sob as condições experimentais utilizadas na presente metodologia, eliminou-se possíveis contaminações relacionadas à atividade ATPase provenientes dos transportadores ABC. Além disso, como já discutido anteriormente, obtivemos baixos valores de inibição por tapsigargina (5,6%), e sendo assim a atividade da Ca^{2+} -ATPase também representa uma pequena porção da atividade ATPase total. Finalmente, uma vez que não estão presentes no meio reacional os íons Cd^{2+} , Cu^{2+} e Al^{3+} , as Cd^{2+} -, Cu^{2+} - e Al^{3+} -ATPase, bem como outras ATPases íons dependentes estão inativas. Além disso, atividade total presente na membrana de *S. mutans* obtida pela presente metodologia, não foi estimulada por nenhum destes íons. Assim, podemos eliminar as possíveis fontes de contaminação provenientes a essas enzimas na fração de membrana de *S. mutans* obtida pela presente metodologia.

Podemos concluir então que o mecanismo de extrusão de prótons em *S. mutans* pode ser constituído por pelo menos duas enzimas. Tanto a F_1F_0 -ATPase quanto a H^+ -ATPase, realizam o transporte dos prótons provenientes do metabolismo anaeróbico desse microorganismo durante seu crescimento em meios ácidos (Magalhães et al., 2003). Além disso, os resultados obtidos da caracterização cinética relatados na presente tese e recentemente publicados por Magalhães et al. (2005), são condizentes com uma ATPase do tipo P e similares as H^+ -ATPases descritas para fungos e plantas. Essas características cinéticas podem ser usadas como valores de referência para um melhor entendimento dos mecanismos bioquímicos da marcante acidurância deste microorganismo.

6. BIBLIOGRAFIA

- Addison, R. and Scarborough, G. A. (1981) Solubilization and Purification of the *Neurospora* Plasma Membrane H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **256**: 13165-13171.
- Ajdic, D.; McShan, W. M.; McLaughlin, R. E.; Savic, G.; Chang, J.; Carson, M. B.; Primeaux, C.; Tian, R.; Kenton, S.; Jia, H.; Lin, S.; Qian, Y.; Li, S.; Zhu, H.; Najar, F.; Lai, H.; White, J.; Roe, B. A. and Ferretti, J. J. (2002) Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**: 14434-14439.
- Ambesi, A.; Miranda, M.; Petrov, V. V. and Slayman, C. W. (2000) Biogenesis and Function of the Yeast Plasma-membrane H⁺-ATPase. *J. Exp. Biol.* **203**: 155-160.
- Ambudkar, S. V.; Lynn, A. R.; Maloney, P. C. and Rosen, B. P. (1986) Reconstitution of ATP-dependent Calcium Transport from Streptococci. *J. Biol. Chem.* **261**: 15596-15600.
- Ames, G.F.; Nikaido, K.; Wang, I.X.; Liu, P.; Liu, C.E. and Hu, C. (2001) Purification and characterization of the membrane-bound complex of an ABC transporter, the histidine permease. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**: 79-92.
- Amory, A.; Goffeau, A.; McIntosh D. B. and Boyer, P. D. (1982) Exchange of oxygen between phosphate and water catalyzed by the plasma membrane ATPase from the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **257**: 12509-12516.
- Andersen, J. P. and Vilsen, B. (1990) Primary ion pumps. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **2**: 722-730.
- Auer, M.; Scarborough, G. A. and Kühlbrandt, W. (1998) Three-dimensional map of the plasma membrane H⁺-ATPase in the open conformation. *Nature* **392**: 840-843.
- Axelsen, K.B. and Palmgren, M.G. (1998) Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J. Mol. Evol.* **46**: 84-101.
- Béguin, P.; Wang, X.; Firsov, D.; Puoti, A.; Claeys, D.; Horisberger, J. D. and Geering, K. (1997) The γ subunit is a specific component of the Na,K-ATPase and modulates its transport function. *EMBO J.* **16**: 4250-4260.
- Belli, W. A and Marquis, R. E. (1991) Adaptation of *Streptococcus mutans* and *Enterococcus hirae* to acid stress in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1134-1138.
- Bender, G. R.; Sutton, S. V. W. and Marquis, R. E. (1986) Acid Tolerance, Proton Permeabilities, and Membrane ATPases of Oral Streptococci. *Infect. Immun.* **53**: 331-338.
- Blanpain, J. -P.; Ronjat, M.; Supply, P.; Dufour, J. -P.; Goffeau, A. and Dupont, Y. (1992) The yeast plasma membrane H(+)-ATPase. An essential change of conformation triggered by H⁺. *J. Biol. Chem.* **267**: 3735-3740.
- Blum, H.; Beir, H. and Gross, H.J. (1987) Improved silcer staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Eletroforesis* **8**: 93-99.
- Bowman, B. J. and Bowman, E. J. (1986) H⁺-ATPases from mitochondria, plasma membranes and vacuoles of fungal cells. *J. Membr. Chem.* **94**: 83-

