



**Universidade Federal do Rio de Janeiro**

**Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes**

**Eline Barboza da Silva**

**FLUORETO DE SÓDIO, TRICLOSAN E  
ÁCIDOS ORGÂNICOS FRACOS:  
INIBIDORES DA SÍNTESE DE ÁLCALIS POR  
SUSPENSÕES E BIOFILMES DE BACTÉRIAS ORAIS**

**Tese de Doutorado**

**Rio de Janeiro**

**2007**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.



**FLUORETO DE SÓDIO, TRICLOSAN E ÁCIDOS ORGÂNICOS  
FRACOS: INIBIDORES DA SÍNTESE DE ÁLCALIS POR  
SUSPENSÕES E BIOFILMES DE BACTÉRIAS ORAIS**

**Eline Barboza da Silva**

**Tese de Doutorado apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Ciências  
(Microbiologia) do Instituto de Microbiologia  
Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal  
do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos  
necessários à obtenção do título de Doutor  
em Ciências (Microbiologia).**

**Orientadores: Dr<sup>a</sup>. Angela Christina Dias de  
Castro (Universidade Federal do Rio de  
Janeiro) e Dr. Robert Edward Marquis  
(Universidade de Rochester)**

**Rio de Janeiro**

**2007**

**FLUORETO DE SÓDIO, TRICLOSAN E ÁCIDOS ORGÂNICOS FRACOS:  
INIBIDORES DA SÍNTESE DE ÁLCALIS POR SUSPENSÕES E  
BIOFILMES DE BACTÉRIAS ORAIS**

**Eline Barboza da Silva**

**Orientadores: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Angela Christina Dias de Castro e  
Prof. Dr. Robert Edward Marquis**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia) do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

Rio de Janeiro, \_\_\_\_\_de novembro de 2007.

Aprovada por:

\_\_\_\_\_  
**Angela Christina Dias de Castro – Doutora**

\_\_\_\_\_  
**Celuta Sales Alviano – Doutora**

\_\_\_\_\_  
**Regina Maria Domingos – Doutora**

\_\_\_\_\_  
**Milton de Uzeda – Doutor**

\_\_\_\_\_  
**Raphael Hirata – Doutor**

## Ficha Catalográfica

Barboza-Silva, Eline

Fluoreto de sódio, triclosan e ácidos orgânicos fracos: inibidores da síntese de álcalis por suspensões e biofilmes de bactérias orais / Eline Barboza da Silva – Rio de Janeiro: UFRJ/IMPPG, 2007.

xiv, 226f.: il.; 31 cm.

Orientadores: Angela Christina Dias de Castro e Robert Edward Marquis

Tese (Doutorado) – UFRJ / Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes / Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), 2007.

Referências Bibliográficas: f. 142-168.

1. Álcalis. 2. Amônia. 3. Bactérias orais. 4. Biofilmes. 5. Fluoreto de sódio. 6. Triclosan. 7. Ácidos orgânicos fracos. 8. Cárie. 9. Cálculo dental. I. Castro, Angela Christina Dias de & Marquis, Robert Edward. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia). III. Título.

**Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro sob a orientação da Prof. Angela Christina Dias de Castro e no Departamento de Microbiologia e Imunologia da Escola de Medicina e Odontologia da Universidade de Rochester, NY, EUA, sob a orientação do Prof. Robert Edward Marquis.**

**A minha mãe Eliane,  
pelo exemplo de força e coragem e pelo amor e  
dedicação incansáveis em todos os momentos  
difíceis**

**Ao meu saudoso pai Ely (*in memoriam*),  
pelo exemplo de sabedoria, justiça e  
honestidade e pelo amor e confiança  
depositados em mim**

**Ao meu irmão Eduardo,  
pelo apoio, companherismo e cumplicidade  
compartilhados nas horas de dificuldade**

**A Deus,  
pela proteção e realizações recebidas em todos  
os dias da minha vida**

## AGRADECIMENTOS

Expresso meu reconhecimento às pessoas e às instituições que contribuíram de forma essencial ao desenvolvimento e concretização deste trabalho.

Ao Dr. Robert Edward Marquis, pela orientação deste trabalho de pesquisa, por toda compreensão, estímulo, sabedoria, confiança e amizade dedicados a mim e à realização deste estudo. Saudades imensas!

À Prof. Angela Christina Dias de Castro, por ter me recebido em seu laboratório com carinho, confiança, amizade e pela orientação da tese. Obrigada pela paciência!

À querida amiga de laboratório em Rochester, Joanna Sheng, pela amizade, estímulo, carinho e exemplo de pessoa e profissional. Saudades!

Ao Prof. Milton de Uzeda, pela dedicação na revisão cuidadosa da tese e pelo apoio durante a iniciação científica em seu laboratório e orientação no Mestrado.

A minha mãe Eliane e irmão Eduardo pelo amor, apoio e incentivo durante esses anos de realização da tese.

Aos amigos de laboratório, Rachel, Renata, Luiza Lessa e Luisa Barboza e à Semiramis e ao Sr. Luiz pela amizade e apoio técnico.

Aos amigos do Instituto de Microbiologia da UFRJ e aos colegas de turma pela convivência amigável e saudável durante o curso.

Ao Instituto de Microbiologia da UFRJ e à Coordenação de Pós-Graduação, especialmente à Prof. Thaís Souto-Padrón e Safira, pela compreensão e colaboração colocadas à disposição para a concretização do curso e desta pesquisa.

Às instituições que contribuíram para a formação acadêmica e para o desenvolvimento desta tese – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

	3.
	1.
	Fluore
	to
	.....
<b>RESUMO</b> .....	
<b>ABSTRACT</b> .....	
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	
<b>1. Ecologia microbiana oral</b> .....	
1.1. Microbiota indígena e ecossistema oral .....	
1.2. Biofilme: composição, estrutura e metabolismo .....	
1.3. Biofilme oral de indivíduos sadios .....	
1.3.1. Biofilme dental: supragengival e subgengival .....	3.
1.3.2. Biofilme de superfície mucosa oral .....	2.
1.4. Formação do biofilme oral e relação com doenças .....	Triclos
1.5. Biofilme oral patogênico .....	an
1.5.1. Cárie dental .....	
1.5.2. Doença periodontal .....	
<b>2. Síntese de álcalis orais</b> .....	
2.1. Hidrólise de uréia .....	
2.2. Hidrólise de arginina .....	
2.3. Hidrólise de agmatina .....	
2.4. Fermentação de aminoácidos e peptídeos .....	
<b>3. Ações de antimicrobianos no ecossistema oral</b> .....	

	3.
	3.
xiii	Ácidos
xiv	orgâni
01	cos
02	fracos.
02	.....
04	.....
08	.....
08	.....
09	.....
09	....
12	3
12	.3.1.
17	Indom
20	etacin
21	a,
24	cetopr
28	ofeno
29	e
32	ibuprof
32	eno
37	.....

.....	37
3.3.2. Caprato, undecanoato e laurato .....	37
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>38</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
<b>1. Bactérias pesquisadas e tipos de cultura .....</b>	<b>41</b>
1.1. Bactérias .....	41
1.2. Culturas em suspensão e extratos celulares .....	41
1.3. Biofilmes .....	41
1.4. Biofilme dental supragengival humano .....	43
<b>2. Experimentos .....</b>	<b>44</b>
2.1. Teste da produção de amônia em pH constante .....	45
2.1.1. Uréia como substrato .....	45
2.1.2. Arginina como substrato .....	45
2.2. Teste de elevação de pH .....	48
2.3. Teste da atividade enzimática .....	50
2.3.1. Enzima urease .....	52
2.3.2. Enzimas do SAD .....	52
2.4. Teste da captação do substrato arginina .....	53
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>55</b>
<b>1. Ureólise .....</b>	<b>57</b>
1.1. Efeitos da acidificação na produção de amôniapor células intactas em suspensão e por biofilmes de bactérias urease-positivas .....	57

1.2. Efeitos de agentes antimicrobianos na ureólise por bactérias intactas em suspensão e em biofilmes .....	58
1.3. Efeitos da acidificação e dos antimicrobianos na atividade da enzima urease em extratos celulares .....	62
1.4. Efeitos da acidificação e dos antimicrobianos na produção de amônia por biofilmes dental supragengival humano com uréia como substrato .....	63
<b>2. Arginólise .....</b>	<b>64</b>
2.1. Efeitos da acidificação na produção de amônia por células intactas em suspensão e por biofilmes de bactérias SAD-positivas .....	64
2.2. Efeitos de agentes antimicrobianos na arginólise por bactérias intactas em suspensão e em biofilmes .....	64
2.3. Efeitos dos antimicrobianos na atividade das enzimas do SAD em extratos celulares .....	67
2.4. Efeitos dos agentes na captação do substrato arginina por <i>S. sanguis</i> e <i>S. rattus</i> .....	68
2.5. Efeitos da acidificação e dos agentes antimicrobianos na produção de amônia por biofilme supragengival humano com arginina como substrato .....	69
Tabelas 1-3 .....	70
Figuras 1-16 .....	73
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>113</b>
<b>1. Ureólise .....</b>	<b>113</b>

<b>2. Arginólise</b> .....	124
<b>3. Produção de álcalis e relação com doenças orais e sistêmicas</b> .....	132
<b>4. Perspectivas futuras</b> .....	137
<b>CONCLUSÕES</b> .....	140
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	142
<b>ANEXOS</b> .....	169
Anexo 1. Publicação científica – artigo 1 .....	170
Anexo 2. Publicação científica – artigo 2 .....	181

## RESUMO

Fluoreto de sódio, triclosan e ácidos orgânicos fracos: inibidores da síntese de álcalis por suspensões e biofilmes de bactérias orais

Eline Barboza da Silva

Orientadores: Angela Christina Dias de Castro e Robert Edward Marquis

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia) do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

Urease e sistema arginina desaminase (SAD), assim como outros pequenos sistemas, são importantes na produção de amônia em biofilmes orais. O objetivo foi determinar a sensibilidade da urease e do SAD aos antimicrobianos fluoreto de sódio, triclosan e ácidos orgânicos fracos. *Staphylococcus epidermidis* (cepa da Universidade de Rochester), *Streptococcus salivarius* ATCC 13419, *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104, *Streptococcus sanguis* NCTC 10904 e *Streptococcus rattus* FA-1 foram cultivados em suspensões e em biofilmes. Os experimentos também envolveram extratos celulares e biofilme dental supragengival humano. A atividade da urease e do SAD foi estudada em pH 4, 5 e 6 e as ações dos agentes foram determinadas pela alteração na produção de amônia através de uréia ou arginina, respectivamente, e pela inibição da urease ou das enzimas do SAD em extratos celulares. Alterações na captação de arginina marcada radioativamente por *S. sanguis* ou *S. rattus* foram também testadas. A ureólise por suspensões ou biofilmes de *S. epidermidis*, *S. salivarius* ou *A. naeslundii* foi inibida por fluoreto de forma pH-dependente. Resultados com indometacina e caprato, que não inibem a urease diretamente, indicaram que a inibição pelo fluoreto da enzima também é por sua ação ácido-fraca que leva à acidificação do citoplasma celular. Porém, a ligação direta à urease parece ser o mecanismo principal de inibição pelo fluoreto em ambientes ácidos. O fluoreto foi um pobre inibidor de SAD, enquanto triclosan foi altamente potente em suspensões e biofilmes de *S. sanguis* e *S. rattus*. A indometacina foi praticamente tão potente quanto o fluoreto em pH 4, enquanto caprato e laurato foram menos potentes. Os ácidos orgânicos fracos foram mais efetivos em valores de pH baixos. Os principais alvos para os inibidores podem ser sistemas transportadores de membrana para captação de arginina, embora carbamato quinase seja um segundo alvo. Resultados de experimentos com biofilme dental supragengival fresco indicaram que o fluoreto e os outros antimicrobianos podem

inibir a produção de amônia através da uréia ou da arginina “in situ”. Conclui-se que fluoreto, triclosan, indometacina, caprato e laurato podem limitar a atividade da urease e do SAD em biofilmes dentais e isso pode estar relacionado às doenças orais, especialmente cárie e doença periodontal.

Palavras-chave: álcalis, amônia, bactérias orais, biofilmes, fluoreto de sódio, triclosan, ácidos orgânicos fracos, cárie, cálculo dental.

### **ABSTRACT**

Sodium fluoride, triclosan and organic weak acids: inhibitors of alkali synthesis by suspensions and biofilms of oral bacteria

Eline Barboza da Silva

Orientadores: Angela Christina Dias de Castro e Robert Edward Marquis

*Abstract* da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia) do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

Urease and arginine deiminase system (ADS), along with other minor systems, are important for ammonia production in oral biofilms. The objective was to determine the sensitivity of urease and ADS to the commonly used antimicrobials, sodium fluoride, triclosan and organic weak acids. *Staphylococcus epidermidis* (University of Rochester strain), *Streptococcus salivarius* ATCC 13419, *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104, *Streptococcus sanguis* NCTC 10904 and *Streptococcus rattus* FA-1 were grown in suspension cultures and biofilms. The experimental design also involved cell extracts and human supragingival dental biofilms. Urease and ADS activities were assessed at pH values of 4, 5 and 6, and the actions of the agents determined in terms of reduced production of ammonia from urea or arginine, respectively, inhibition of urease or ADS enzymes in cell extracts. Changes in uptake of labeled arginine by *S. sanguis* and *S. rattus* were also tested. Ureolysis by cells in suspensions or biofilms of *S. epidermidis*, *S. salivarius* or *A. naeslundii* was inhibited by fluoride in a pH-dependent manner. Results with indomethacin and capric acid, which do not directly inhibit urease, indicated that weak-acid effects leading to cytoplasmic acidification are also involved in fluoride inhibition. However, direct fluoride inhibition of urease appeared to be the major mechanism for reduction in ureolytic

activity in acid environments. Fluoride was only a poor inhibitor of the ADS, while triclosan was highly effective for *S. sanguis* and *S. rattus* suspension cells and biofilms. Indomethacin was nearly as potent at pH 4 as triclosan, while capric and lauric acids were somewhat less potent. Potencies of the organic weak acids were greater at lower pH values. The major targets for the inhibitors appeared to be transport systems for arginine uptake, although carbamate kinase was a secondary target. Results of experiments with freshly harvested supragingival dental biofilm indicated that fluoride and the other antimicrobials can inhibit ammonia production from urea or arginine "in situ". The conclusion is that fluoride, triclosan, indomethacin, caprate and laurate can limit urease and ADS activity in dental biofilms and it may be related to oral diseases, especially dental caries and periodontal disease.

Key-words: alkali, ammonia, oral bacteria, biofilms, sodium fluoride, triclosan, organic weak acids, dental caries, dental calculus.

## INTRODUÇÃO

As bactérias orais da placa supragengival e subgengival estão organizadas ecologicamente na forma de biofilme. Dessa forma, a fisiologia desses microrganismos contidos nessa comunidade particular é diretamente relacionada à alta densidade populacional, às limitadas difusões de nutrientes e às múltiplas interações metabólicas entre as espécies aí presentes.

Dentre as mais importantes interações entre os microrganismos do biofilme estão àquelas relacionadas com a fisiologia de ácidos e bases. Os efeitos antagônicos de bactérias altamente ácido-tolerantes, como *Streptococcus mutans*, sobre bactérias bem menos tolerantes são bem esclarecidos na literatura. A ação protetora contra efeitos ácidos de bactérias produtoras de álcalis é bem menos definida, mas é, provavelmente, muito importante na ecologia do biofilme bacteriano oral.

Os efeitos protetores do *sistema arginina desaminase* (SAD) contra danos pela ação ácida foram mostrados claramente nas bactérias SAD-positivas, como *Streptococcus rattus* (reclassificado recentemente como *S. rattii*), *Streptococcus sanguis* (reclassificado recentemente como *S. sanguinis*) e *Streptococcus gordonii*. Da mesma forma, essa proteção parece ser conferida pela enzima *urease* de bactérias como *Streptococcus salivarius* e *Actinomyces naeslundii*, assim como pela fermentação de aminoácidos por bactérias periodontopatogênicas como *Porphyromonas gingivalis*.

Por outro lado, agentes químicos com atividade na membrana plasmática e no citoplasma bacteriano, como fluoretos de sódio e alguns ácidos orgânicos fracos e parabenos, podem interferir na síntese de ácidos, assim como na síntese de álcalis por bactérias orais. Geralmente, estas substâncias estão presentes em produtos de higiene oral ou são utilizadas como medicação antiinflamatória ou como conservantes em alimentos e cosméticos.

Dessa forma, mostra-se necessária uma análise mais abrangente do funcionamento e da regulação da fisiologia ácido-básica bacteriana, no biofilme oral, assim como das interações de agentes químicos nesse ambiente, para que se possa compreender como a síntese de álcalis influencia o estabelecimento e a progressão de doenças orais, principalmente a cárie dental e a doença periodontal.

## **1. ECOLOGIA MICROBIANA ORAL**

## **1.1. Microbiota Indígena e Ecossistema Oral**

A microbiota indígena humana e de animais exerce um papel fundamental no processo saúde-doença. Ela contribui para o desenvolvimento do sistema imune e previne a colonização por microorganismos patogênicos, além de servir como reservatório para outras bactérias potencialmente patogênicas que podem causar doença no hospedeiro (McNABB & TOMASI, 1981; BOWDEN, ELLWOOD & HAMILTON, 1979).

A microbiota oral compreende um grupo diverso e complexo de microrganismos, tais como bactérias, incluindo micoplasmas, fungos, protozoários e, possivelmente, vírus transitórios. As bactérias formam o grupo predominante e há, provavelmente, 350 a 500 espécies bacterianas cultiváveis diferentes e um outro grande número de bactérias não cultiváveis, identificadas por técnicas moleculares (SAMARANAYAKE, 2002 a).