- 97.
- Bowman, B. J.; Blasco, F. and Slayman, C. W. (1981) Purification and Characterization of the Plasma Membrane ATPase of *Neurospora crassa*. J. Biol. Chem. **256**: 12343-12349.
- Boxenbaum, N.; Daly, S. E.; Javid, Z. Z.; Lane, L. K. and Blostein, R. (1998) Changes in the steady-state conformational equilibrium resulting from cytoplasmic mutations of the Na,K-ATPase α -subunit. J. Biol. Chem. **273**: 23086-23092.
- Boyar, R. M.; Thylstrup, A.; Holmen, L. and Bowden, G. H. (1989) The microbiota associated with the development of initial enamel descalcification below orthodontic bands *in vivo* in children living in a fluoridated- water area. J. Dent. Res. **68**: 1734-1738.
- Brooker, R. J. and Slayman, C. W. (1982) Inhibition of the plasma membrane $[H^+]$ -ATPase of *Neurospora crassa* by N-ethylmaleimide. J. Biol. Chem. **257**: 12051-12055.
- Brooker, R. J. and Slayman, C. W. (1983) Effects of Mg^{2+} ions on the plasma membrane $[H^+]$ -ATPase of *Neurospora crassa*. II. Kinetic studies. J. Biol. Chem. **258**: 8833-8838.
- Cadwell, D. R. (1995) Microbial physiology & metabolism. 1st ed., W. C. Brown Publisher.
- Canfield, R. E. (1963) The amino acid sequence of egg white lysozyme. J. Biol. Chem. **238**: 2698-2707.
- Carafoli, E. (1991) Calcium pump of the plasma membrane. Physiol. Rev. **71**: 129-153.
- Carey, M. C. and Small, D. M. (1972) Micelle formation by bile salts. Physical-chemical and thermodynamic considerations. Arch. Intern. Med. **130**: 506-527.
- Catty, P.; de Kerchove d'Exaerde, A. and Goffeau, A. (1997) The complete inventory of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* P-type transport ATPases. FEBS Lett. **409**: 325-332.
- Chadwick, C. C.; Goormaghtygh, E. and Scarborough, G. A. (1987) A hexameric form of the *Neurospora crassa* plasma membrane H^+ -ATPase. Arch. Biochem. Biophys. **252**: 348-356.
- Chestnutt, I. G.; MacFarlane, T. W. and Stephen K. W. (1994) An *in vitro* investigation of the cariogenic potential of oral streptococci. Arch. Oral Biol. **7**: 589-593.
- Clarke, J. K. (1924) On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. Br. J. Exp. Pathol. **5**:141-147.
- Cornelius, F. (1991) Functional reconstitution of the sodium pump. Kinetics of exchange reactions performed by reconstituted Na,K-ATPase. Biochim. Biophys. Acta **1071**: 19-66.
- Cornelius, F. and Mahmmoud, Y. A. (2003) Themes in ion pump regulation. Ann. N. Y. Acad. Sci. **986**: 579-586.
- Curti, C. and Uyemura, S. A. (1989) A simple student project to isolate

- subcellular fractions and analyse membrane-bound and Triton X-100 solubilized enzyme activity. *Biochem. Edu.* **17**: 213-214.
- Dafnis, E. and Sabatini, S. (1994) Biochemistry and pathophysiology of vanadium. *Nephron.* **67**: 133-143.
- Daghastanli, K. R. P.; Ferreira, R. B.; Thedei, G. Jr.; Maggio, B. and Ciancaglini, P. (2004) Lipid composition-dependent incorporation of multiple membrane proteins into liposomes. *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* **36**: 127-137.
- Daneo-Moore, L.; Terleckyj, B. and Shockman, G. D. (1975) Analysis of growth rate in sucrose-supplemented cultures of *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* **12**: 1195-205.
- Donnet, C.; Aristarkhova, E. and Sweadner, K. J. (2001) Thermal denaturation of the Na,K-ATPase provides evidence for alpha-alpha oligomeric interaction and gamma subunit association with the C-terminal domain. *J. Biol. Chem.* **276**: 7357-65.
- Dufour, J. and Goffeau, A. (1978) Solubilization by Lysolecithin and Purification of the Plasma Membrane ATPase of the Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **253**: 7026-7032.
- Dufour, J. P. and Goffeau, A. (1980) Molecular and kinetic properties of the purified plasma membrane ATPase of the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur. J. Biochem.* **105**: 145-154.
- Dutra, M. B.; Ambesi, A. and Slayman, C. W. (1998) Structure-function relationships in membrane segment 5 of the yeast Pma1 H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **273**: 17411-17417.
- Edwardson, S. (1968) Characteristics of caries – inducing human *streptococci* resembling *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.* **13**: 637-646.
- Eraso, P. and Portillo, F. (1994) Molecular mechanism of regulation of yeast plasma membrane H(+)-ATPase by glucose. Interaction between domains and identification of new regulatory sites. *J. Biol. Chem.* **269**: 10393-10399.
- Fedosova, N. U.; Cornelius, F. and Klodos, I. (1998) E₂P phosphoforms of Na,K-ATPase. I. Compararison of phosphointermediates formed from ATP and Pi by their reactivity toward hydroxylamine and vanadate. *Biochemistry* **37**: 13634-13642.
- Fürst, P. and Solioz, M. (1986) The vanadate-sensitive ATPase of *Streptococcus faecalis* pumps potassium in a reconstituted system. *J. Biol. Chem.* **261**: 4302-4308.
- Garnett, W. R. (1996) Lansoprazole: a proton pump inhibitor. *Ann. Pharmacother.* **30**: 1425-36.
- Goodman, H.; Pollock, J. J.; Katona, L. I.; Iacono, V. J.; Cho, M. and Thomas, E. (1981) Lysis of *Streptococcus mutans* by hen white lysozyme and inorganic sodium salts. *J. Bacteriol.* **146**: 764-774.
- Goormaghtigh, E.; Chadwick, C. and Scarborough, G. A. (1986) Monomers of the Neurospora plasma membrane H⁺-ATPase catalyze efficient proton translocation. *J. Biol. Chem.* **261**: 7466-7471.
- Gromet-Elhanan, Z. (1992) Identification of subunits required for the catalytic