Geralmente, a microbiota oral indígena está associada à etiologia de duas principais patologias bucais, a cárie dental e a doença periodontal, que dessa forma podem ser consideradas provenientes de infecções endógenas. Essas doenças são endêmicas em países industrializados e de alta incidência em países em desenvolvimento (ten CATE, 2001).

As doenças orais, inclusive candidíase, que é uma infecção da mucosa oral pela levedura *Candida* spp. (TORRES *et al.*, 2002), parecem ser estimuladas por um desequilíbrio ecológico na microbiota oral indígena, levando ao crescimento exacerbado de determinadas espécies de bactérias ou leveduras potencialmente patogênicas. Assim, para a determinação do processo patológico na cárie dental e na doença periodontal é preciso entender a ecologia microbiana e estabelecer os fatores responsáveis por essa transição entre uma relação comensal ou patogênica dos microrganismos com seu hospedeiro (MARSH & MARTIN, 1999).

Esses fatores, que regulam a seleção de microrganismos orais, são relacionados ao hospedeiro, aos microrganismos, ao meio ambiente bucal e ao meio externo (MARCOTTE & LAVOIE, 1998). Dentre os fatores relacionados ao hospedeiro, encontram-se mecanismos de defesa, tanto inatos quanto adaptativos, como a secreção salivar de Imunoglobulinas A e G, idade, alterações hormonais, estresse, fatores genéticos e anatomia da mucosa oral e dos dentes, assim como sua composição. Os fatores associados aos microrganismos são aderência, interações microbianas e presença de fatores de virulência. Os fatores do meio ambiente oral são físico-químicos e incluem temperatura, pH, potencial de óxido-redução e disponibilidade de nutriente e água, proveniente do fluxo salivar, principalmente. Por fim, os fatores externos abrangem dieta, fumo, higiene oral, agentes antimicrobianos, como fluoreto e parabenos presentes em dentifrícios e em soluções de bochechos, antibióticos e outros medicamentos que alteram a microbiota oral e o fluxo salivar normal do hospedeiro.

A transição de saúde à doença depende de alterações na composição e no metabolismo das populações microbianas dos biofilmes que colonizam os tecidos duros (dentes) e moles bucais tais como mucosa do palato, bochechas, língua, assoalho de boca e gengiva (BURNE, 1998). O desenvolvimento de cárie dental é diretamente relacionado aos ciclos repetidos de acidificação da placa bacteriana dental, que favorecem a prevalência de bactérias ácido-resistentes e a diminuição da colonização daquelas menos acidogênicas e acidúricas. Similarmente, a doença periodontal é resultante de alterações no ambiente oral que favorecem o crescimento de bactérias proteolíticas periodontopatogênicas e seu acúmulo sobre os tecidos de suporte dentários, facilitando a progressão da doença periodontal.

## **1.2. Biofilme: Composição, Estrutura e Metabolismo**

As bactérias do ecossistema se apresentam organizadas na forma de biofilme numa prevalência de 99,9% (COSTERTON *et al.*, 1995). Os biofilmes colonizam uma enorme variedade de habitats no meio-ambiente, como por exemplo, superfície de barcos, ancoradouros, encanamentos de água e rochas de rios.

Os biofilmes são formados por diversos microrganismos, principalmente bactérias, firmemente aderidos às superfícies sólidas de ambientes aquosos, envolvidos por uma matriz exopolimérica auto-

sintetizada (COSTERTON, STEWART & GREENBERG, 1999; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2002). Fungos, protozoários e vírus podem estar presentes transitoriamente.

Os biofilmes não são formados por monocamadas homogêneas estruturais de células, mas sim, por uma estrutura heterogênea de composição microbiana, com potencial de organização, deslocamento e reorganização das células sobre as mesmas ou outras superfícies (DAVEY & O'TOOLE, 2000).

As microcolônias, agregados microbianos iniciais, formam as unidades básicas estruturais dos biofilmes, cuja constituição é cerca de 15% de células e de 85% de matriz (por volume). Canais de água são encontrados entre as microcolônias, representando um sistema circulatório primitivo que leva nutrientes para dentro dos biofilmes e metabólitos para fora destes (DUNNE Jr, 2002).

Particularidades comuns aos biofilmes incluem taxa de crescimento diferenciada em relação às células planctônicas, difusão de substratos para o interior dos filmes e de produtos para fora mediada pelo tamanho e pela carga das moléculas, múltiplas interações metabólicas entre os organismos nas comunidades, estratificação das espécies microbianas pelos distintos tipos fisiológicos e resistência geral dos microrganismos às influências adversas do ambiente, incluindo células fagocitárias, amebas, anticorpos, bacteriófagos e antimicrobianos (DONLAN & COSTERTON, 2002; LEWIS, 2001).

A adesão eficiente entre os microrganismos e aos tecidos orais do hospedeiro tem sido relatada como resultado da comunicação sofisticada entre as bactérias (KOLENBRANDER *et al.*, 2002). Essa comunicação é chamada de *Quorum Sensing* e é responsável por regular não só a adesão celular, mas também a expressão de outros genes específicos das células do biofilme, através do acúmulo de compostos sinalizadores (produtos do gene *lux*) que coordenam a comunicação intercelular. Esta comunicação é dependente da densidade microbiana no biofilme. O *Quorum Sensing* pode regular tanto a expressão de genes de resistência a determinados antimicrobianos como também favorecimento de espécies microbianas benéficas ao biofilme (DUNNES Jr, 2002). Esse sistema de sinalização não é o único modo de transferência de informação no biofilme. A alta densidade populacional nessa comunidade favorece a troca de material genético entre as células da mesma espécie, do mesmo gênero ou de outros gêneros, seja por transformação, conjugação, transferência de plasmídeos ou de transposons (ROBERTS *et al.*, 1999).

Os biofilmes bacterianos causam cerca de 65% das infecções em humanos (POTERA, 1999), levando ao desenvolvimento de doenças crônicas como fibrose cística, otite média e endorcadite. Os biofilmes também são capazes de colonizar catéteres venosos e urinários, válvulas protéticas e lentes de contato.

Os microrganismos tanto da placa dental supragengival como da subgengival e da mucosa oral também são organizados em comunidades de biofilmes (BURNE & MARQUIS, 2001). Essas comunidades possuem ecologia e fisiologia peculiares, relacionadas em parte à alta densidade de microrganismos no biofilme, determinando uma competição na população por sobrevivência. As bactérias aí presentes apresentam características fisiológicas e expressão genética diferenciadas em relação às células planctônicas (BURNE, QUIVEY & MARQUIS, 1999).

Desta maneira, biofilmes orais são associados também à etiologia de carie dental, gengivite, doença periodontal destrutiva e estomatite por dentadura (KOLENBRANDER, 2000; KOLENBRANDER *et al.*, 1999). Até mesmo a halitose parece ser resultado de atividades de biofilmes que colonizam o dorso da língua. Assim, a compreensão detalhada da composição e do metabolismo dessa forma de organização microbiana parece ser a chave para a compreensão do mecanismo de patogenicidade, desenvolvimento, prevenção e tratamento de doenças infecciosas orais, bem como dos mecanismos de patogenicidade dos microrganismos relacionados a estas infecções.

Os biofilmes dentais são firmemente aderidos à película adquirida dos dentes ou às superfícies subgengivais, como aquelas em bolsas periodontais. Neste ambiente, alguns microrganismos podem formar agregados celulares livres dentro do espaço da bolsa, encontrando-se, ainda assim, em populações altamente densas e firmemente aderidas umas às outras.

### **1.3. Biofilme Oral de Indivíduos Sadios**

A distribuição da microbiota varia quantitativa e qualitativamente, dependendo do habitat bucal. Estreptococos do grupo *mutans* (dentre eles a espécie *S. rattus*) e *S. sanguis* são encontrados em grande parte sobre os dentes, enquanto que *S. salivarius* são encontrados no dorso da língua. *S. mutans* e *S. sanguis* só estão presentes nos biofilmes orais após a erupção dos dentes (SMITH *et al.*, 1993).

#### **1.3.1. Biofilme Dental: Supragengival e Subgengival**

A composição microbiana do biofilme dental varia de acordo com o sítio bucal colonizado e se desenvolve, preferencialmente, em locais onde há menor estresse mecânico e maior retenção, como nas áreas interproximais (entre dois dentes contíguos), no sulco gengival e nas fissuras dos dentes molares e pré-molares.

Os organismos freqüentemente isolados do biofilme dental supragengival são bactérias Gram-positivas e anaeróbias facultativas, como *Actinomyces* spp. e *Streptococcus* spp. Muitos *Staphylococcus* spp.

também são isolados da cavidade oral de indivíduos sadios (do SOUTO, 2007). Em menores proporções são isoladas bactérias Gram-negativas, como dos gêneros *Veillonella*, *Haemophilus* e *Bacteroides* (MARSH, 1994).

No sulco gengival sadio, o número de bactérias cultiváveis é muito pequeno ( $10^3$  a  $10^6$  ufc/sulco) e o biofilme é formado também por bactérias Gram-positivas (*Actinomyces* spp. e *Streptococcus* spp.), como uma continuação do biofilme supragengival. Os bacilos Gram-negativos, como *P. gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* e *Prevotella intermedia* são raramente isoladas no sulco gengival saudável (MARSH & MARTIN, 1999).

### **1.3.2. Biofilme de Superfície Mucosa Oral**

A mucosa da gengiva, palato, bochechas e assoalho bucal é colonizada por poucos organismos (0 a 25 ufc/célula epitelial), sendo os mais isolados as bactérias *S. sanguis*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus vestibularis*, seguidas de *Neisseria*, *Haemophilus* e *Veillonella*. Por outro lado, a mucosa da língua apresenta uma alta concentração microbiana (100 ufc/célula epitelial), tais como, *Streptococcus* spp. (*S. salivarius* e *S. mitis*) e *Veillonella* spp. (BOWDEN, ELLWOOD & HAMILTON, 1979). Outros grupos bacterianos incluem *Peptostreptococcus* spp. e bacilos (*Actinomyces* spp. e *Bacteroides* spp.). Em menores números são encontrados bacilos

anaeróbicos obrigatórios produtores de pigmento negro e espiroquetas, sugerindo que a língua pode servir como um reservatório de bactérias periodontopatogênicas (van der VELDEN *et al.*, 1986).

#### **1.4. Formação do Biofilme Oral e Relação com Doenças**

O desenvolvimento do biofilme dental ocorre num padrão de sucessão microbiana controlado por diversos fatores, citados no item 1.1.

A comunicação intermicrobiana é essencial para a colonização dos dentes e subsequente formação do biofilme, requerendo um contato físico específico entre as bactérias colonizadoras e entre estas e o hospedeiro. As alterações espaço-temporais nas populações bacterianas durante a colonização dentária são ordenadas e seqüenciadas (KOLENBRANDER *et al.*, 2002). Com a aderência de cada nova espécie bacteriana, uma superfície nova é exposta para a aderência de outra espécie, resultando numa progressão de novas superfícies e alterações concomitantes na diversidade microbiana (SOCRANSKY *et al.*, 1998).

Imediatamente após a escovação dos dentes, inicia-se a adsorção de uma camada acelular à superfície dental, denominada película adquirida do esmalte, composta por substâncias da saliva e do fluido crevicular (fluido do sulco gengival), como proteínas (albumina, lisozima e proteínas ricas em prolina), glicoproteínas (mucina,

lactoferrina, IgA, IgG e amilase), fosfoproteínas (estaterina) e lipídeos. Enzimas extracelulares bacterianas, como glicosiltransferases, e produtos de lise celular também estão presentes (NYVAD, 1993).

A película adquirida é colonizada por bactérias nas primeiras duas a quatro horas após a higienização dentária e cada grupo de moléculas dessa superfície representa um receptor para as bactérias orais colonizadoras iniciais. Os microrganismos pioneiros são os estreptococos (*S. gordonii*, *S. sanguis*, *S. oralis* e *S. mitis*), que representam cerca de 60 a 90% das bactérias colonizadoras iniciais e promovem aderência específica com a superfície da película adquirida e com a superfície de outras bactérias desse mesmo gênero (coagregação intragênica) (KOLENBRANDER & LONDON, 1993). As bactérias com baixa afinidade pela película são eliminadas pelo fluxo salivar.

Outros colonizadores iniciais incluem *Actinomyces* spp. e, em menor número, *Capnocytophaga* spp., *Eikenella* spp., *Haemophilus* spp., *Neisseria* spp., *Prevotella* spp., *Propionibacterium* spp. e *Veillonella* spp. Estes promovem a agregação entre eles e com os estreptococos pioneiros (coagregação intergênica) (KOLENBRANDER *et al.*, 2002).

Após a colonização inicial, as bactérias crescem rapidamente, formando as microcolônias envoltas pela matriz extracelular composta por substâncias bacterianas e do hospedeiro. Algumas inter-relações bacterianas como coagregação, síntese de bacteriocinas e cadeia alimentar aumentam a diversidade da comunidade

bacteriana. Da mesma forma, o consumo de oxigênio por determinadas espécies promove a colonização por bactérias anaeróbias como *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides* spp. e espiroquetas.

Se o biofilme bacteriano se acumula sobre a superfície dentária supra ou subgengival, a complexidade da microbiota oral aumenta até atingir o seu clímax. Esta alta diversidade microbiana, associada à presença de determinados fatores no meio ambiente bucal, pode favorecer o estabelecimento de espécies microbianas específicas no biofilme, levando a um desequilíbrio ecológico que pode predispor o hospedeiro ao desenvolvimento de doenças orais (BURNE, 1998).

## **1.5. Biofilme Oral Patogênico**

### **1.5.1. Cárie Dental**

A cárie dental é uma doença infecciosa e transmissível que acomete a maior parte da população humana em todo o mundo.

Esta doença é caracterizada por desintegração localizada e progressiva da estrutura dentária, associada à placa dental na superfície lisa do dente, em sulcos e fissuras ou sobre a superfície radicular que é exposta ao meio ambiente bucal após recessão gengival.

Os agentes etiológicos da doença cárie são bactérias presentes no biofilme dental supragengival capazes de catabolizar carboidratos provenientes da dieta do hospedeiro ou provenientes de glicoproteínas salivares, levando a subsequente produção de ácidos. Esses ácidos orgânicos são responsáveis pela dissolução dos tecidos mineralizados dos dentes, que incluem esmalte, dentina e cemento radicular. O pH em que se inicia a desmineralização é conhecido como pH crítico e varia de 5,0 a 5,5 (LOESCHE, 1993).

Sendo a cárie uma doença multifatorial, o seu desenvolvimento depende basicamente da inter-relação de três fatores, quais sejam, a presença de bactérias (biofilme dental), carboidratos (originados da dieta) e de dentes anatômica e quimicamente susceptíveis (hospedeiro), conhecida como tríade de Keyes. Em seguida, esta tríade foi adaptada, considerando-se também a presença da saliva (composição, fluxo e capacidade tampão) e o tempo

como condições relevantes para o estabelecimento e a progressão dessa doença (SAMARANAYAKE, 2002b; van HOUTE, 1994).

A desmineralização e remineralização dos dentes ocorrem de forma cíclica. Por exemplo, após a ingestão pelo hospedeiro de açúcares fermentáveis, como lactose, frutose, glicose e principalmente sacarose, a placa dental se torna acidificada, geralmente atingindo valores de pH tão baixos quanto 4,0, o que resulta em desmineralização da estrutura dentária (SCHACHTELE & JANSEN, 1982). Se os açúcares não são mais consumidos por um período de tempo, o pH da placa bacteriana se eleva gradualmente. Essa elevação ocorre em grande parte por difusão dos ácidos através da saliva e por sua capacidade tampão, assim como também pela produção de álcalis por bactérias do biofilme oral (BURNE & MARQUIS, 2000).

A saliva é supersaturada por íons cálcio e fosfato e as fases de remineralização e reparo dentário ocorrem com a contribuição desses íons quando o pH do ambiente bucal se encontra mais elevado. A cárie ocorre quando o ciclo de remineralização-desmineralização não é propriamente equilibrado, o que acontece quando o hospedeiro ingere açúcares com freqüência em curto espaço de tempo (ELDER & NANCOLLAS, 1995).

Estudos com animais de laboratório foram muito valiosos, já na década de 60, para a elucidação dos principais agentes etiológicos da cárie dental. Estes estudos demonstraram que os estreptococos poderiam induzir cárie em roedores alimentados com uma dieta cariogênica (FITZGERALD & KEYES, 1960). Esses

estudos colaboraram para o desenvolvimento da hipótese da placa específica, que propõe que somente alguns microrganismos são os responsáveis por causarem essa doença (MARSH, 1991).

Assim, os maiores agentes considerados causadores da doença cárie são, os estreptococos do grupo *mutans*, que iniciam e desenvolvem a doença, além de bactérias como *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei*, especialmente presentes em cárie de fissuras dentárias, que estão envolvidas somente na progressão e não no início da doença (LOESCHE, 1986). *A. naeslundii* genoespécie 1 e *A. naeslundii* genoespécie 2 (anteriormente denominado *Actinomyces viscosus*) estão presentes principalmente nas cáries de superfície de raízes dentárias (BOWDEN, 1990).

Porem, toda bactéria capaz de sintetizar ácidos que contribuam para a acidificação do biofilme dental pode ser considerada agente etiológico da doença cárie e esse é o princípio para a teoria da placa cariogênica não-específica (MARSH, 1991).

Para ser cariogênica, a bactéria precisa ser capaz de se aderir à película adquirida adsorvida à superfície dos dentes ou se aderir ao biofilme dental preformado, por adesinas, como a proteína SpaP, ou por ligações iônicas ou hidrofóbicas, e se estabelecer como membro significativo dessa comunidade microbiológica diversa (KOLENBRANDER *et al.*, 2002).

As bactérias devem também sintetizar polímeros de glicana insolúveis (polissacarídeos), cuja síntese é catalisada pela enzima glicosiltransferase (GTF) bacteriana a partir de sacarose, que facilitam a aderência inicial dessas células ao dente e promovem a formação de biofilmes ricos em polissacarídeos (YAMASHITA *et al.*, 1993). Além dos exopolímeros, as bactérias do biofilme oral podem acumular polissacarídeos intracelulares, uma vez descritos por Gibbons & Socransky em 1962, que têm um papel fundamental como substratos na síntese de ácidos orgânicos na ausência de açúcares fermentáveis no meio oral.