- activity of the F₁-ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **24**: 447-452.
- Hajishengaleis, G. and Michalec, S. M. (1999) Current status of a mucosal vaccine against dental caries. *Oral Microbiol. Immunol.* **14**: 1-20.
- Hamilton, I. R. and Buckley, N. D. (1991) Adaptation by *Streptococcus mutans* to acid tolerance. *Oral Microbiol. Immunol.* **6**: 65-71.
- Hanatani, M.; Nishifuji, K.; Futai, M. and Tsuchiya, T. (1984) Solubilization and Reconstitution of membrane proteins of *Escherichia Coli* using Alkanol-N-Methylglucamides. *J. Biochem.* **95**: 1349-1353.
- Harper, D. S. and Loesche, W. S. (1984) Growth and acid tolerance of human dental plaque bacteria. *Arch. Oral Biol.* **10**: 843-848.
- Hartree, E. F. (1972) Determination of proteins: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* **48**: 422-427.
- Heefner, D. L. (1982) Transport of H⁺, K⁺, Na⁺ and Ca⁺⁺ in *Streptococcus*. *Mol. Cell. Biochem.* **44**: 81-106.
- Heinonen, S. K. and Lathi, R. J. (1981) A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Analyt. Biochem.* **113**: 313-317.
- Helenius, A. and Simons, K. (1975) Solubilization of membrane by detergents. *Biochim. Biophys. Acta* **415**: 29-79.
- Helenius, A.; McCaslin, D. R.; Fries, E. and Tanford, C. (1979) Properties of detergents. *Methods Enzymol.* **56**: 734-749.
- Hensel, M.; Achmus, H.; Deckers-Hebestreit, G. and Altendorf, K. (1996) The ATP syntase of *Streptomyces lividans*: characterization and purification of the F₁F_o complex. *Biochim. Biophys. Acta* **1274**: 101-108.
- Hjelmeland, L. M. (1980) A nondenaturing zwitterionic detergent for membrane biochemistry: design and synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 6368-6370.
- Hooper, N. M. and Bashir, A. (1991) Glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane proteins can be distinguished from transmembrane polypeptide-anchored proteins by differential solubilization and temperature-induced phase separation in Triton X-114. *Biochem. J.* **280**: 745-751.
- Hugentobler, G.; Heid, I. and Solioz, M. (1983) Purification of a putative K⁺-ATPase from *Streptococcus faecalis*. *J. Biol. Chem.* **258**: 7611-7617.
- Inesi, G. and Kirtley, M.R. (1992) Structural features of cation transport ATPases. *J. Bioenerg. Biomembr.* **24**: 321-344.
- Ishii, T.; Lemas, M. V. and Takeyasu, K. (1994) Na⁺-, ouabain-, Ca²⁺, and thapsigargin-sensitive ATPase activity expressed in chimeras between the calcium and the sodium pump α subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 6103-6107.
- Jayaraman, G. C.; Penders, J. E. and Burne, R. A. (1997) Transcriptional analysis of the *Streptococcus mutans* hrcA, grpE and dnaK genes and regulation of expression in response to heat shock and environmental acidification. *Mol. Microbiol.* **25**: 329-341.

- Jones, M. N. (1999) Surfactants in membrane solubilization. *Int. J. Pharm.* **177**: 137-159.
- Jorgensen, P. L. and Pedersen, P. A. (2001) Structure-function relationships of Na(+), K(+), ATP, or Mg(2+) binding and energy transduction in Na,K-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* **1505**: 57-74.
- Jorgensen, P. L., Hakansson, K. O. and Karlsh, S. J. D. (2003) Structure and Mechanism of Na, K-ATPase: Functional Sites and Their Interactions. *Annu. Rev. Physiol.* **65**: 817-849.
- Jorgensen, P. L.; Nielsen, J. M.; Rasmussen, J. H. and Pedersen, P. A. (1998) Structure-function relationships of E1-E2 transitions and cation binding in Na,K-pump protein. *Biochim. Biophys. Acta* **1365**: 65-70.
- Kakinuma, Y. (1987) Sodium/Proton antiporter in *Streptotococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **169**: 3886-3890.
- Kaplan, J. H. (2002) Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu. Rev. Biochem.* **71**: 511-535.
- Keeling, D. J.; Herslöf, B.; Ryberg, S.; Sjögren, S. and Sölvell, L. (1997) Vacuolar H⁺-ATPases. Targets for drug discovery? *Ann. N. Y. Acad. Sci. USA* **834**: 600-608.
- Knol, J.; Sjollem, K. and Poolman, B. (1998) Detergent-mediated reconstitution of membrane proteins. *Biochemistry* **37**: 16410-16415.
- Koepsell, H. (1986) Methodological aspects of purification and reconstitution of transport proteins from mammalian plasma membranes. *Physiol. Bichem. Pharmacol.* **104**: 65-137.
- Koga, T.; Oho, T.; Shimazaki, Y. and Nakano, Y. (2002) Immunization against dental caries. *Vaccine* **20**: 2027-44.
- Köhler, B.; Birkhead, D. and Olsson, S. (1995) Acid production by human strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Caries Res.* **29**: 402-406.
- Krasse, B. (1966). Human *streptococci* and experimental caries in hamsters. *Arch. Oral Biol.* **11**: 429-436.
- Krasse, B. (1998) Risco de cárie - Um guia prático para avaliação e controle. 2^a ed. Trad. José L. F. de Andrade, Quintessence Editora, 113 p.
- Kühlbrandt, W. (2004) Biology, structure and mechanism P-type ATPase. *Nature* **5**: 282-295.
- Kuhnert, W. L. and Quivey-Jr., R. G. (2003) Genetic and biochemical characterization of the F-ATPase operon from *Streptococcus sanguis* 10904. *J. Bacteriol.* **185**: 1525-1533.
- Kuhnert, W. L.; Zheng, G.; Faustoferri, R. C. and Quivey R. G. Jr. (2004) The F-ATPase operon promoter of *Streptococcus mutans* is transcriptionally regulated in response to external pH. *J. Bacteriol.* **186**: 8524-8528.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Leone, F. A.; Degreve, L. and Baranauskas, J. A. (1992) Sigraf - A versatile computer-program for fitting enzyme kinetic data. *Biochem. Ed.* **20**: 94-96.

- Lingrel, J. B.; Arguello, J. M.; VanHuyse, J. and Kuntzweiler, T. A. (1997) Cation and cardiac glycosid binding sites of the Na,K-ATPase. *Ann. N.Y. Acad. Sci. USA* **834**: 194-206.
- Lingrel, J. B.; Croyle, L. M.; Woo, A. L. and Arguello, J. M. (1998) Ligand Binding sites of Na,K-ATPase. *Acta Physiol. Scand.* **163**: 69-77.
- Linnertz, H.; Urbanova, P.; Obsil, T.; Herman, P.; Amler, E. and Schoner, W. (1998) Molecular distance measurements reveal an (alpha beta)₂ dimeric structure of Na,K-ATPase – high affinity ATP binding site and K⁺-activated phosphatase reside on different alpha-subunits. *J. Biol. Chem.* **273**: 28813-28821.
- Loesche, W. J. (1986) Role of *Streptococcus mutans* in dental decay. *Microbiol. Rev.* **50**: 353-380.
- Loesche, W. J.; Rowan, J.; Straffon, L. H. and Loos, P. J. (1975) Association of *S. mutans* with human dental decay. *Infect. Immun.* **11**: 1252-1260.
- Lutsenko, S. and Kaplan, J. H. (1994) Molecular events in close proximity to the membrane associated with the binding of ligands to the Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* **269**: 4555-4564.
- Lutsenko, S. and Kaplan, J. H. (1995) Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity. *Biochemistry* **34**: 15607-15613.
- MacGregor, S. E. and Walker, J. M. (1993) Inhibitors of the Na,K-ATPase. *Comp. Biochem. Physiol.* **105**: 1-9.
- MacLennan, D. H.; Rice, W. J. and Green, N. M. (1997) The mechanism of Ca²⁺ transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases. *J. Biol. Chem.* **272**: 28815-28818.
- Magalhães, P. P.; Paulino, T. P.; Thedei, G. Jr. and Ciancaglini, P. (2005). A kinetic characterization of the P-type membrane ATPase from *Streptococcus mutans*. *Comp. Biochem. Physiol.* IN PRESS.
- Magalhães, P. P.; Paulino, T. P.; Thedei, G. Jr.; Larson, R. E. and Ciancaglini, P. (2003) A 100 kDa vanadate and lanzoprazole-sensitive ATPase from *Streptococcus mutans* membrane. *Arch. Oral Biol.* **48**: 815-824.
- Marie, M.; Champeil, P. and Moller, J. V. (2000) Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim. Biophys. Acta* **1508**: 86-111.
- Marsh, P. D. (1993) Antimicrobial strategies in the prevention of dental caries. *Caries Res.* **27**: 72-76.
- Marsh, P. D. (2003) Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology* **149**: 279-294.
- Marsh, P. D.; Featherstone, A.; McKee, A. S.; Hallsworth, A. S.; Robinson, C.; Weatherell, J. A.; Newman, H. N. and Pitter, A. F. V. (1989) A microbiological study of early caries of approximal surfaces in school children. *J. Dent. Res.* **68**: 1151-1154.
- Martín-Galiano, A. J.; Ferrándiz, M. J. and Campa, A. G. (2001) the promoter of the operon encoding the F₀F₁ ATPase of *Streptococcus pneumoniae* is inducible by pH. *Mol. Microbiol.* **41**:1327-1338.