Após estabelecidas na matriz do biofilme, as bactérias precisam ter a capacidade de realizar glicólise, mantendo a síntese de ácidos em ambientes com valores de pH cada vez mais baixos, aumentando ainda mais a acidificação da placa bacteriana e a desmineralização dentária (BURNE, 1995).

E, finalmente, as bactérias precisam ser ácido-tolerantes (acidúricas), crescendo e realizando glicólise em ambientes com valores de pH extremamente baixos (BENDER & MARQUIS, 1987). *Streptococos* do grupo *mutans* podem realizar glicólise em ambientes com pH em torno de 3,7, que é aproximadamente o pH mínimo da placa cariogênica (CASIANO-COLÓN & MARQUIS, 1988). Essa ácido-tolerância bacteriana se deve principalmente à presença, em níveis elevados, da enzima ATPase translocadora de prótons (F-ATPase) ligada à membrana das células (BELLI & MARQUIS, 1991).

Assim, a membrana celular tem um papel fundamental na regulação ácido-básica bacteriana. Quando esses microrganismos produzem ácidos ou estão em ambiente ácidos, o pH do citoplasma celular é mantido maior do que o pH externo, devido a ação das F-ATPases. Estas bombeiam prótons H<sup>+</sup> para fora da célula em associação à hidrólise da ATP. Essa diferença de pH, chamada  $\Delta$ pH, é vital, porque preserva o funcionamento de sistemas celulares sensíveis ao ácido, como as enzimas glicolíticas (BENDER, SUTTON & MARQUIS, 1986).

Os fatores de virulência descritos acima para caracterização de bactérias cariogênicas não são constitutivamente sintetizados, dependendo de condições do ambiente para sua expressão e modulação. Assim, a expressão diferenciada desses fatores de virulência é o fator principal que determina o acúmulo de determinados microrganismos no biofilme patogênico (BURNE, 1998).

Por esta razão, estudos de cárie dental na ausência de estreptococos do grupo *mutans* em sítios cariados, sugeriram o papel de outras bactérias no desenvolvimento da doença. Por outro lado, estudos em que esses estreptococos foram encontrados em altos números, não mostraram desmineralização do esmalte dentário subjacente, provavelmente devido à presença de bactérias consumidoras de lactato, como *Veilonella*, ou bactérias produtoras de álcalis em pH baixo, como *S. salivarius* e *S. sanguis*, além também da composição, da capacidade tampão e do fluxo salivar do hospedeiro.

Deste modo, esses estudos levaram ao desenvolvimento de uma terceira teoria, a teoria da placa ecológica. De acordo com esta hipótese, bactérias cariogênicas naturalmente encontradas no biofilme oral são fracamente competitivas e se encontram em baixa proporção. Com dieta convencional, os níveis dessas bactérias são insignificantes, permitindo a manutenção do equilíbrio entre os ciclos de mineralização e desmineralização. Com o aumento de consumo de carboidratos fermentáveis, o pH do biofilme diminui e permanece baixo por longo período de tempo, permitindo o crescimento e a manutenção de bactérias acidúricas nesse biofilme, com a diminuição das não ácido-resistentes (MARSH & MARTIN, 1999).

### **1.5.2. Doença Periodontal**

Doença periodontal é um termo geral usado para descrever o estado inflamatório patológico dos tecidos de suporte e proteção dentários, devido ao acúmulo bacteriano. Pode ser dividido em dois grandes grupos, gengivite e periodontite (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2002).

A prevalência da doença periodontal aumenta com a idade do indivíduo e como maior é a expectativa de vida mundial e maior a retenção de dentes, o número de pessoas desenvolvendo essa doença provavelmente aumentará nas próximas décadas (OLIVER, BROWN & LÖE, 1998; PAPAPANOU, 1996).

Gengivite é a inflamação dos tecidos gengivais sem perda óssea alveolar ao redor dos dentes e sem haver migração apical do epitélio juncional. A periodontite se caracteriza pela destruição dos tecidos de suporte dentário, como osso alveolar e ligamento periodontal. Nesse caso, o sulco gengival é aprofundado, pela migração apical do epitélio juncional formando a bolsa periodontal (LOESCHE & GROSSMAN, 2001). O sangramento gengival e a perda de inserção tecidual associados a esse processo patológico são indolores e, por isso, ignorados pelos indivíduos em geral.

A indução e a progressão da destruição dos tecidos periodontais é um processo que envolve acúmulo de biofilme dental, liberação de substâncias bacterianas, como enzimas e endotoxinas (LPS), causando destruição tecidual diretamente e, indiretamente, pela indução de resposta inflamatória do hospedeiro (GENCO, 1992). A resposta inflamatória do hospedeiro aos antígenos bacterianos é tanto protetora quanto destrutiva nas doenças periodontais. O dano aos tecidos pode ser causado pela liberação de enzimas lisossomais dos fagócitos e pela produção de citocinas que estimulam o tecido conjuntivo a liberar metaloproteinases (colagenase) ou citocinas que ativam a reabsorção óssea.

A gengivite está associada ao acúmulo de placa dental ao redor da margem gengival, promovendo a inflamação desse tecido. O número de células bacterianas nesse biofilme dental é cerca de 10 a 20 vezes maior que em sítios saudáveis, com a permanência da predominância de bactérias Gram – positivas e um aumento no

número de bactérias Gram-negativas anaeróbias obrigatórias. A diversidade microbiana aumenta, mas não há grupo específico bacteriano associado à gengivite (MOORE *et al.*, 1987). Esse quadro é representativo da hipótese da placa dental não-específica relacionada à doença periodontal.

As bactérias Gram-positivas predominantes na gengivite são *A. naeslundii*, genoespécie 1, *A. naeslundii*, genoespécie 2, *S. sanguis*, *S. mitis* e *Peptostreptococcus micros*, enquanto as Gram-negativas são *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *Veillonella*, *Wolinella*, *Capnocytophaga* e *Haemophilus*.

Periodontite crônica é a forma mais comum de doença periodontal destrutiva. A microbiota associada a essa condição é extremamente diversa e pode ser composta por mais de 150 espécies microbianas, predominando um grande número de bactérias anaeróbias estritas Gram-negativas e espiroquetas (MOORE *et al.*, 1993). A microbiota difere em composição entre as bolsas periodontais entre diferentes indivíduos e num mesmo indivíduo.

O biofilme subgengival de indivíduos com periodontite crônica é composto principalmente por espécies bacterianas separadas em complexos de cores como didaticamente classificadas por Socransky *et al.* (1998). Nessa condição patológica, as bactérias dos complexos vermelho (*P.gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*) e laranja (*P. intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *F. nucleatum* e *P. micros*) são as predominantes, seguidas de espécies de *Actinomyces*. Os biofilmes supragengivais presentes em indivíduos com periodontite apresentam alta

prevalência de *A. naeslundii*, genoespécie 1, *Actinomyces israelii*, *Neisseria mucosa*, *S. gordonii* e de espécies dos complexos verde (*Capnocytophaga ochracea* e *Capnocytophaga sputigena*) e roxo (*Veillonella parvula* e *Actinomyces odontolyticus*) (XIMÉNES-FYVIE, HAFFAJEE & SOCRANSKY, 2000).

Assim esses estudos sugerem a especificidade da placa dental subgingival como primordial no estabelecimento e desenvolvimento de doenças periodontais. Certas formas mais rápidas e agressivas da doença são associadas às alterações hormonais ou à depressão do sistema imune do hospedeiro que podem favorecer o crescimento de grupos específicos de microrganismos, como os *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (recentemente denominado *Agregobacter actinomycetemcomitans*), na periodontite agressiva.

Por outro lado, a hipótese da placa dental ecológica, assim como para a cárie dental, também pode ser utilizada para explicar o papel dos microrganismos na doença periodontal (MARSH & MARTIN, 1999). Em sulcos gengivais saudáveis, prováveis bactérias periodontopatogênicas como *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e espiroquetas não são detectadas ou estão presentes em número muito pequeno. Na ausência de higiene oral, ocorre o acúmulo de biofilme subgingival composto por estas bactérias que leva à inflamação e ao acúmulo e ao aumento do fluxo crevicular, que é muito semelhante ao plasma em relação à composição. Esse fluido pode prover nutrientes para o crescimento de bactérias fastidiosas Gram-negativas anaeróbias estritas envolvidas na destruição periodontal.

## 2. SÍNTESE DE ÁLCALIS ORAIS

As principais fontes de álcalis no ambiente oral são provenientes da hidrólise da uréia e da arginina salivares. A síntese desses álcalis é catalisada pela enzima urease e pelo sistema arginina desaminase (SAD), respectivamente, de determinadas bactérias orais.

Além desses dois sistemas, álcalis também são provenientes de reações catalisadas por desaminases bacterianas que agem sobre aminoácidos ou oligopeptídeos bucais. Outro mecanismo de alcalinização do meio bucal é também realizado por organismos como *Veillonella* spp., que se encontram em forte associação com os estreptococos homofermentativos e os lactobacilos, e podem consumir o ácido láctico (baixo pKa), colaborando para um aumento global no pH do ambiente oral (BURNE & MARQUIS, 2000). De outra forma, *S. mutans* possui o sistema agmatina desaminase (SAGD) que cataboliza a agmatina, um derivado descarboxilado da arginina, sintetizando amônia e elevando o pH do meio (GRISWOLD, JAMESON-LEE & BURNE, 2006).

Sabe-se atualmente que a produção de álcalis é também importante para a diminuição da cariogenicidade do biofilme dental. Porém, a síntese desses álcalis pode resultar também na maior tendência à formação de cálculos sobre as superfícies dentárias.

## 2.1. Hidrólise de Uréia

A saliva contém altos níveis de uréia, aproximadamente, 3 a 10 mM, que são os mesmos do soro. A hidrólise da uréia da saliva pode ocorrer no biofilme bacteriano dental ou em associação aos tecidos moles. Esta é rapidamente hidrolisada a amônia e CO<sub>2</sub> por ureases bacterianas (BURNE & MARQUIS, 2000).

A enzima urease é amplamente distribuída entre as bactérias na natureza e tem um papel muito importante no metabolismo de nitrogênio (MOBLEY, ISLAND & HAUSINGER, 1995).

Recentemente, Burne & Chen (2000) revisaram o papel de ureases bacterianas nas doenças infecciosas, incluindo infecção gástrica por *Helicobacter pylori*, infecções do trato urinário por Enterobacteriaceae ou *Ureaplasma urealyticum* e infecções orais, incluindo a cárie dental, formação de cálculos e doença periodontal.

As principais bactérias Gram-positivas ureolíticas na boca são *S. salivarius* e *S. vestibularis*, associadas à microbiota de tecidos moles. Nos biofilmes associados aos dentes, as bactérias urease-positivas mais predominantes são também Gram-positivas, como *A. naeslundii*, e estafilococos, principalmente *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* (SISSONS *et al.*, 1988; WIJEYEWEERA & KLEINBERG, 1989). *S. epidermidis* foi encontrado como uma

das bactérias mais ureolíticas do biofilme dental (SALAKO & KLEINBERG, 1989). Encontram-se também muitas espécies Gram-negativas ureolíticas como *H. parainfluenzae* no biofilme dental.

A urease é uma metalo-enzima que contém níquel no seu sítio ativo e catalisa a degradação de uma molécula de uréia, gerando duas moléculas de amônia e uma de CO<sub>2</sub> (MOBLEY, ISLAND & HAUSINGER, 1995). A reação envolve desaminação da uréia, liberando amônia (NH<sub>3</sub>) e carbamato. Este, então, é espontaneamente hidrolisado na água e ácido carbônico e outra molécula de amônia são liberados.

Embora a reação catalítica seja relativamente simples, a biogênese da urease funcional é um processo altamente complexo, que exige no mínimo sete genes organizados em operons. A apoenzima da urease é composta de três produtos dos genes *ureABC*, que codificam as subunidades enzimáticas  $\gamma$ ,  $\beta$  e  $\alpha$ , respectivamente. As subunidades são organizadas numa configuração  $(\alpha\beta\gamma)_3$  com seis íons níquel no seu sítio ativo. Quatro produtos genéticos, codificados pelos genes *ureDEFG*, são considerados chaperonas que agem facilitando a incorporação de níquel e CO<sub>2</sub> no sítio ativo da enzima (PARK & HAUSINGER, 1995).

O ácido carbônico liberado pela hidrólise da uréia pode rapidamente se difundir para fora da célula e se dissociar em CO<sub>2</sub> e água. Em seguida, o CO<sub>2</sub> pode se equilibrar com o presente na atmosfera. O valor de pKa para a reação  $\text{H}_2\text{CO}_3 \rightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$  é 6,0, mas num sistema aberto, o bicarbonato é perdido pela liberação de CO<sub>2</sub>.

A amônia se torna protonada no interior da célula para formar  $\text{NH}_4^+$ . O valor pKa dessa reação é 9,2, sendo então quase toda a amônia protonada no interior das células, resultando em alcalinização do citoplasma.

Organismos ureolíticos possuem a capacidade de captar quantidades mínimas de níquel do ambiente através da síntese de sistemas de transporte de alta afinidade, como aqueles de *H. pylori* (MOBLEY, GARNER & BAUERFILED, 1995). Similarmente, bactérias que utilizam a ureólise como proteção contra ambientes ácidos, como *S. salivarius*, geralmente possuem um gene *ureI* que codifica um transportador de uréia ligado à membrana plasmática e associado a um canal de  $\text{H}^+$  (CHEN, CLANCY & BURNE, 1996), facilitando a captação de uréia em concentrações de micromolar quando o ambiente possui pH baixo.

No biofilme dental, a capacidade bacteriana de captar uréia em pequena concentração com eficiência pode oferecer a essas bactérias uma vantagem competitiva, pois a ureólise protege os microrganismos contra a morte por acidificação e pode prover uma fonte de nitrogênio para o metabolismo bacteriano (CHEN, WEAVER & BURNE, 2000; MOROU-BERMÚDEZ & BURNE, 1999).

A alcalinização do citoplasma promovida pela amônia pode energizar a síntese de ATPs que envolve a F-ATPase da membrana. A medida que os prótons  $\text{H}^+$  fluem para dentro das células, por causa do  $\Delta\text{pH}$  através da membrana celular, ATP é sintetizado pela ação da F-ATPase que tem, nesse caso, a função de síntese.

A expressão de ureases bacterianas pode ser constitutiva, mas é geralmente regulada por fatores do ambiente. Demonstrou-se que a transcrição de genes codificadores de urease de *A. naeslundii* é direcionada por um regulador positivo e a limitação de nitrogênio no meio aumenta a transcrição, enquanto o crescimento em meio rico em peptídeos e aminoácidos é altamente repressivo para a síntese de urease (MOROU-BERMÚDEZ, 1999).

Um outro mecanismo de controle da expressão da urease é o de *S. salivarius* (SISSONS *et al.*, 1990). A expressão da urease é quase completamente reprimida em crescimento ou pela disponibilidade de nutrientes no meio. Em ambientes ácidos, os genes da urease são rapidamente desreprimidos e, então, a sua expressão se torna sensível à disponibilidade de carboidratos e à taxa de crescimento, com os maiores níveis de expressão sob condições de excesso de carboidratos e rápida taxa de crescimento (CHEN & BURNE, 1996).

## **2.2. Hidrólise de Arginina**

As bactérias orais SAD-positivas podem utilizar a arginina livre presente na dieta do hospedeiro ou a secretada na saliva em concentrações em torno de 50 $\mu$ M. A arginina é também abundante em peptídeos salivares e proteínas e pode ser liberada por proteases ou peptidases bacterianas ou do meio ambiente oral (van WUYCKHUYSE *et al.*, 1995). Este autor também encontrou que os níveis de arginina e lisina de peptídeos contendo

esses aminoácidos na saliva da glândula parótida de adultos sem cáries foram significativamente maiores de que os de adultos com história de cárie. O sistema arginina desaminase (SAD) é considerado, primordial e exclusivamente, um sistema bacteriano. A enzima-chave, arginina desaminase (AD), foi encontrada somente em bactérias.

A arginina é o substrato para o SAD, mas esta é também uma fonte de nitrogênio para a produção de óxido nítrico (NO) e a enzima NO-sintase é relacionada à arginina desaminase. O NO pode ser produzido pelas bactérias, durante o curso de denitrificação (STORZ & IMLAY, 1999).

O SAD foi identificado em uma grande variedade de bactérias, tanto eubactérias como arqueas, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus* spp., micoplasmas, halobactérias, bactérias ácido-láticas e bactérias orais (CUNIN *et al.*, 1986).

As principais bactérias orais SAD-positivas são *S. rattus*, *S. gordonii*, *S. sanguis*, *S. parasanguis*, *Streptococcus anginosus*, *L. fermentum* e alguns outros lactobacilos e espiroquetas (BURNE & MARQUIS, 2000).

Organismos como *P. gingivalis* produzem uma enzima arginina desaminase que catalisa a desaminação do grupo guanidina da terminação carboxílica de resíduos de arginina de peptídeos intactos e proteínas (McGRAW *et al.*, 1999).

Bacilos Gram- positivos assacarolíticos anaeróbios estritos, envolvidos na patologia de doenças periodontais são SAD-positivos e a ornitina produzida pelo SAD pode ser substrato para a produção de butirato, que pode induzir inflamação periodontal (UEMATSU *et al.*, 2003).

Mutações no SAD de *S. gordonii* foram relacionadas à tolerância à penicilina (CALDELARI *et al.*, 2000), embora a relação seja na verdade através de CcpA, o determinante catabólico de carbono (BIZZINI, ENTENZA & MOREILLON, 2007).