- Masui, D. C.; Furriel, R. P. M.; Mantelato, F. L. M.; McNamara, J. C. and Leone, F. A. (2003) Gill (Na^+ , K^+)-ATPase from the blue crab *Callinectes danae*: modulation of K^+ -phosphatase activity by potassium and ammonium ions. *Comp. Biochem. Physiol.* **134**: 631-640.
- Menaker, L. (1980) Chemical composition of teeth. In: *The Biologic Basis of Dental Caries: An oral biology textbook.* (Ed. Harper and Row, Publishers, Inc. Maryland) pp. 149-185.
- Mikkelsen, L.; Jensen, S. B. and Jakobsen, J. (1981) Microbial studies on plaque from carious and caries-free proximal tooth surfaces in a population with high caries experience. *Caries Res.* **15**: 428-435.
- Moller, J. V.; Juul, B. and le Maire, M. (1996) Structural organization, ion transport, and transduction of P-type ATPases. *Biochim. Biophys. Acta* **1286**: 1-51.
- Morsomme, P. and Boutry, M. (2000) The plant plasma membrane H^+ -ATPase: structure, function and regulation. *Biochim. Biophys. Acta* **1465**: 1-6.
- Morsomme, P.; Slayman, C. W. and Goffeau, A. (2000) Mutagenic study of the structure, function, and biogenesis of the yeast plasma membrane H^+ -ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* **1469**: 133-157.
- Navarre, C; Catty, P.; Leterme, S; Dietrich, F. and Goffeau, A. (1994) Two distinct genes encode small isoproteolipids affecting plasma membrane H^+ -ATPase activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **269**: 21262-21268.
- Norregaard, A.; Vilsen, B. and Andersen, J. P. (1993) Chimeric Ca^{2+} -ATPase/ Na^+ , K^+ -ATPase molecules. Their phosphoenzyme intermediates and sensitivity to Ca^{2+} and thapsigargin. *FEBS Lett.* **336**: 248-254.
- O'Brien, W. J.; Lingrel, J. B. and Wallick, E. T. (1994) Ouabain binding kinetics of the rat alpha two and alpha three isoforms of the sodium-potassium adenosine triphosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* **310**: 32-39.
- Palmgren, M. G.; Larsson, C. and Sommarin, M. (1990) Proteolytic activation of the plant plasma membrane H^+ -ATPase by removal of a terminal segment. *J. Biol. Chem.* **265**: 13423-13426.
- Palmgren, M. G.; Sommarin, M.; Serrano, R. and Larsson, C. (1991) Identification of an autoinhibitory domain in the C-terminal region of the plant plasma membrane H^+ -ATPase. *J. Biol. Chem.* **266**: 20470-20475.
- Pardo, J. P. and Slayman, C. W. (1988) The fluorescein isothiocyanate-binding site of the plasma-membrane H^+ -ATPase of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **263**: 18664-18668.
- Phan, T. N.; Buckner, T.; Sheng, J.; Baldeck, J. D. and Marquis, R. E. (2004) Physiologic actions of zinc related to inhibition of acid and alkali production by oral streptococci in suspensions and biofilms. *Oral Microbiol. Immunol.* **19**: 31-38.
- Pressley, T. A. (1996) Structure and function of the Na,K-pump: ten years of molecular biology. *Miner. Electrolyte. Metab.* **22**: 264-271.
- Quivey-Jr, R. G.; Kuhnert, W. L. and Hahn, K. (2000) Adaptation of oral streptococci to low pH. *Adv. Microb. Physiol.* **42**: 239-274.

- Rao, R. and Slayman, C. W. (1993) Mutagenesis of conserved residues in the phosphorylation domain of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **268**: 6708-6713.
- Raussens, V.; Ruyschaert, J. M. and Goormaghtigh, E. (1997) Fourier transform infrared spectroscopy study of the secondary structure of the gastric H⁺,K⁺-ATPase and of its membrane associated proteolytic peptides. *J. Biol. Chem.* **272**: 262-270.
- Raussens, V.; Pézolet, M.; Ruyschaert, J. and Goormaghtigh, E. (1999) Structural difference in the H⁺,K⁺-ATPase between the E1 and E2 conformations. *Eur. J. Biochem.* **262**: 176-183.
- Read, S. M. and Northcote, D. H. (1981) Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal. Biochem.* **116**: 53-64.
- Rhee, K.; Scarborough, A. and Henderson, R. (2002) Domain movements of plasma membrane H⁺-ATPase: 3D structures of two states by electron cryo-microscopy. *EMBO J.* **21**: 3582-3589.
- Rice, W. J.; Young, H. S.; Martin, D. W.; Sachs, J. R. and Stokes, D. L. (2001) Structure of Na⁺,K⁺-ATPase at 11-Å resolution: comparison with Ca²⁺-ATPase in E1 and E2 states. *Biophys. J.* **80**: 2187-2197.
- Rigaud, J. L.; Pitard, B. and Levy, D. (1995) Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1231**: 223-246.
- Rimpilainen, M. A. (1987) Properties of the N,N'-dicyclohexylcarbodiimide resistant ATPase of *Streptococcus cremoris*. *Int. J. Biochem.* **19**: 729-732.
- Saito, S. and Tsuchiya, T. (1984) Characteristics of n-octyl β-D-thioglucopyranoside, a new non-ionic detergent useful for membrane biochemistry. *Biochem. J.* **222**: 829-832.
- Santos, H. L. and Ciancaglini, P. (2000) A practical approach to the choice of a suitable detergent and optimal conditions to solubilize a membrane protein. *BAMBED* **28**: 178-182.
- Santos, H. L. and Ciancaglini, P. (2003) Kinetic characterization of Na,K-ATPase from rabbit outer renal medulla: properties of (αβ)₂ dimer. *Comp. Biochem. Physiol.* **135**: 539-549.
- Scarborough, G. A. (1999) Structure and function of the P-type ATPases. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **11**: 517-522.
- Scarborough, G. A. (2000) The plasma membrane proton-translocating ATPase. *Cell. Mol. Life. Sci.* **57**: 871-883.
- Scarborough, G. A. (2002) Molecular mechanism of the P-type ATPases. *J. Bioenerg. Biomembr.* **34**: 235-250.
- Schnebli, H. P. and Abrams, A. (1970) Membrane adenosine triphosphatase from *Streptococcus faecalis*: Preparation and homogeneity. *J. Biol. Chem.* **245**: 1115-1121.
- Seto-Young, D.; Hall, M. J.; Na, S.; Haber, J. E. and Perlin D. S. (1996) Genetic probing of the first and second transmembrane helices of the plasma membrane H⁺-ATPase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **271**:

- 581-587.
- Silvius, J. R. (1992) Solubilization and functional reconstitution of biomembrane components. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**: 323-348.
- Skou, J. C. and Esmann, M. (1992) The (Na⁺,K⁺)-ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **24**: 249-261.
- Smith, A. J.; Quivey, R. G. and Faustoferri, R. C. (1996) Cloning and nucleotide sequence analysis of the *Streptococcus mutans* membrane-bound, proton-translocating ATPase operon. *Gene* **183**: 87-96.
- Smith, H. E. and Hammes, G. G. (1988) Studies of the phosphoenzyme intermediate of the yeast plasma membrane proton-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* **263**: 13774-13778.
- Smith, R. and Scarborough, G. A. (1984) Large-scale isolation of the *Neurospora* plasma membrane H⁺-ATPase. *Anal. Biochem.* **138**: 156-63.
- Supply, P.; Wach, A. and Goffeau, A. (1993) Enzymatic properties of the PMA2 plasma membrane-bound H⁺-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **268**: 19753-19759.
- Sutton, S. V. W. and Marquis, R. E. (1987) Membrane-associated and solubilized ATPases of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. *J. Dent. Res.* **66**: 1095-1098.
- Suzuki, T.; Tagami, J. and Hanada, N. (2000) Role of F₁F_o-ATPase in the growth of *Streptococcus mutans* GS5. *J. Applied. Microbiol.* **88**: 555-562.
- Takahashi, N.; Horiuchi, M. and Yamada, T. (1997) Effects of acidification on growth and glycolysis of *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol. Immunol.* **12**: 72-76.
- Tapper, H. and Sundler, R. (1995) Bafilomycin A₁ inhibits lysosomal, phagosomal, and plasma membrane H⁺-ATPase and induces lysosomal enzyme secretion in macrophages. *J. Cell. Physiol.* **163**: 137-144.
- Thastrup, O.; Dawson, A. P.; Scharff, O.; Foder, B.; Cullen, P. J.; Drobak, B. K.; Bejerrum, P. J.; Christensen, S. B. and Hanley, M. R. (1989) Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. *Agents Actions* **27**: 17-23.
- Tiller, G. E.; Mueller, T. J.; Dockler, M. E. and Strive, W. G. (1984) Hydrogenation of Triton X-100 eliminates its fluorescence and ultraviolet-light adsorption while preserving its detergent properties. *Anal. Biochem.* **141**: 262-266.
- Toyoshima, C.; Nakasako, M.; Nomura, H. and Ogawa, H. (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* **405**: 647-655.
- Tsuda T.; Kaya, S.; Yokoyama, T.; Hayashi, Y. and Taniguchi, K. (1998) ATP and acetyl phosphate induces molecular events near the ATP binding site and the membrane domain of Na⁺, K⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **273**: 24339-24345.
- Tzagaloff, A. and Penefsky, H. S. (1971) Extraction and purification of lipoprotein complex from membranes. *Methods Enzymol.* **22**: 219-230.