Para *S. gordonii*, uma proteína “Fnr-like” (Flp) é requerida para a expressão ótima do operon do SAD e para indução anaeróbica (DONG, CHEN & BURNE, 2004).

A outra função relevante do sistema é na fisiologia de ácidos e bases, servindo como proteção contra o estresse ácido em bactérias orais ácido-láticas (CASIANO-COLÓN & MARQUIS, 1988). Esta parece ser a função primária do sistema para a maioria das bactérias orais (CURRAN, LIEOU & MARQUIS, 1995). A presença desse sistema, especialmente em estreptococos orais menos ácido-resistentes, parece aumentar a sobrevivência em biofilme acidificado contendo bactérias cariogênicas acidogênicas e acidúricas (BURNE, 1998).

A arginina pode ser captada pelas células de estreptococos orais SAD-positivos através do “antiporter” arginina-ornitina (POOLMAN, DRIESSEN & KONINGS, 1987). Muitos outros microrganismos possuem sistemas de transporte energizados por ATP ou pela força próton-motora da membrana ( $\Delta p$ ). Porém, para organismos

como os estreptococos orais, peptídeos contendo arginina transportados para o interior das células, por peptídeos-transportadores, provavelmente são a maior fonte de arginina para essas bactérias. Os peptídeos podem ser degradados no citoplasma por peptidases, liberando aminoácidos como a arginina.

A primeira enzima do sistema, arginina desaminase, catalisa a desaminação do grupo guanidino da arginina, produzindo amônia e citrulina, numa reação essencialmente irreversível. A segunda enzima da via, ornitina carbamil transferase (cOTC), catalisa a formação de ornitina e carbamil fosfato a partir da catálise de citrulina e fosfato inorgânico. O carbamil fosfato é, então, o substrato para a terceira enzima, carbamato quinase (CK), que catalisa a degradação à amônia e CO<sub>2</sub> com transferência do fosfato para ADP, formando ATP (MARQUIS *et al.*, 1995).

A ornitina é substrato para o “antiporter” arginina-ornitina, que catalisa a excreção do produto final ornitina acoplada à captação de arginina sem hidrólise de ATP ou dissipação do  $\Delta p$ . Isso se deve ao fato deste transporte ser dirigido pelo gradiente de concentração dessas substâncias, que é mantido pela hidrólise da arginina (DRIESSEN, VERHOOGT & KONINGH, 1992).

O resultado geral do sistema, incluindo o “antiporter”, é a síntese de uma molécula de ATP por cada arginina hidrolisada. Muitos organismos podem crescer, embora fracamente, com arginina sendo o único catabólito, e em *P. aeruginosa*, o SAD permite o seu crescimento em anaerobiose. Contudo, quando ATP ou seus

equivalentes são requeridos para a captação de arginina, a síntese de ATP é fraca ou inexistente e arginina não é capaz de gerar crescimento.

Os genes que codificam o SAD foram isolados de *S. sanguis* e se apresentaram organizados contigüamente, a partir de *arcA* (AD), seguido de *arcB* (cOTC) e *arcC* (CK) (BURNE, PARSONS & MARQUIS, 1989).

O SAD em muitas bactérias, incluindo os estreptococos orais, é regulado por um circuito complexo, sendo induzido pela própria arginina e reprimido na presença de açúcares, como a glicose, devido à repressão pelo catabólito (SAIER *et al.*, 1995).

*S. rattus* se mostrou mais resistente que *S. sanguis* à repressão pela glicose e culturas aeradas também tiveram um papel na repressão do SAD desses microrganismos (CURRAN *et al.*, 1998). Similarmente, o SAD de *P. aeruginosa* é reprimido na presença de oxigênio.

O SAD parece estar ativo “in vivo” no biofilme supragengival humano. No estudo de BURNE & MARQUIS (2000), parte da placa dental de indivíduos que não higienizaram os dentes por algumas horas após a refeição foi colhida para análise. A placa dental foi dispersa e suas células foram permeabilizadas, mostrando cerca de 1/10 da atividade (por grama de peso seco) da arginina desaminase de biofilmes de *S. sanguis* totalmente induzidos para o SAD (BURNE & MARQUIS, 2000).

### **2.3. Hidrólise de Agmatina**

O sistema agmatina desaminase (SAgD) é análogo do SAD, mas está envolvido no catabolismo de agmatina, um derivado descarboxilado de arginina.

Em bactérias ácido-láticas e em *Enterococcus faecalis*, o SAgD é semelhante ao SAD. Porém, em *P. aeruginosa* e outros organismos, a agmatina é produzida através da arginina via arginina descarboxilase intracelular e é convertida a carbamilputresceína, liberando amônia, e a carbamilputresceína na presença de fosfato inorgânico é convertida a putresceína e carbamifosfato. Este é degradado a amônia, ATP e CO<sub>2</sub>, enquanto que a putresceína é convertida a espermidina ou a succinato.

A identificação de “cluster” genético semelhante ao do SAD em *S. mutans* é significativa, uma vez que o catabolismo de agmatina pode contribuir para sua tolerância ao ácido. A produção de álcalis através da agmatina pode ter implicações críticas na patogenicidade de *S. mutans* e pode afetar a ecologia de biofilmes orais (GRISWOLD, CHEN & BURNE, 2004).

### **2.4. Fermentação de Aminoácidos e Peptídeos**

Devido à grande complexidade e variedade de nutrientes disponíveis aos biofilmes, há muitos outros sistemas de geração de álcalis no meio-ambiente oral.

Muitas espécies microbianas presentes no biofilme dental maduro produzem desaminases e descarboxilases de aminoácidos, que podem também gerar álcalis na placa dental se a amônia sintetizada é retida e o CO<sub>2</sub> sintetizado é liberado para o ambiente, respectivamente (BURNE & MARQUIS, 2000).

Há sistemas metabólicos menores que podem contribuir para a síntese de álcalis no biofilme dental, como as reações de Stickland, que levam à fermentação de aminoácidos e consumo de prótons do ambiente, realizadas por *Peptostreptococcus* spp. (CURTIS *et al.*, 1983).

As bactérias da placa subgengival, especialmente anaeróbios assacarolíticos como *P. gingivalis*, são reconhecidas por sua capacidade proteolítica que decompõe proteínas e glicoproteínas salivares e do fluido crevicular, em peptídeos que são incorporados por essas bactérias como suprimento metabólico (HOLT *et al.*, 1999). Essa característica pode ser vantajosa para a colonização dessas bactérias nas áreas subgengivais e nos sítios de periodontite, onde se encontram muitas proteínas e peptídeos do fluido crevicular gengival e do tecido periodontal inflamado.

Na doença periodontal, amônia, butirato e propionato, que são sintetizados por *P. gingivalis* a partir de peptídeos contendo resíduos de gluconato e aspartato, são produtos citotóxicos capazes de prejudicar o

funcionamento das células dos tecidos do hospedeiro e interferir na resposta imunológica. Esses produtos são sintetizados a partir de vias metabólicas únicas que são as principais vias para o catabolismo de aminoácidos por *P. gingivalis* (TAKAHASHI, SATO & YAMADA, 2000). O butirato pode inibir o crescimento de fibroblastos gengivais humanos (JENG *et al.*, 1999) e a amônia pode inibir a função dos neutrófilos (NIEDERMAN *et al.*, 1990).

*P. gingivalis* utilizam dipeptídeos como substratos para a fermentação de aminoácidos, como ácido aspartilaspártico e ácido glutamilglutâmico (TAKAHASHI & SATO, 2001), enquanto *P. intermedia* e *P. nigrescens* utilizam o aminoácido livre aspartato (TAKAHASHI & YAMADA, 2000) e *F. nucleatum* utiliza o glutamato (GHARBIA & SHAH, 1991).

Além disso, essas bactérias têm capacidade de elevar o pH da cultura durante o crescimento e suas células lavadas neutralizam o pH do ambiente a partir da síntese de ácidos orgânicos e de amônia na presença de triptona e casaminoácidos (TAKAHASHI *et al.*, 1997). A degradação desses compostos nitrogenados leva à síntese de álcalis e à modificação do ambiente do biofilme dental.

A incorporação e a fermentação de aminoácidos por essas bactérias periodontopatogênicas podem contribuir em grande parte para a alcalinização da placa dental, levando à formação de um biofilme com pH neutro, assim como ocorre na ureólise, arginólise e na descarboxilação de aminoácidos. Além disso, a neutralização do pH da placa e do ambiente por essas bactérias pode conferir proteção contra ataque ácido – se houver fermentação de

carboidratos do meio – às bactérias mais ácido-sensíveis, como é o caso de *P. gingivalis*, que tem sua faixa de crescimento restrita entre os valores de pH 6,5 e 7,0 (TAKAHASHI, 2003).

Além das bactérias periodontopatogênicas Gram-negativas acima, alguns bacilos Gram-positivos assacarolíticos anaeróbios estritos (BGPAAs) também sintetizam álcalis orais a partir de aminoácidos (UEMATSU *et al.*, 2003).

Esses bacilos se encontram em grande número nas bolsas periodontais humanas e sintetizam butirato (UEMATSU & HOSHINO, 1992), que desencadeia diversos distúrbios no sistema imunológico do hospedeiro, favorecendo o desenvolvimento e a progressão da periodontite. Esses bacilos incluem *Eubacterium nodatum*, *Eubacterium saphenum*, *Eubacterium minutum*, *Filifactor alocis*, *Eubacterium infirmum* e *Eubacterium sulci* e não são ainda familiares pela sua dificuldade de cultivo.

Os aminoácidos são os substratos para o crescimento dessas bactérias. As atividades enzimáticas “trypsin-like” das bolsas periodontais, produzem peptídeos contendo arginina e/ou lisina como resíduos da extremidade C-terminal e esses aminoácidos podem ser liberados pela ação de peptidases, servindo como substratos para síntese de butirato, principalmente.

Os BGPAAAs variam na capacidade de fermentar aminoácidos, desta forma, *E. minutum* e *E. nodatum* usam tanto arginina quanto lisina, *F. alocis* usa apenas arginina e *E. infirmum*, *E. sulci* e *E. saphenum* usam somente lisina.

*E. minutum* e *E. nodatum* catabolizam a arginina via SAD, que contém também as enzimas arginina desaminase, ornitina carbalmil tranferase e carbamato quinase, sintetizando com produtos finais butirato e amônia. O catabolismo de lisina gera a formação de acetato, butirato e amônia. *F. alocis* cataboliza a arginina diretamente, não via citrulina, mas diretamente da arginina para ornitina, gerando butirato e amônia. *E. infirmum*, *E. sulci* e *E. saphenum* catabolisam a lisina, gerando ATP, pela acetato quinase, acetato, butirato e amônia (UEMATSU *et al.*, 2003).

Desse modo, BGPAAAs podem colaborar para a patogenicidade da doenças periodontais humanas pela síntese de butirato e amônia.

### **3. AÇÕES DE ANTIMICROBIANOS NO ECOSSISTEMA ORAL**

Esses agentes possuem a capacidade de interferir com a fisiologia ácido-básica bacteriana, sendo seus efeitos principais sobre a membrana citoplasmática como discutiremos a seguir.

### 3.1. Fluoreto

Os fluoretos são provavelmente os principais agentes atualmente em uso para prevenir e reduzir a incidência de cáries na população humana. Estão presentes na água potável, em produtos de higiene oral, principalmente dentífricos, no sal e em vários alimentos (MARQUIS, 1995).

Apesar do fluoreto ser muito efetivo na prevenção de cáries, há ainda certa discussão na literatura em relação aos seus mecanismos específicos de ação.

O fluoreto afeta tanto a desmineralização quanto a remineralização dentária, como revisado previamente por ten Cate & van Loveren (1999). A visão que tem sido desenvolvida cientificamente é que o aumento da remineralização dentária, causado pelo fluoreto é o efeito anticárie importante, sendo até mais importante que a inibição da desmineralização pela sua ação antimicrobiana. Porém, sabe-se que as ações antimicrobianas do fluoreto são de grande significância, como, em especial, a sua capacidade de reduzir a ácido-tolerância das bactérias constituintes da placa dental.

Dessa forma, há atualmente um interesse renovado pela elucidação dos efeitos antibacterianos do fluoreto e a necessidade de novas pesquisas (van LOVEREN, 2001).

Pela extensiva exposição dos indivíduos ao fluoreto na água e em uma grande variedade de outros produtos, essencialmente os de higiene oral, a microbiota anfiobiótica do corpo humano pode estar sendo regularmente exposta a níveis de fluoreto que podem ser antibacterianos.

Os níveis de fluoreto na placa dental geralmente são na faixa de 0,2 a 0,5  $\mu$ moles por grama de peso de placa úmida (DUCKWORTH, MORGAN & MURRAY, 1987; VOGEL *et al.*, 2000). Por ser a maior parte da substância da placa constituída por água, esses valores significam 0,2 a 0,5 mM.

O fluoreto é disponível para o uso humano ligado a outros componentes químicos, como por exemplo, na forma de fluoreto de sódio (NaF), mas em ambientes ácidos, o NaF se dissocia e o  $F^+$  fica livre para formar HF, que permeia rapidamente as células. Sendo assim, acredita-se que há fluoreto suficiente para ações antimicrobianas na placa bacteriana oral quando esta apresenta seu pH baixo.

O fluoreto, tendo um valor de pKa de 3,15, age como um ácido fraco. Quando microrganismos como *S. mutans* estão em ambientes ácidos, como ocorre na placa cariogênica que pode ter um pH tão baixo quanto 4,0, o fluoreto fora da célula bacteriana se torna protonado e forma ácido fluorídrico (HF). A permeabilidade da membrana celular ao HF é, aproximadamente,  $10^7$  vezes maior do que ao íon fluoreto ( $F^+$ ) (GUTKNECHT & WALTER, 1981). Assim, HF é capaz de se mover prontamente para dentro das células bacterianas nesses ambientes ácidos.

Contudo, *S. mutans* é capaz de manter o pH citoplasmático maior que o pH do ambiente externo, com uma diferença de uma ou mais unidades de pH, quando essa bactéria se encontra em ambientes acidificados. Assim, quando HF entra no citoplasma celular, ele se dissocia por causa do pH mais elevado no interior da célula bacteriana.

A dissociação resulta em liberação de  $F^+$ , que é considerado um inibidor enzimático, tanto diretamente sobre as enzimas urease (TODD & HAUSINGER, 2000) e enolase (CURRAN, BUCKLEY & MARQUIS, 1994), quanto indiretamente sobre as F-ATPases, através da formação de complexos com metais como o alumínio ( $AlF_4^+$ ) (STURR & MARQUIS, 1990). O complexo com metal mimetiza o fosfato inorgânico e pode afetar muitas reações de fosforilação e desfosforilação.

A dissociação de HF resulta, também, em aumento dos níveis de  $H^+$  dentro da célula, acidificando o citoplasma. Essa reação acidificadora prejudica a função da F-ATPase translocadora de prótons, que os move para fora do citoplasma para manter o  $\Delta pH$  (pH interno mais alcalino que o externo). Na verdade, a F-ATPase age para mover prótons para fora das células, enquanto o HF age para trazê-los de volta para o interior celular, determinando maior demanda da ação da F-ATPase.

A capacidade do fluoreto em agir como um condutor de prótons transmembrana causa prejuízo a muitos sistemas enzimáticos citoplasmáticos sensíveis à acidificação. Um exemplo relevante é o que acontece na respiração de estreptococos orais estudada por Phan *et al.*, (2002).

Nesses microrganismos, NADH oxidase tem um papel primordial no metabolismo de oxigênio. Porém, esta enzima se mostrou bastante sensível ao ácido, com um pH ótimo para sua atividade em torno de 7,0 e um forte declínio de atividade na faixa de pH de 6,0 a 5,0. Na verdade, em pH 5,0, não há atividade enzimática. Contudo, células intactas de *S. mutans* GS-5, expostas ao pH 5,0, puderam metabolizar O<sub>2</sub> numa atividade um pouco menor que 25% da atividade em pH 7,0. Isto se deve à capacidade desse microrganismo manter um  $\Delta$ pH através da membrana, permitindo que o citoplasma fique menos ácido que o ambiente externo. Porém, quando essas células foram tratadas com fluoreto em pH 5,0, a respiração foi inibida. Essa inibição foi reversível após a lavagem das células, podendo-se concluir que a ação do fluoreto foi a acidificação do citoplasma e não a inibição direta da NAD oxidase.

O fluoreto mostrou também ser um grande inibidor da síntese de amônia por bactérias orais, como *A. naeslundii*, principalmente por dois mecanismos (BARBOZA-SILVA & MARQUIS, 2003). Uma concentração muito pequena de fluoreto, como 0,1 mM, foi capaz de inibir em 50% a produção de amônia em biofilmes em pH 5,0 e em 80% em biofilmes em pH 4,0, da mesma forma que a enzima urease isoladamente também foi fortemente inibida. Assim,

pôde-se observar que o fluoreto tem a capacidade de agir tanto acidificando o citoplasma celular quanto agindo de forma direta sobre a urease.

A inibição da síntese de amônia pelo fluoreto também foi demonstrada em células intactas de *S. rattus* em pH4,0, mas não tão eficientemente quanto em *A. naeslundii* (BARBOZA-SILVA, 2003). Isso se deve talvez pela insensibilidade das enzimas do SAD à inibição pelo fluoreto, tendo este efeito somente na acidificação citoplasmática (BURNE, PARSONS & MARQUIS, 1991).

O fluoreto pode também se ligar diretamente à urease, pelo menos a de *Klebsiella aerogenes*, e inibir a atividade desta enzima de forma pH-dependente (TODD & HAUSINGER, 2000).

Os efeitos antimicrobianos do fluoreto foram revisados por Marquis, Clock & Mota-Meira (2002) e seus efeitos sobre bactérias urease-positivas foram descritos por Barboza-Silva & Marquis (2004).

### **3.2. Triclosan**

Triclosan é um agente largamente utilizado e é considerado um antimicrobiano efetivo contra diferentes microrganismos. Vários produtos de higiene pessoal contemporâneos contêm triclosan, como produtos orais e dermatológicos, assim como produtos domésticos como plásticos e tecidos.

Em concentrações bactericidas, triclosan parece agir em alvos múltiplos não específicos, causando prejuízo à função da parede celular, enquanto em concentrações subletais, triclosan age em sítios específicos ([YAZDANKHAH \*et al.\*, 2006](#)).

No estudo de Phan e Marquis (2006), triclosan foi um potente inibidor da F(H<sup>+</sup>)-ATPase da membrana citoplasmática de *S. mutans* e aumentou a permeabilidade a prótons das células intactas dessa bactéria. Além disso, agiu concomitantemente com ácidos fracos, carreadores de prótons, como fluoreto e sorbato, na sensibilização da glicólise à inibição ácida.

### **3.3. Ácidos Orgânicos Fracos**

#### **3.3.1. Indometacina, Cetoprofeno e Ibuprofeno**

Uma classe de ácidos orgânicos fracos é a composta pelos antiinflamatórios não esteroidais, como a indometacina, ibuprofeno e cetoprofeno, por exemplo.

Ao longo dos anos, estes ácidos têm sido usados como agentes para prevenir e controlar doenças periodontais (PAULETTO, SILVER & LARJAVA, 1997). Foi demonstrado, também, que o cetoprofeno potencializou os efeitos anticariogênicos do fluoreto, provavelmente devido à natureza ácido-fraca das duas substâncias (BOWEN, PEARSON & JERUSSI, 2000).

Phan *et al.* (2002) encontraram que a indometicina, benzoato e lactato ou acetato (sendo estes dois últimos ácidos metabólicos fracos) têm efeitos similares aos do fluoreto na sensibilização da respiração, pela acidificação de células intactas. Indometacina foi, aproximadamente, tão potente quanto o fluoreto para a sensibilização, com grandes efeitos causados em pH 4,0, por apenas 0,05 mM dos agentes. Uma resposta similar foi encontrada por 3 a 4 mM de benzoato e por 10 a 20 mM de lactato ou acetato.

### **3.3.2. Caprato, Undecanoato e Laurato**

Ácidos graxos constituem um outro grupo de ácidos orgânicos fracos. Foi demonstrado que esses agiram como sensibilizadores ácidos potentes de células bacterianas.

Marquis, Clock & Mota-Meira (2002) observaram que o ácido graxo caprato (C10) teve quase a mesma potência que o fluoreto na sensibilização de *S. mutans* e inibição da glicólise, da mesma forma que outros ácidos graxos, como undecanoato (C11) e laurato (C12).

Assim, os ácidos orgânicos fracos são considerados como agentes de condução de prótons através da membrana, da mesma forma que o fluoreto, acidificando o citoplasma celular e podendo inibir enzimas citoplasmáticas como, por exemplo, a urease (BARBOZA-SILVA, CASTRO & MARQUIS, 2005).

## **OBJETIVOS**

Devido à crescente necessidade de pesquisas sobre a microbiota oral, bem como sua colonização e função na homeostasia bucal ou na etiologia de doenças orais, observou-se a necessidade de se pesquisar mais detalhadamente a participação de determinadas bactérias orais no biofilme oral e sua fisiologia de produção de bases como amônia.

Sabe-se que a produção de amônia bacteriana pode possuir efeitos benéficos ou adversos sobre os tecidos do hospedeiro, não só na cavidade oral, mas também sistemicamente, podendo servir como fator de virulência para determinadas espécies bacterianas.

Nesse sentido, faz-se necessária a investigação da real ocorrência e atividade da urease e do SAD em bactérias do biofilme oral, além da ação de antimicrobianos sobre essas bactérias para que se defina o papel dos agentes no controle de doenças orais que podem estar relacionadas à produção de amônia.

Assim, os objetivos específicos do presente estudo foram:

- ✓ Estudar a síntese de álcalis por suspensões e biofilmes de bactérias urease-positivas, *S. epidermidis*, *S. salivarius* e *A. naelsundii*, em diferentes valores de pH e na presença dos agentes antimicrobianos fluoreto de sódio, indometacina e caprato;
- ✓ Estudar os mecanismos de ação dos agentes antimicrobianos testados sobre a síntese de álcalis por bactérias urease-positivas;
- ✓ Estudar a síntese de álcalis por biofilme supragengival humano com uréia como substrato em diferentes valores de pH e na presença de fluoreto de sódio, indometacina e caprato;

- ✓ Estudar a síntese de álcalis por suspensões e biofilmes de bactérias SAD-positivas, *S. sanguis* e *S. rattus*, em diferentes valores de pH e na presença dos antimicrobianos fluoreto de sódio, triclosan, indometacina, caprato, laurato e laurato metil éster;
  
- ✓ Estudar os mecanismos de ação dos agentes antimicrobianos testados sobre a síntese de álcalis por bactérias SAD-positivas;
  
- ✓ Estudar a síntese de álcalis por biofilme supragengival humano com arginina como substrato em diferentes valores de pH e na presença de fluoreto de sódio, triclosan, indometacina, caprato, laurato e laurato metil éster.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. BACTÉRIAS PESQUISADAS E TIPOS DE CULTURA

#### 1.1. Bactérias

*Actinomyces naeslundii* ATCC 12104, *Staphylococcus epidermidis* (cepa da Universidade de Rochester), *Streptococcus salivarius* ATCC 13419, *Streptococcus sanguis* NCTC 10904 e *Streptococcus rattus* FA-1 foram cultivadas rotineiramente no laboratório por cultivo semanal em placas de ágar triptona de soja (Difco Laboratories, Detroit, MI) e estocadas em solução de glicerol a 50 % (v/v) em freezer a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 1.2. Culturas em suspensão e extratos celulares

*A. naeslundii*, *S. epidermidis* e *S. salivarius* foram cultivados em caldo de triptona - extrato de levedura (TY) contendo 3% (p/v) de triptona (Difco), 0,5 % de extrato de levedura (Difco) e suplementado com 1% de glicose (p/v) (Difco). Já *S. sanguis* e *S. rattus* foram cultivados em suspensão no mesmo caldo TY, porém suplementado com 1% de arginina (p/v) e 0,1% de glicose (p/v).

As culturas bacterianas tiveram seu crescimento interrompido durante a fase exponencial tardia de multiplicação por meio de centrifugação a 4°C por 15 min a 6362 x g (Beckman J2-21 Centrifuge, Beckman). As células intactas colhidas (sedimento) foram utilizadas nos experimentos de produção de amônia ou elevação do pH com uréia ou arginina como substrato, no experimento de captação de arginina ou como preparação de extratos celulares usados nos experimentos enzimáticos.

Extratos celulares foram obtidos através do rompimento celular no homogeneizador Mini-BeadBeater-8 (BioSpec Products, Inc., Bartlesville, OK) como descrito por Barboza-Silva (2003). As células bacterianas foram colhidas por centrifugação a 4°C assim como descrito acima. Células de *A. naeslundii*, *S. epidermidis* e *S. salivarius* foram lavadas e suspensas em tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 7,0 (tampão fosfato padrão), enquanto que células de *S. sanguis* e *S. rattus* foram lavadas e suspensas em 50 mM KCl e 1 mM MgCl<sub>2</sub> (solução salina padrão). As células de todas as bactérias foram suspensas em tubo contendo metade do seu volume de pérolas de vidro de 106µm de diâmetro (Sigma, St. Louis, MO). Em seguida, estas foram homogeneizadas por 15 ciclos de 2 min cada, com exceção da suspensão de *A. naeslundii* que

foi homogeneizada por 20 ciclos. Todas as suspensões foram colocadas em cuba com gelo por 2 min durante os intervalos. Foi utilizada a microscopia de contraste de fase para verificar se o rompimento celular foi completo e os extratos celulares (sobrenadante) foram separados do sedimento por centrifugação por 10 min a 16110 X *g* numa microcentrífuga (Eppendorf Centrifuge 5415D, Brinkmann Instruments, Inc., Westbury, NY).

### **1.3. Biofilmes**

Biofilmes foram cultivados em lâminas de microscopia padrão como descrito anteriormente por Phan, Reidmiller & Marquis (2000). A cultura de biofilmes foi realizada em caixas de vidro com dez lâminas de microscopia cada, em caldo TY suplementado com 1% (p/v) de sacarose. Durante 4 a 7 dias, as lâminas foram transferidas diariamente para uma nova caixa com caldo de TY suplementado fresco e após este período, dependendo da bactéria, os biofilmes foram considerados maduros para os experimentos que se realizaram no dia seguinte, como biofilmes intactos ou dispersos. Para *A. naeslundii*, *S. epidermidis* e *S. salivarius*, no dia anterior à utilização do biofilme, as lâminas foram transferidas

para caldo TY suplementado com 1% (p/v) glicose. Já em relação à *S. sanguis* e *S. rattus*, os biofilmes foram transferidos para caldo TY suplementado com 1% arginina (p/v) e 0,1% glicose (p/v), com o intuito de induzir o SAD dessas bactérias.

Algumas lâminas de biofilmes foram utilizadas para produzir biofilmes dispersos, ou seja, células de biofilmes dispersas na forma de suspensão, como anteriormente descrito por Burne e Marquis (2001). Assim, biofilmes maduros intactos foram lavados por imersão em tubo contendo tampão fosfato padrão (*S. salivarius*) ou solução salina padrão (*S. sanguis* e *S. rattus*), e a massa de biofilmes foi removida das lâminas, com espátula estéril, em um outro tubo contendo nova solução para cada bactéria, respectivamente. Para facilitar a separação das células dos biofilmes de *S. sanguis*, estes, em solução, foram submetidos a um ciclo de homogeneização previamente à dispersão utilizando-se o homogeneizador IKA Labortechnik T25 (Janke & Kunkel GmbH and Co., Staufen, Germany) por 5 segundos. Após este ciclo, foram dispersos utilizando-se o Branson Sonifier Cell Disruptor 200 (Branson Sonic Power, Danbury, CT), assim como os biofilmes de *S. salivarius* e *S. rattus*, por 20 segundos imersos em cuba com gelo. Em seguida, as suspensões de biofilmes foram observadas em microscópio de contraste de fase para checar a separação das células. Observou-se também que não houve rompimento das células, que pôde ser comprovado pela não diminuição do contraste de fase.

#### **1.4. Biofilme dental supragengival humano**

Biofilme dental supragengival foi coletado da superfície de todos os dentes de voluntários (a autora, o professor orientador desta pesquisa e uma colega de laboratório). Os voluntários foram orientados que a última escovação antes da coleta deveria ser na noite anterior a esse procedimento. Assim, o biofilme dental foi colhido pela autora 3 horas após o café da manhã dos voluntários, os quais não haviam escovado seus dentes após essa refeição, para que se formasse quantidade adequada de biofilme sobre os dentes. O biofilme dental dos três voluntários foi, então, colhido com uma espátula estéril e depositado em um mesmo frasco contendo tampão fosfato padrão (para os experimentos com o substrato uréia) ou em um mesmo frasco contendo solução salina padrão (para os experimentos com o substrato arginina).

O objetivo principal de se colher biofilme dental supragengival humano foi estudar se a produção de amônia através de uréia ou arginina ocorre na boca e sendo o resultado positivo, estudar se essa produção pode ser modulada pelos antimicrobianos testados. Por isso as amostras de biofilme dos voluntários foram colhidas e em seguida colocadas em mesmo frasco para que houvesse volume suficiente de biofilme a ser testado num mesmo experimento.

## **2. EXPERIMENTOS**

### **2.1. Teste da produção de amônia em pH constante**

### 2.1.1. Uréia como substrato

A capacidade das células em suspensão e em biofilmes de *A. naeslundii*, *S. epidermidis* e *S. salivarius* e de biofilme supragengival humano de produzir amônia na presença e ausência de antimicrobianos, em ambiente com pH constante, foi pesquisada a partir da adição de uréia em excesso (25 mM) como substrato para a enzima urease citoplasmática bacteriana, segundo protocolo adaptado de Morou-Bermúdez & Burne (1999).

A produção de amônia foi mensurada utilizando-se o kit enzimático “Ammonia” da Roche/R-Biopharm (Darmstadt, Germany), que tem como princípio a reação de redução de 2-cetoglutarato em glutamato na presença de amônia e pela oxidação de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), catalisada pela enzima glutamato desidrogenase (GLDH), como mostra a reação abaixo:



A oxidação de NADPH é medida através da diminuição na absorbância da luz no comprimento de onda de 340 nm, medida em espectrofotômetro (Unicam Helios  $\alpha$ , Spectronic Unicam Instruments, Cambridge, United Kingdom), e é

proporcional à quantidade de amônia produzida. O valor final de amônia produzida foi padronizado por  $\mu\text{mol}$  de amônia por miligrama (mg) de peso seco de células ou de peso seco de biofilme.

Para os experimentos com células em suspensão intactas, o sedimento celular foi lavado e resuspenso com tampão fosfato padrão, obtendo-se suspensões finais na reação de 6,0 mg (para *A. naeslundii*), 3,0 mg (para *S. salivarius*) e 0,5 mg (para *S. epidermidis*) de peso seco de células por mililitro (psc/mL).

Para os experimentos com biofilmes intactos, cada lâmina de biofilme foi lavada por imersão em tubo contendo tampão fosfato padrão e mantidas em outro tubo com tampão fresco para a realização desses experimentos. Cada lâmina de biofilme, após o experimento, teve seu peso mensurado e a solução conteve em média 2,0 mg de peso seco de biofilme por mililitro (psb/mL).

Nos experimentos com biofilmes dispersos de *S. salivarius*, a suspensão de células foi realizada em tampão fosfato padrão na concentração final da reação aproximada de 2,5 mg psb/mL. Da mesma maneira, o biofilme dental supragengival humano foi imerso em tampão fosfato padrão numa concentração aproximada de 0,3 mg psb/mL de suspensão final na reação dos experimentos.

Suspensões de células intactas, de biofilmes intactos, de biofilmes dispersos e de biofilme humano tiveram o pH ajustado para 6, 5 ou 4 utilizando-se ácido clorídrico (HCl) 5 N e mensuradas com eletrodo de vidro e medidor de pH (Beckman 45, Beckman Instruments, Fullerton, CA). As suspensões-teste contiveram os agentes testados em diferentes

concentrações (fluoreto de sódio, indometacina ou caprato) e foram incubadas por 5 min antes da adição do substrato uréia (25 mM), iniciador da reação. Suspensões-controle, sem os agentes testados, também permaneceram incubadas por 5 min antes do início da reação. As suspensões-controle dos experimentos com indometacina ou caprato contiveram 1% de etanol (v/v), uma vez que as soluções estoque destes agentes foram preparadas com esse solvente. Sabe-se, também, que essa concentração de etanol não é inibitória para a enzima urease.

Após o início do experimento, com duração de uma a 5 horas, o pH foi mantido constante – pelo uso de tampão fosfato na suspensão ou pela adição de HCl 5 N se necessário – e a produção de amônia foi mensurada a partir de amostras das suspensões colhidas em intervalos de tempo durante todo o experimento.

As amostras dos experimentos com células intactas, biofilmes dispersos e biofilmes humanos foram colhidas e microcentrifugadas a 16110 X g durante 1,5 min para interromper a reação uréia–amônia e separar o sobrenadante. Este foi utilizado para a medida da produção de amônia com o kit enzimático “Ammonia”. Já as amostras das suspensões dos experimentos com biofilmes intactos foram diretamente utilizadas para a medida da amônia produzida com o mesmo kit enzimático. A amônia produzida foi padronizada em  $\mu$ moles por mg psc ou psb.

O peso seco de células e de biofilmes foi determinado de acordo com o protocolo estabelecido por Belli & Marquis (1991).

### 2.1.2. Arginina como substrato

A capacidade das células em suspensão e em biofilmes de *S. rattus* e *S. sanguis* e de biofilme dental supragengival humano de produzir amônia na ausência e presença de antimicrobianos, em pH constante, foi estudada a partir da adição de arginina em excesso (47 mM) como substrato para as enzimas do SAD do citoplasma bacteriano, seguindo protocolo de Curran e colaboradores (1998).

A produção de amônia foi determinada por constante monitoramento da base produzida durante o experimento – observada pela elevação do pH da suspensão determinada por eletrodo de vidro e medidor de pH – e sua constante neutralização com volumes e concentrações determinados de HCl.

Para ambas as bactérias, nos experimentos com células intactas em suspensão, o sedimento centrifugado foi lavado e resuspenso em solução salina padrão numa concentração final na reação de 3,0 mg psc/ mL.

Nos experimentos com biofilmes intactos, as lâminas foram lavadas em solução salina padrão e mantidas em tudo contendo a solução fresca para a realização dos experimentos. Cada tubo experimental conteve uma lâmina de biofilme e a solução do experimento conteve em média 2,0 mg psb/mL.

Os biofilmes dispersos foram mantidos em solução final na reação numa concentração aproximada de 3,0 mg psb/mL e o biofilme humano foi mantido em solução para a reação numa concentração de 0,3 mg psb/mL.

Tanto as suspensões de células intactas, biofilmes intactos, biofilmes dispersos e biofilmes humanos tiveram o pH ajustado para 6,0; 5,0 ou 4,0 com HCl 5 N antes da adição do substrato arginina.

As suspensões-teste foram incubadas por 5 min com os agentes testados (fluoreto de sódio, triclosan, indometacina, caprato, laurato ou laurato metil éster) em diferentes concentrações antes do início da reação com arginina. Da mesma forma, as suspensões-controle (sem os agentes testados) foram incubadas por 5 min antes do início da reação e, com exceção das suspensões-controle dos experimentos com fluoreto de sódio, todas continham 1% (v/v) de etanol que foi o solvente utilizado para as soluções estoque das outras substâncias. Esta concentração do solvente não é inibitória para as enzimas do SAD.