- Van Houte, J.; Sansone, C.; Joshipura, K. and Kent, R. (1991) *Mutans streptococci* and *non-mutans streptococci* acidogenic at low pH, and *in vitro* acidogenic potential of dental plaque in two different areas of human dentition. *J. Dent. Res.* **70**: 1503-1507.
- Vigneron, L.; Ruysschaert, J. M. and Goormaghtigh, E. (1995) Fourier transform infrared spectroscopy study of the secondary structure of the reconstituted *Neurospora Crassa* plasma membrane H⁺-ATPase and of its membrane-associated proteolytic peptides. *J. Biol. Chem.* **270**: 17685-17696.
- Wach, A.; Supply, P.; Dufour, J. P. and Goffeau, A. (1996) Amino acid replacements at seven different histidines in the yeast plasma membrane H⁺-ATPase reveal critical positions at His285 and His701. *Biochemistry* **35**: 883-890.
- Wall, S. M. (1996) Ammonium transport and the role of the Na,K-ATPase. *Miner. Electrolyte. Metab.* **22**: 311-317.
- Wang, G.; Tamas, M. J.; Hall, M. J.; Pascual-Ahuir, A. and Perlin, D. S. (1996) Probing conserved regions of the cytoplasmic LOOP1 segment linking transmembrane segments 2 and 3 of the *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **271**: 25438-25445.
- Weber, J. and Sênior, A. E. (1997) Catalytic mechanism of F₁-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* **1319**: 19-58.
- Weyne, S. and Opermann, R. (2001). *Cariologia Clínica*. Tradução: 2^a ed. Editora Santos: São Paulo.
- Yeagle, P. L. (1993) *The membrane of the cells*. 2nd Edition. Academic Press.

7. ADENDO

Trabalhos científicos publicados/submetidos em revistas especializadas:

- Camolezi, F. L., Daghastanli, K.R.P., **Magalhães, P. P.**, Pizauro, J.M. and Ciancaglini, P. (2002) Construction of an alkaline phosphatase-liposome system: a tool for biomineralization study. *International Journal Biochemistry and Cell Biology*, **32**:1091-1101.
- **Magalhães, P. P.**, Paulino, T.P., Thedei, G. Jr., Larson, R. E. and Ciancaglini, P. (2003) A 100 kDa vanadate and lanzoprazole-sensitive ATPase from *Streptococcus mutans* membrane. *Archives of Oral Biology*, **48**:815-824.
- Paulino, T.P., **Magalhães, P. P.**, Thedei, G. Jr., Tedesco, A. C. and Ciancaglini, P. (2005) Use of Visible light-based Photodynamic Therapy to Bacterial Photoinactivation. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, IN PRESS.
- **Magalhães, P. P.**, Paulino, T.P., Thedei, G. Jr., and Ciancaglini, P. (2005) Kinetic characterization of the P-type membrane ATPase from *Streptococcus mutans*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, IN PRESS.
- Simão, A. M. S., Beloti, M., Cezarino, R. M., **Magalhães, P. P.**, Rosa, A. L., Pizauro., L. M. and Ciancaglini, P. (2005) Efficient method to obtain membrane bound Alkaline Phosphatase from rat bone marrow cell culture. *International Journal Biochemistry and Cell Biology*, SUBMITTED.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)