A produção de amônia foi medida indiretamente mantendo-se as suspensões em pH constante durante todo o experimento, com duração de 1,5 a 3 horas. A amônia produzida durante o experimento foi neutralizada com volumes determinados de soluções-estoque de HCl 0,1; 0,5; 1,0 ou 5,0 N. Assim, a quantidade de base (amônia) neutralizada foi considerada igual à quantidade de equivalentes de HCl adicionada para manter o pH constante (determinado com medidor de pH e eletrodo de vidro). A amônia neutralizada foi padronizada em  $\mu$ moles por mg psc ou psb.

Da mesma forma que nos experimentos com uréia, o peso seco de células e de biofilmes foi determinado de acordo com o protocolo estabelecido por Belli & Marquis (1991).

## 2.2. Teste de elevação do pH

A capacidade das células de *S. rattus* e *S. sanguis* em suspensão de produzir amônia e elevar o pH do meio na presença e ausência de antimicrobianos foi monitorada a partir da adição de arginina em excesso (47 mM) como substrato para as enzimas do SAD do citoplasma bacteriano, seguindo protocolo de Ma e colaboradores (1999).

Utilizando-se esse tipo de experimento, o objetivo principal foi determinar se as células intactas de *S. sanguis* e *S. rattus* em suspensão poderiam reverter os efeitos inibitórios de indometacina e caprato na produção de amônia e elevar o pH do meio, mesmo após terem sido expostas a esses ácidos orgânicos fracos por uma hora em suspensão de pH 4,0 constante.

Para o experimento em pH constante, as células foram colhidas por centrifugação e o sedimento foi lavado e resuspenso em solução salina padrão numa concentração final na reação de 3,0 mg psc/ mL. As suspensões de células intactas tiveram o pH ajustado para 4,0 com HCl 5 N antes da adição do substrato arginina.

As suspensões-teste foram incubadas por 5 min com os agentes testados (indometacina e caprato) em diferentes concentrações antes do início da reação com arginina. Da mesma forma, as suspensões-controle (sem os agentes testados) foram incubadas por 5 min antes do início da reação.

Arginina (47 mM) foi adicionada para começar a reação e a produção de amônia foi quantificada indiretamente por neutralização com HCl. Observando-se que as soluções-teste tiveram a produção de amônia inibida, seguiu-se com o experimento seguinte que foi de elevação do pH.

Como preparação para esse experimento, as células controles e testes do experimento anterior foram lavadas uma vez e resuspensas em solução salina padrão na concentração de 3,0 mg psc/mL. O objetivo desse procedimento foi lavar as células para se tentar remover os agentes testados e restabelecer a produção de amônia, verificando se esses agentes têm sua ação reversível ou irreversível.

O pH das suspensões controles e testes, que não sofreram nova adição dos agentes, foi ajustado para 4,0 com HCl e as suspensões foram incubadas por 5 min antes da adição de novo substrato arginina na mesma concentração que no experimento anterior (47 mM).

A elevação ou não do pH das suspensões foi determinada por eletrodo de vidro acoplado ao medidor de pH durante todo o experimento, com duração de 18 horas.

Da mesma forma que nos experimentos anteriores, o peso seco de células e de biofilmes foi determinado de acordo com o protocolo estabelecido por Belli & Marquis (1991).

## 2.3. Teste da atividade enzimática

### 2.3.1. Enzima urease

A enzima urease de extratos celulares de *A. naeslundii*, *S. epidermidis* e *S. salivarius* foi testada quanto a sua capacidade de catalisar a reação uréia–amônia na presença dos agentes fluoreto de sódio, indometacina e caprato em soluções com diferentes valores de pH.

Extratos celulares foram suspensos em tampão fosfato padrão para a obtenção de soluções finais para a reação na concentração de 50% v/v (extrato de *A. naeslundii*), 25% (extrato de *S. salivarius*) e 5% (extrato de *S. epidermidis*).

As suspensões tiveram o pH ajustado para 6, 5 ou 4 com HCl 5 N, medido com medidor de pH e eletrodo de vidro, antes do início da reação. Suspensões-testes com os agentes fluoreto de sódio, indometacina ou caprato foram incubadas por 5 min antes da adição de 25 mM de uréia como substrato, iniciando-se o experimento. As suspensões-controle (sem os agentes testados) também foram incubadas por 5 min antes do início da reação e os controles dos experimentos com indometacina e caprato contiveram 0,5% (v/v) de etanol.

Em intervalos durante os experimentos, com duração de 2 horas e incubação a 37°C, foram colhidas amostras para a medida da atividade da enzima urease diretamente através do kit enzimático “Ammonia”.

A quantidade final de amônia produzida pelos extratos celulares foi padronizada por  $\mu\text{mol}$  de amônia por mg de proteína ( $\mu\text{mol}$  amônia/mg ptn) presente no extrato celular. A quantificação de proteínas totais nos extratos celulares foi determinada de acordo com o protocolo de Lowry e colaboradores (1951).

### **2.3.2. Enzimas do SAD**

A atividade das enzimas do SAD (arginina desaminase, ornitina carbamiltransferase e carbamato quinase) de extratos celulares de *S. rattus* e *S. sanguis* foi testada na presença dos antimicrobianos triclosan, indometacina, caprato, laurato e laurato metil éster.

A atividade de arginina desaminase e de ornitina carbamil transferase foi determinada pela produção de amônia. Já, a atividade de carbamato quinase foi determinada pela produção de ATP.

No ensaio de arginina desaminase, a reação do catabolismo de arginina teve como produtos a amônia e a citrulina. Os extratos celulares foram suspensos em tampão Tris-maleato 50 mM pH 6,0 (30% v/v) e incubados por 5 min

sem os agentes testados (soluções-controle) ou com os agentes testados (soluções-teste) antes da adição de 47 mM de arginina, substrato da reação. Esta foi realizada a 37°C e teve duração de 90 min. Foram colhidas amostras durante intervalos de tempo da reação. Às amostras foi adicionado ácido tricloracético (10% v/v) para interromper a reação e, em seguida, estas foram centrifugadas por 30 s em microcentrífuga a 16110 X g. A produção de amônia foi, então, determinada pelo kit enzimático “Ammonia” e foi relacionada à atividade da enzima arginina desaminase.

Para o ensaio de ornitina carbamiltransferase, a produção de amônia foi também determinada pelo kit enzimático “Ammonia”. O método envolveu a reação de citrulina com arsenato, um análogo do fosfato inorgânico, na presença da enzima ornitina carbamiltransferase, produzindo ornitina e carbamilarsenato. Este se degrada espontaneamente em arsenato, CO<sub>2</sub> e amônia, como descrito previamente por Ferro, Bender & Marquis (1983). Os extratos celulares foram suspensos em tampão arsenato de sódio 0,5 M pH 7,0 (5% v/v) e incubados por 5 min (tanto suspensões-controle e teste) antes da adição de 0,1 M de citrulina, substrato da reação. O experimento foi realizado a 37°C e ácido tricloracético (10% v/v) foi adicionado às amostras colhidas durante a reação de 90 min. As amostras, então foram centrifugadas e utilizadas para a determinação de amônia produzida.

A atividade da enzima carbamato quinase foi determinada pela produção de ATP como descrito previamente por Koo *et al.* (2006) em experimentos de bioluminescência de ATP. O ATP formado foi mensurado utilizando-se o reagente

Enliten® rLuciferase/Luciferin (Promega Corporation, Madison, WI) e o luminômetro Turner Designs DT-20/20 (Sunnyvale, CA). Os extratos celulares foram suspensos em tampão citrato de sódio 70 mM pH6,0 (5% v/v) numa reação contendo 40 m ADP, 40 mM MgCl<sub>2</sub> e 60 mM carbamilsfosfato como substrato. Soluções-controle e teste foram incubadas por 5 min antes da adição de carbamilsfosfato. O experimento foi realizado a 37°C e as amostras colhidas foram adicionadas e mantidas em um tampão a 100°C (20 mM Tris-HCl pH 7,75 contendo 2 mM EDTA) por 1,5 min para interromper a reação. Em seguida, as amostras com o tampão (10% v/v) foram imediatamente resfriadas em gelo por pelo menos 20 min antes da determinação do ATP formado com o kit Enliten® (Promega Corporation, Madison, WI).

Todos os experimentos para a determinação de proteínas totais nos extratos celulares foram realizados de acordo com o método de Lowry *et al.* (1951).

#### **2.4. Teste da captação do substrato arginina**

Este experimento teve como objetivo o estudo da capacidade das células em suspensão de *S. rattus* e *S. sanguis* em captar o substrato arginina na presença dos agentes fluoreto de sódio, triclosan, indometacina, caprato, laurato e laurato metiléster, em meios com diferentes valores de pH.

A captação de arginina uniformemente marcada, [<sup>14</sup>C]arginina (Amersham, Piscataway, NJ), foi determinada por um procedimento padrão de centrifugação das amostras, colhidas durante o experimento, através de óleo de silicone, como descrito previamente por Hurwitz, Braun & Peabody (1965).

Inicialmente, os sedimentos celulares colhidos por centrifugação de culturas em suspensão foram lavados em solução salina padrão e suspensos em tampão citrato 50 mM pH4, 5 ou 6, obtendo-se uma concentração de células na suspensão de 3,0 mg peso seco de células por mL. A reação foi iniciada por adição de substrato [<sup>14</sup>C]arginina em excesso (47 mM) à suspensão e teve duração total de 15 min. Amostras colhidas em intervalos durante a reação foram microcentrifugadas em óleo de silicone, que não é miscível em fluido extracelular, separando-se, assim, o sedimento celular do sobrenadante. Em seguida, o sedimento foi resuspenso em fluido Ecoscint A (National Diagnostics, Atlanta, GA) para  $\beta$ -contagem radioisótopa em aparelho cintilador LS1810 (Beckman).



## RESULTADOS

### 1. UREÓLISE

#### 1.1. Efeitos da acidificação na produção de amônia por células intactas em suspensão e por biofilmes de bactérias urease-positivas

As informações presentes da Tabela 1 indicam que suspensões de células intactas de *S. epidermidis* nas condições experimentais específicas em pH 6,0 têm setenta vezes a capacidade ureolítica de células intactas em suspensão de *S. salivarius* e quatrocentas vezes a atividade de células intactas em suspensão de *A. naeslundii*. O tempo dos experimentos para degradação de uréia foi estendido para os dois últimos microrganismos porque a atividade específica ureolítica destes se apresentou mais baixa que de *S. epidermidis*. Além disso, a ureólise desta bactéria foi menos sensível à acidificação do meio. Nestes experimentos, foi utilizada uma alta concentração de uréia para que níveis de atividade ureolítica máxima fossem obtidos.

Para as três bactérias, a ureólise por biofilmes intactos foi significativamente menor que por células intactas em suspensão, mas a atividade ureolítica foi menos sensível ao pH ácido que a atividade das suspensões. Ureólise por biofilmes intactos de *S. epidermidis* foi 47 vezes maior que de *S. salivarius* e 85 vezes maior que de *A. naeslundii*. Biofilmes dispersos de *S. salivarius* não tiveram a capacidade ureolítica aumentada em relação aos biofilmes intactos da mesma bactéria. Ainda, comparando-se a ureólise de biofilmes dispersos de *S. salivarius* em pH 6,0, 5,0 e 4,0 observa-se a menor produção de amônia em pH 4,0.

## **1.2. Efeitos de agentes antimicrobianos na ureólise por bactérias intactas em suspensão e em biofilmes**

O fluoreto mostrou-se como um grande inibidor da produção de amônia através da uréia por células intactas em suspensão e por biofilmes de forma pH-dependente. Efeitos inibitórios do fluoreto na produção de amônia por células intactas em suspensão de *S. epidermidis*, *S. salivarius* e *A. naeslundii* são mostrados na Figura 1.

Em células intactas em suspensão de *S. epidermidis* (Fig. 1A) no pH constante 6,0, o fluoreto inibiu a ureólise, mas altas concentrações desse agente foram necessárias para efeitos significantes – a concentração inibitória de 50% foi maior que 1,0 mM. Em pH 5,0, a atividade do controle na produção de amônia foi basicamente o mesmo que em pH 6,0. No entanto, a sensibilidade ao fluoreto foi bem maior que em pH 6,0 e a concentração inibitória de 50% foi em torno

de 1,0 mM. Em pH 4,0, a atividade do controle foi ao redor de 70% da atividade do controle em pH 6,0, mas a sensibilidade ao fluoreto foi aumentada e a concentração de fluoreto inibitória de 50% foi apenas 0,01 mM.

Ureólise por células intactas em suspensão de *S. salivarius* foi mais sensível à acidificação do meio e ao fluoreto (Fig. 1B) que a ureólise por células de *S. epidermidis*. Em pH 5,0, a quantidade total de amônia produzida por *S. salivarius* foi somente a metade daquela produzida em pH 6,0, e foi quase totalmente inibida por fluoreto a 0,1 mM. Em pH 6,0, essa concentração de fluoreto causou mais de 50% de inibição. Já em pH 4,0, a produção de amônia por células intactas em suspensão de *S. salivarius* foi muito reduzida e esta foi ainda menor na presença fluoreto.

O padrão de inibição da ureólise por células intactas em suspensão de *A. naeslundii* foi mais parecido com o de *S. epidermidis* (Fig. 1A) do que com o de *S. salivarius* (Fig. 1B). A produção de amônia através da uréia foi relativamente insensível ao fluoreto em pH 6,0, foi mais que 50% inibida por 0,2 mM de fluoreto em pH 5,0 e foi quase totalmente inibida por 0,2 mM desse agente em pH 4,0. A ureólise por células intactas em suspensão de *A. naeslundii* foi menos sensível ao ácido do que a ureólise por células de *S. salivarius*, mas foi mais ácido-sensível que as células de *S. epidermidis* (Tabela 1).

Ureólise por unidade de peso seco de biofilmes intactos de *S. epidermidis* em pH constante 5,0 ou 4,0 foi mais lenta do que por células intactas em suspensão desta mesma bactéria (Figura 2A). Para biofilmes intactos não expostos

ao fluoreto em pH 5,0, a produção de amônia através de uréia foi aproximadamente 34  $\mu\text{mol/mg}$  de peso seco de biofilme por hora, comparado a 172,8  $\mu\text{mol/mg}$  de peso seco por hora para células em suspensão (Tabela 1).

A Tabela 1 mostra também que ureólise por biofilmes intactos de *S. epidermidis* não foi inibida por acidificação, mesmo em pH 4,0. Já o efeito do fluoreto em biofilmes dessa bactéria foi pH-dependente, como mostra a Figura 2. Ureólise por biofilmes de *S. epidermidis* em pH 6,0 foi relativamente insensível ao fluoreto (figura não mostrada), mas em pH 5,0 (Fig. 2A), a concentração inibitória de 50% foi entre 0,1 e 0,5 mM. Em pH 4,0, 50% de inibição foi causada por somente 0,01 mM de fluoreto.

Ureólise por biofilmes intactos de *S. salivarius* se mostrou menos sensível à inibição pelo fluoreto do que a ureólise por células intactas em suspensão (Fig. 2B). Em pH 6,0, a concentração inibitória de 50% foi um pouco maior que 1,0 mM, mas em valores de pH de 5,0 e 4,0, 0,2 mM de fluoreto foi suficiente para inibir mais de 50% da produção de amônia.

Nos experimentos com biofilmes de *S. salivarius* dispersos na forma de células de biofilmes em suspensão, a produção de amônia na presença de fluoreto foi similar àquela produzida por células intactas em suspensão da mesma bactéria (Fig. 2B) em termos de sensibilidade à acidificação e ao fluoreto, num padrão pH-dependente. A quantidade de amônia produzida em pH 5,0 foi em torno da metade da amônia produzida em pH 6,0 e 0,2 mM de fluoreto inibiu mais de 50% a ureólise nesses valores de pH.

Biofilmes intactos de *A. naeslundii* se mostraram menos sensíveis ao fluoreto e à acidificação do que células intactas em suspensão dessa mesma bactéria (Fig. 2C). Em pH 5,0 e 4,0, ureólise por biofilmes não foi muito sensível à acidificação e ao fluoreto, mesmo na alta concentração de 1,0 mM. Entretanto, os níveis de produção de amônia por biofilmes nessas condições foram tão baixos que o período de incubação durante o experimento foi aumentado para 5 horas para uma maior produção total de amônia.

A produção de amônia por células intactas em suspensão de *S. epidermidis*, *S. salivarius* e *A. naeslundii* foi também testada na presença de indometacina e caprato. Esses ácidos orgânicos são ácidos fracos, assim como ácido hidrofluorídrico (HF) que se dissocia em próton  $H^+$  e íon fluoreto, e por isso foram testados para se observar se inibiam a produção de amônia e de que maneira, ou seja, por inibição direta da enzima urease (testada nos experimentos com extratos celulares) ou por acidificação do citoplasma celular.

Como mostram as Figuras 3A e 3B, os padrões de inibição da produção de amônia pelos dois ácidos orgânicos foram similares ao padrão do fluoreto em células intactas em suspensão de *S. epidermidis*. Indometacina foi aproximadamente tão potente quanto fluoreto para a inibição da produção de amônia em pH 4,0; caprato foi um pouco menos potente. Produção de amônia por biofilmes de *S. epidermidis* em pH 4,0 (Fig. 3C) foi inibida pelos dois ácidos fracos, mas os biofilmes foram mais resistentes a estes agentes do que as células em suspensão intactas.

A produção de amônia por células intactas em suspensão de *S. salivarius* na presença dos ácidos orgânicos fracos foi afetada de maneira diferente que por fluoreto (Fig. 4A). Em pH 6,0 constante, praticamente não houve inibição da produção de amônia na presença de qualquer concentração de ácido orgânico testada, em contraste com a inibição causada por fluoreto na incubação no mesmo valor de pH. Somente em pH 4,0, houve inibição de 50% da produção de amônia por 0,2 mM indometacina ou caprato.

Os efeitos dos ácidos orgânicos fracos na ureólise por células intactas em suspensão de *A. naeslundii* (Fig. 4B) foram diferentes daqueles em células de *S. salivarius* ou *S. epidermidis*. Apesar do estímulo da produção de amônia em células de *A. naeslundii* por 0,2 mM de caprato em pH 6,0, os ácidos orgânicos fracos foram inibitórios em cada pH testado. Como descrito acima, a inibição da ureólise por células intactas em suspensão de *A. naeslundii* devido à ação da indometacina se mostrou contrária àquela na presença de fluoreto em pH 6,0 (Fig. 1B e 4B). Neste valor de pH, a produção de amônia foi mais que 50% inibida por somente 0,2 mM de indometacina, embora 1,0 mM seja apenas um pouco mais inibitório para ureólise. Também em pH 6,0, 1,0 mM de caprato inibiu a ureólise em 50%, enquanto 0,2 mM não causou inibição alguma, apesar de ter aumentado a produção de amônia. Em pH 5,0 e 4,0, indometacina e caprato foram altamente inibitórios da produção de amônia, porém caprato pareceu ser menos potente, enquanto fluoreto foi muito mais efetivo que os dois ácidos orgânicos (Fig. 1B).

### **1.3. Efeitos da acidificação e dos antimicrobianos na atividade da enzima urease em extratos celulares**

Os resultados apresentados na Figura 5A mostram que a atividade da urease em extratos celulares de *S. salivarius* e *A. naeslundii* foi maior em pH 6,0 do que em 5,0 e praticamente não houve atividade em pH 4,0 (figura não apresentada).

A enzima nos extratos foi altamente sensível ao fluoreto, mesmo em pH 6,0. Em pH 5,0, a atividade foi suficientemente reduzida por inibição ácida e isso dificultou a apresentação da inibição por fluoreto. Os ácidos orgânicos fracos indometacina e caprato, ao contrário do fluoreto, não foram inibidores diretos da urease em extratos celulares de ambas as bactérias (Fig. 5B).

### **1.4. Efeitos da acidificação e dos antimicrobianos na produção de amônia por biofilme dental supragengival humano com uréia como substrato**

A produção de amônia com uréia como substrato por biofilme dental supragengival humano foi estudada no período de 2 horas. Em experimentos de elevação de pH, a produção de amônia foi suficiente em suspensões controles (sem antimicrobiano) para rapidamente elevar o pH do meio de 4,0 para 7,8 com aumento na concentração de amônia

de 3,8 para 26  $\mu\text{mol/mg}$  peso seco de biofilme (dados não mostrados). Tanto a elevação do pH quanto a produção de amônia foram interrompidas por 1,0 mM fluoreto.

Nos experimentos com pH constante, a produção de amônia foi inibida por fluoreto numa forma pH-dependente, com 1,0 mM causando uma grande inibição (Figura 6). Em pH 6,0, 0,2 mM de fluoreto foi 25% inibitório para a produção de amônia, enquanto em pH 5,0, a inibição aumentou para 40% e em pH 4,0, aumentou para 50% (Fig. 6A). O nível de produção de amônia por mg de peso seco de biofilme foi similar ao de células em suspensão de *S. salivarius* e bem menor que os níveis de produção de células de *S. epidermidis*. Certamente, a microbiota do biofilme dental é heterogênea, mas com as amostras de biofilme utilizadas, ocorreu significativa produção de amônia através da uréia.

Indometacina e caprato também inibiram a produção de amônia por biofilme dental, mas foram menos efetivos que fluoreto (Fig. 6B).

## **2. ARGINÓLISE**

### **2.1. Efeitos da acidificação na produção de amônia por células intactas em suspensão e por biofilmes de bactérias SAD-positivas**

A atividade do sistema arginina desaminase de células em suspensão intactas de *S. sanguis* e *S. rattus* foi afetada moderadamente pela acidificação do meio na faixa de pH encontrada no biofilme dental, que varia de 4,0 a 6,0 (Tabela 2). A atividade do SAD em suspensões de células intactas de *S. rattus* foi maior que em suspensões de *S. sanguis*, nas mesmas condições experimentais, mesmo em pH 5,0 que foi o pH ideal para produção de amônia por células de *S. sanguis* nos experimentos.

A atividade do SAD nos biofilmes de ambos os organismos foi significativamente menor do que nas suspensões. Entretanto, biofilmes homogeneizados ou dispersos tiveram maior produção de amônia em meios com pH aumentado. Por outro lado, em valores de pH mais ácidos, a produção de amônia foi diminuída (Figura 7).

## **2.2. Efeitos de agentes antimicrobianos na arginólise por bactérias intactas em suspensão e em biofilmes**

A Figura 8 mostra que triclosan foi um efetivo inibidor da produção de amônia através da arginina em pH 4,0 por células intactas em suspensão de *S. sanguis* induzidas/desreprimidas (Fig. 8A) ou por células de *S. rattus* (Fig. 8D) ou por biofilmes intactos (Fig. 8B e 8E) ou por biofilmes dispersos (Fig. 8C e 8F) de ambas as bactérias. Os valores dos

controles para cada agente testado variaram porque culturas separadas tiveram que ser usadas para cada experimento de cada antimicrobiano.

Triclosan foi aproximadamente seis vezes mais efetivo na inibição da arginólise em pH 4,0 por células em suspensão de *S. sanguis* do que por biofilmes intactos (Fig. 8A e 8B) com valores de  $DI_{50}$  (dose inibitória de 50% do controle) estimados em 0,05 mM/h e 0,3 mM/h, respectivamente, com exposição ao agente por 1,5 hora para as suspensões e por 3 horas para os biofilmes. A concentração dos agentes é definida em mM multiplicado pelo tempo de exposição aos agentes em hora.

A dispersão dos biofilmes de *S. sanguis* e de *S. rattus* propiciou uma maior sensibilidade das células aos antimicrobianos (Fig. 8C e 8F, respectivamente).

Valores de  $DI_{50}$  similares aos de *S. sanguis* foram estimados para a inibição do SAD por triclosan em *S. rattus* (Fig. 8D, 8E, 8F).

O ácido orgânico fraco indometacina foi um pouco menos efetivo que triclosan como inibidor da arginólise em pH 4,0 com valores de  $DI_{50}$  de 0,08 e 0,6 mM/h contra suspensões e biofilmes, respectivamente, para ambas as bactérias (Fig. 8). Novamente, a resistência aumentada dos biofilmes comparados às suspensões foi diminuída quando estes foram dispersados.

Caprato e laurato foram menos efetivos, especialmente contra biofilmes, com valores de  $DI_{50}$  de 0,23 mM/h para ambos os agentes contra células intactas em suspensão de *S. sanguis* e 0,11 mM/h contra células intactas em suspensão de *S. rattus* em pH 4,0 (Fig. 8).

Valores de  $DI_{50}$  foram maiores que 3,0 mM/h contra biofilmes de ambas as bactérias por caprato e laurato. Laurato metil éster não foi inibitório, mas sim estimulatório para o SAD em pH 4,0 para suspensões ou biofilmes de *S. sanguis*.

O fluoreto, derivado do ácido inorgânico fraco HF, teve relativamente pouca potência para inibição do SAD de células intactas em suspensão ( $DI_{50} = 0,8$  mM/h) de ambas as bactérias em pH 4,0, especialmente em comparação à concentração do agente no biofilme dental que é de 0,1 a 0,5 mM. O fluoreto foi muito menos efetivo contra biofilmes intactos (Fig. 8B e 8E), mas quando testado em biofilmes dispersos, a produção de amônia se mostrou mais sensível a esse agente que a de biofilmes intactos (Fig. 8C e 8F).

A inibição por triclosan foi relativamente insensível às variações no pH do meio e 1,5 mM/h foi mais de 95% inibitório para arginólise por células intactas em suspensão de ambas as bactérias em valores de pH 4,0, 5, 0 e 6,0 (Tabela 3 e Fig. 8). Em contraste, 1,5 mM/h indometacina, por exemplo, não foi inibitório em pH 6,0, mas foi 85% inibitório em pH 5,0 e 92% em pH 4,0 para arginólise por suspensões de células intactas de *S. rattus*. Um padrão similar de inibição foi encontrado em células intactas em suspensão de *S. sanguis* e também para caprato contra ambas as bactérias.

Além disso, a ação inibitória de indometacina e caprato da arginólise por células intactas em suspensão de *S. sanguis* e *S. rattus* se mostrou irreversível (Figuras 9 e 10, respectivamente). Após expor as células ao substrato arginina e às concentrações de 0,2 e 1,0 mM de indometacina e caprato por uma hora, elas foram lavadas e receberam uma nova dose de arginina, mas não dos ácidos orgânicos fracos. Observou-se então que, mesmo após 18 horas, as células não tiveram capacidade de elevar o pH do meio, indicando que a produção de amônia foi inibida irreversivelmente.

### **2.3. Efeitos dos antimicrobianos na atividade das enzimas do SAD em extratos celulares**

Resultados obtidos no presente estudo indicam que a atividade da enzima arginina desaminase em extratos celulares de *S. sanguis* ou *S. rattus* não foi afetada por triclosan, indometacina, caprato, laurato ou laurato metil éster nas concentrações de 1,0 mM (dados não apresentados). Da mesma forma, os agentes não tiveram efeito significativo na atividade da enzima ornitina carbamil transferase em ambas as bactérias (dados não apresentados).

Porém, como mostrado na Figura 11A, a enzima carbamato quinase em extratos celulares de *S. sanguis* foi inibida por triclosan e indometacina. Triclosan foi o inibidor mais potente com o valor de  $DI_{50}$  ao redor de 0,6 mM/h. Indometacina foi menos potente com valor de  $DI_{50}$  ao redor de 1,5 mM/h, enquanto caprato e laurato não foram inibidores efetivos da enzima, pelo menos não na dose de 1,5 mM/h. Laurato metil éster foi estimulatório para a atividade

enzimática. Resultados semelhantes foram obtidos para *S. rattus* (Fig. 11B) com um valor de  $DI_{50}$  de 0,3 mM/h para triclosan.

#### **2.4. Efeitos dos agentes na captação do substrato arginina por *S. sanguis* e *S. rattus***

Outro possível alvo para os agentes estudados são os sistemas de captação de arginina pelas células bacterianas.

O resultado apresentado na Figura 12 mostra que a captação de arginina por células intactas em suspensão de *S. rattus* foi altamente sensível à inibição, em pH 4,0, por triclosan, indometacina, caprato e laurato, mas não por fluoreto ou laurato metil éster, nas concentrações de 0,2 ou 1,0 mM. O padrão de inibição de células intactas em suspensão em pH 4,0 foi caracterizado por uma captação inicial rápida de arginina através da solução saturada de 47 mM de arginina uniformemente marcada com carbono 14. Dados semelhantes foram encontrados por células intactas em suspensão de *S. sanguis* em pH 4,0 (Figura 13), com exceção do laurato que se mostrou pouco potente.

Para células intactas em suspensão de *S. rattus* em pH 6,0 no mesmo experimento (Figura 14), triclosan permaneceu altamente potente como inibidor, enquanto indometacina e caprato não foram mais efetivos. Laurato

manteve alguma potência, mas somente na concentração de 1,0 mM. Fluoreto e laurato metil éster continuaram sem efeito inibitório. Resultados semelhantes foram obtidos para células de *S. sanguis* em pH 6,0 (Figura 15), exceto para indometacina que mostrou alguma inibição na concentração de 1,0 mM.

## **2.5. Efeitos da acidificação e dos agentes antimicrobianos na produção de amônia por biofilme dental supragengival humano com arginina como substrato**

Em relação à produção de amônia por biofilmes dentais supragengivais humanos com arginina como substrato, a Figura 16 mostra que 1,0 mM de fluoreto foi quase 50% inibitório para arginólise em pH 4,0, mas essencialmente não houve efeito inibitório em pH 6,0 e muito pouco em pH 5,0.

Triclosan foi inibitório nos três valores de pH, sendo maior o efeito em pH 4,0. Os ácidos orgânicos fracos indometacina, caprato e laurato, da mesma forma que fluoreto, foram inibitórios num padrão pH-dependente. Por outro lado, laurato metil éster foi, especialmente em pH 4,0, estimulatório para arginólise.

**Tabela 1.** Produção de amônia por células de *S. epidermidis*, *S. salivarius* e *A. naeslundii* intactas em suspensão e em biofilmes em diferentes e constantes valores de pH.

	pH 6,0	pH 5,0	pH 4,0
	Amônia	Amônia	Amônia
<b><i>S. epidermidis</i></b>			
Células Intactas (1h) <sup>(1)</sup>	174,0 <sup>(2)</sup> ± 23,6 <sup>(4)</sup>	172,8 ± 20,9	123,8 ± 30,7
Biofilmes Intactos (1h)	22,1 <sup>(3)</sup> ± 5,0	33,9 ± 15,3	36,6 ± 4,9
<b><i>S. salivarius</i></b>			
Células Intactas (2h)	4,9 ± 1,4	2,5 ± 0,7	0,7 ± 0,3
Biofilmes Intactos (3h)	1,4 ± 0,6	1,4 ± 0,3	1,0 ± 0,6
Biofilmes Dispersos (3h)	1,3 ± 0,3	0,7 ± 0,2	0,3 ± 0,1
<b><i>A. naeslundii</i></b>			
Células Intactas (2h)	0,9 ± 0,6	0,6 ± 0,3	0,3 ± 0,1
Biofilmes Intactos (5h)	1,3 ± 0,2	1,0 ± 0,05	0,9 ± 0,06

(1) Em parênteses, tempo total para produção de amônia;

(2)  $\mu\text{mol}$  de amônia por mg peso seco de células;

(3)  $\mu\text{mol}$  de amônia por mg peso seco de biofilme;

(4) Desvio padrão de pelo menos três experimentos.

**Tabela 2.** Produção de amônia por células de *S. sanguis* e *S. rattus* intactas em suspensão e em biofilmes em ambientes com diferentes e constantes valores de pH.

	pH 6,0	pH 5,0	pH 4,0
<b><i>S. sanguis</i></b>	<b>Amônia</b>	<b>Amônia</b>	<b>Amônia</b>
Células Intactas (1,5h) <sup>(1)</sup>	2,16 <sup>(2)</sup> $\pm$ 0,63 <sup>(4)</sup>	2,83 $\pm$ 0,50	1,77 $\pm$ 0,39
Biofilmes Intactos (3h)	0,57 <sup>(3)</sup> $\pm$ 0,02	0,65 $\pm$ 0,09	0,41 $\pm$ 0,23
Biofilmes Homogeneizados (3h)	0,81 $\pm$ 0,22	0,68 $\pm$ 0,06	0,33 $\pm$ 0,15
Biofilmes Dispersos (3h)	1,55 $\pm$ 0,45	1,06 $\pm$ 0,43	0,39 $\pm$ 0,03
<b><i>S. rattus</i></b>			
Células Intactas (1,5h)	4,08 $\pm$ 0,47	3,12 $\pm$ 0,47	2,71 $\pm$ 0,41
Biofilmes Intactos (3h)	0,86 $\pm$ 0,18	0,87 $\pm$ 0,40	0,78 $\pm$ 0,37
Biofilmes Homogeneizados (3h)	0,88 $\pm$ 0,17	0,73 $\pm$ 0,31	0,62 $\pm$ 0,31
Biofilmes Dispersos (3h)	1,15 $\pm$ 0,23	0,59 $\pm$ 0,32	0,18 $\pm$ 0,09

(1) Em parênteses, tempo total para produção de amônia;

(2)  $\mu\text{mol}$  de amônia por mg peso seco de células por hora;

(3)  $\mu\text{mol}$  de amônia por mg peso seco de biofilme por hora;

(4) Desvio padrão de pelo menos três experimentos.

3. Percentual de produção de amônia em relação aos controles por células de *S. sanguis* e *S. rattus* intactas em suspensão na presença de

	NaF		Triclosan						Indometacina			Caprato		
	0,2 <sup>(2)</sup>	1,0	0,025	0,05	0,1	0,2	0,5	1,0	0,2	0,5	1,0	0,2	0,5	1,0
<b><i>S. sanguis</i></b>														
<b>pH 6,0</b>	107,5	104,1	NT <sup>(3)</sup>	NT	41,3	15,6	NT	4,1	108,0	NT	77,2	100,0	NT	66,7
<b>pH 5,0</b>	106,5	124,1	93,1	84,4	29,8	5,9	4,1	3,4	98,6	18,6	2,8	107,1	25,0	7,1
<b><i>S. rattus</i></b>														
<b>pH 6,0</b>	100,8	105,7	NT	NT	32,4	20,7	NT	3,9	114,0	NT	104,9	123,9	NT	56,1
<b>pH 5,0</b>	101,9	95,1	75,2	57,5	18,1	14,3	9,5	2,7	103,9	72,7	14,7	107,8	6,5	2,1

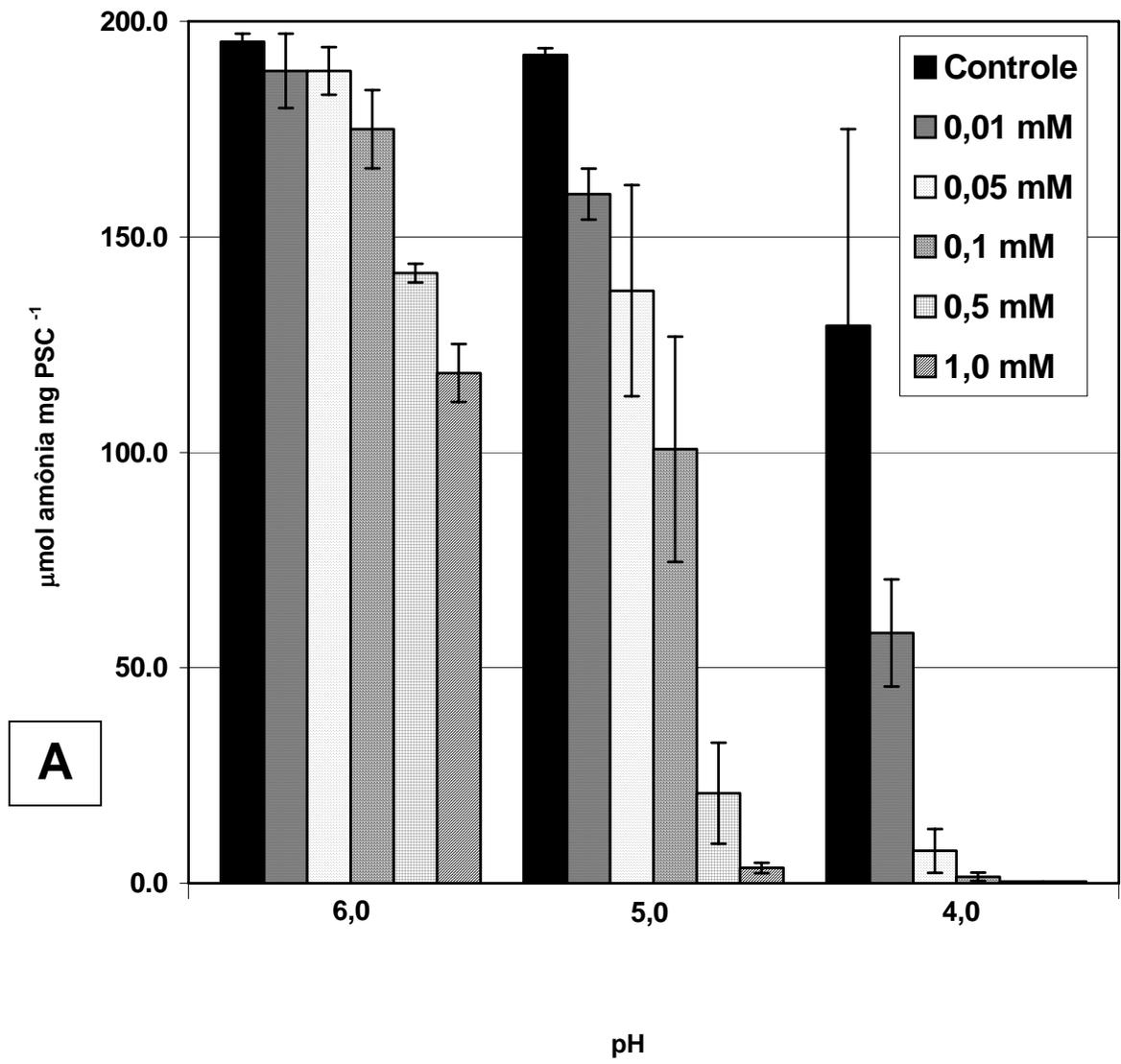
es agentes em ambientes com valores de pH constantes. <sup>(1)</sup>

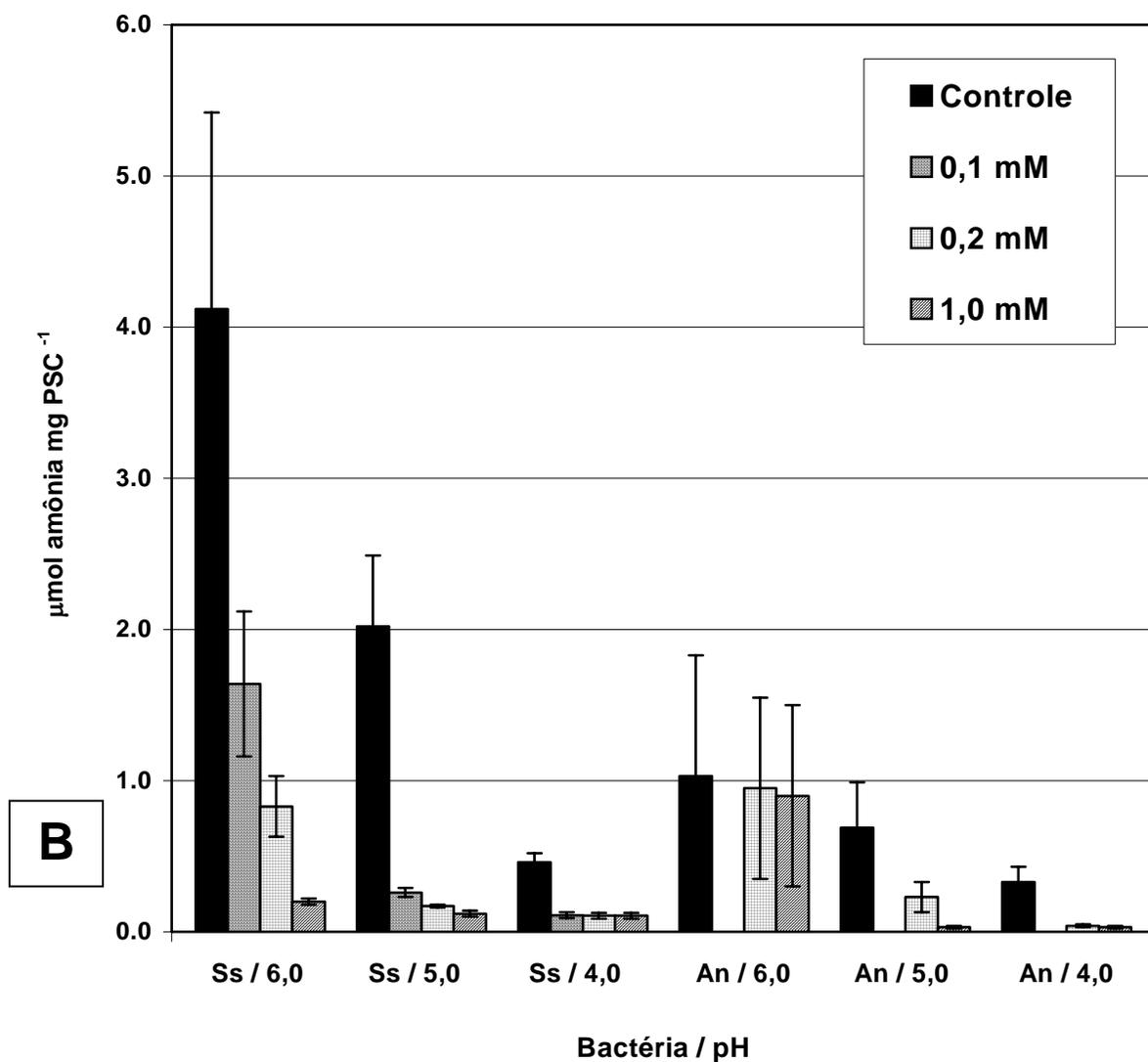
(1) Experimento com duração de 1,5 h;

(2) Concentração dos agentes expressas em mM;

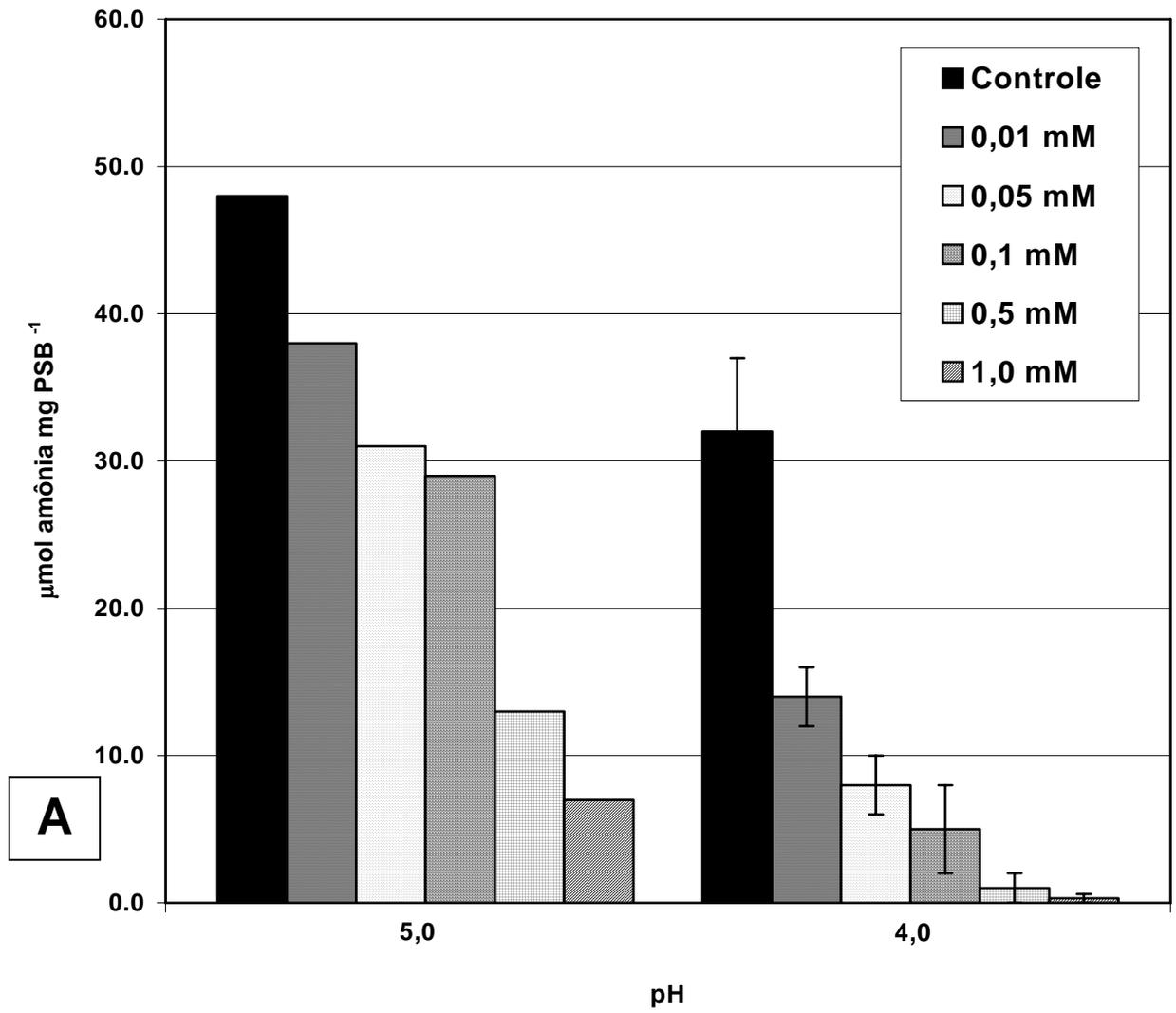
(3) NT, não testado.

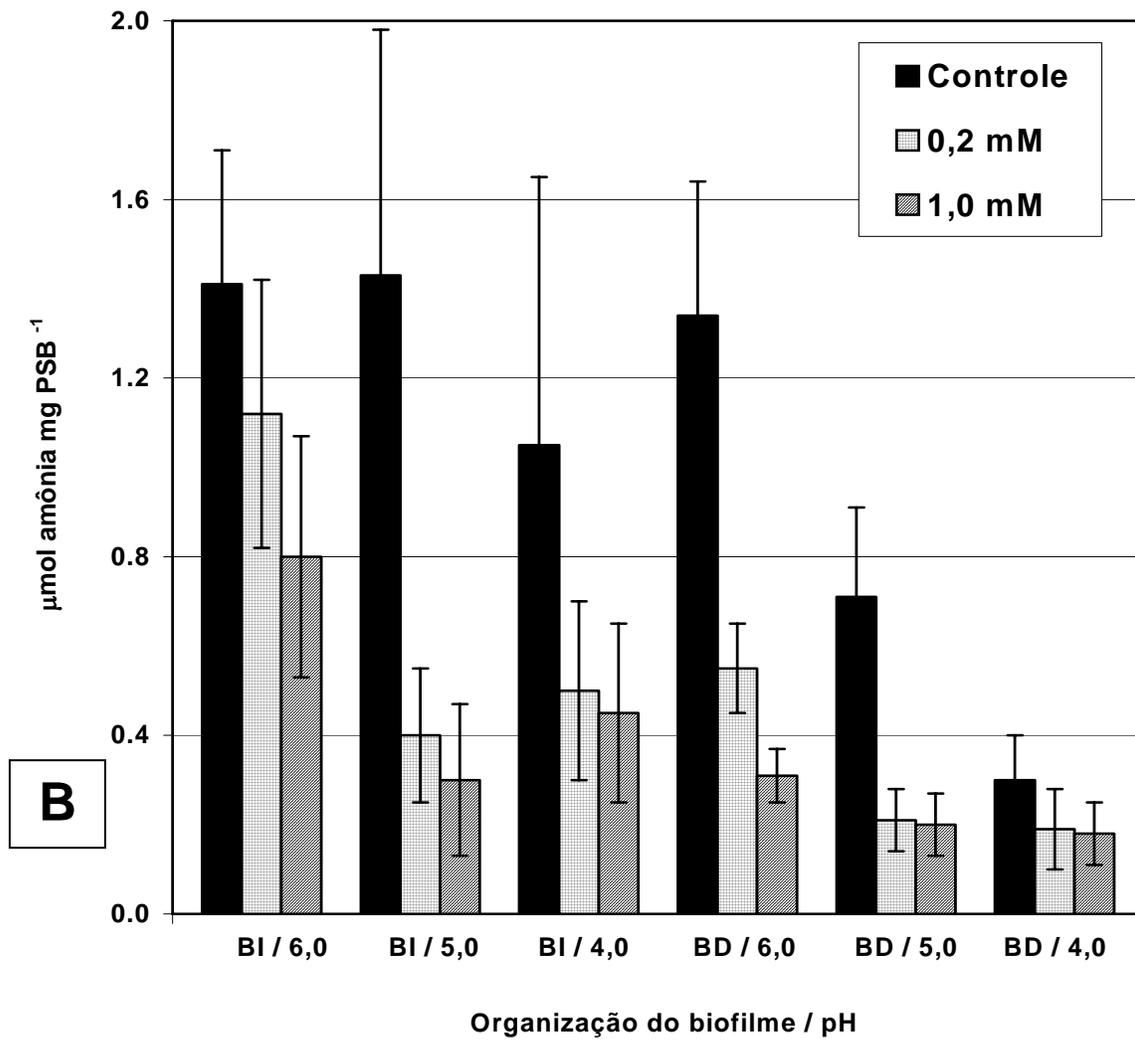


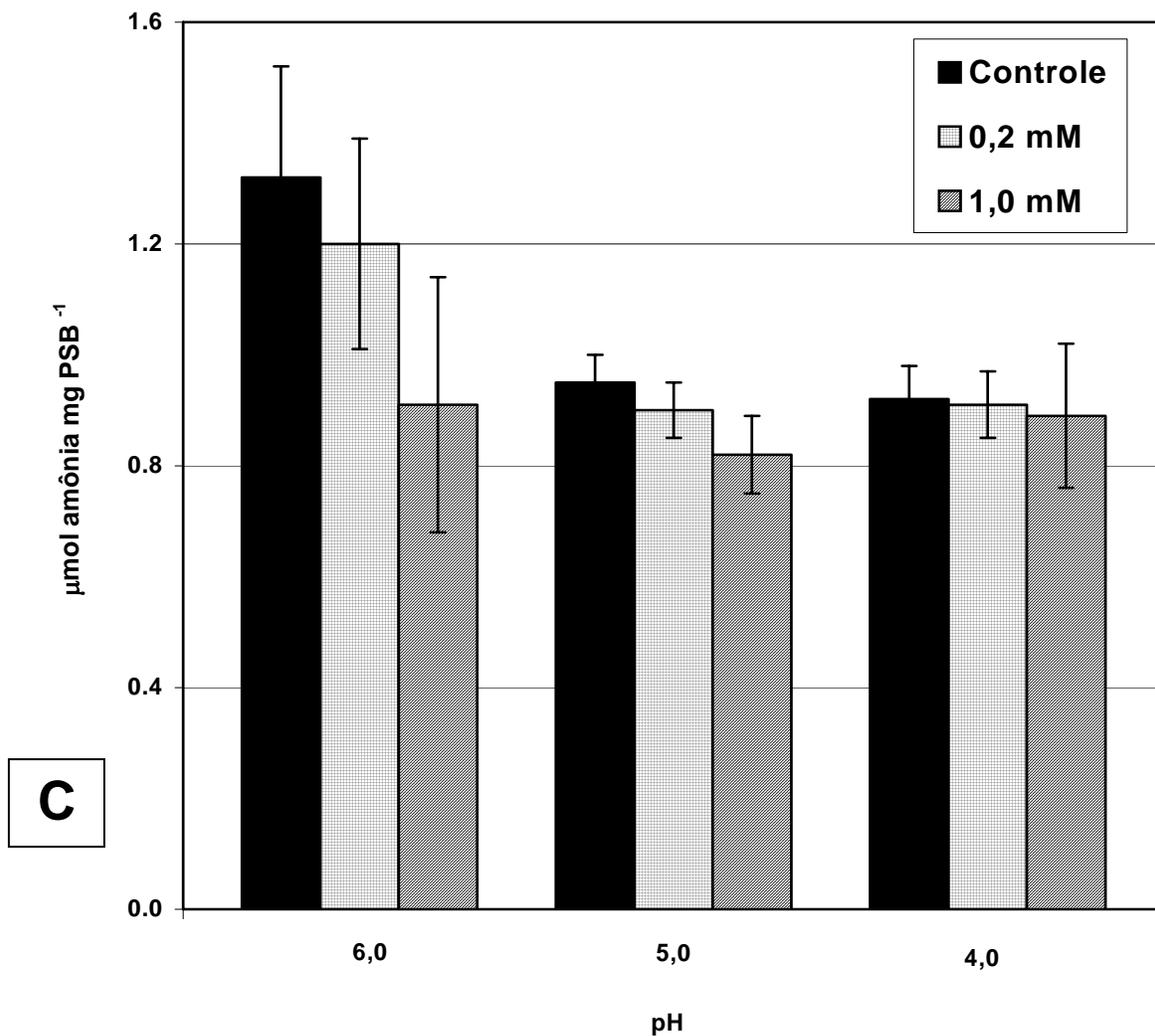




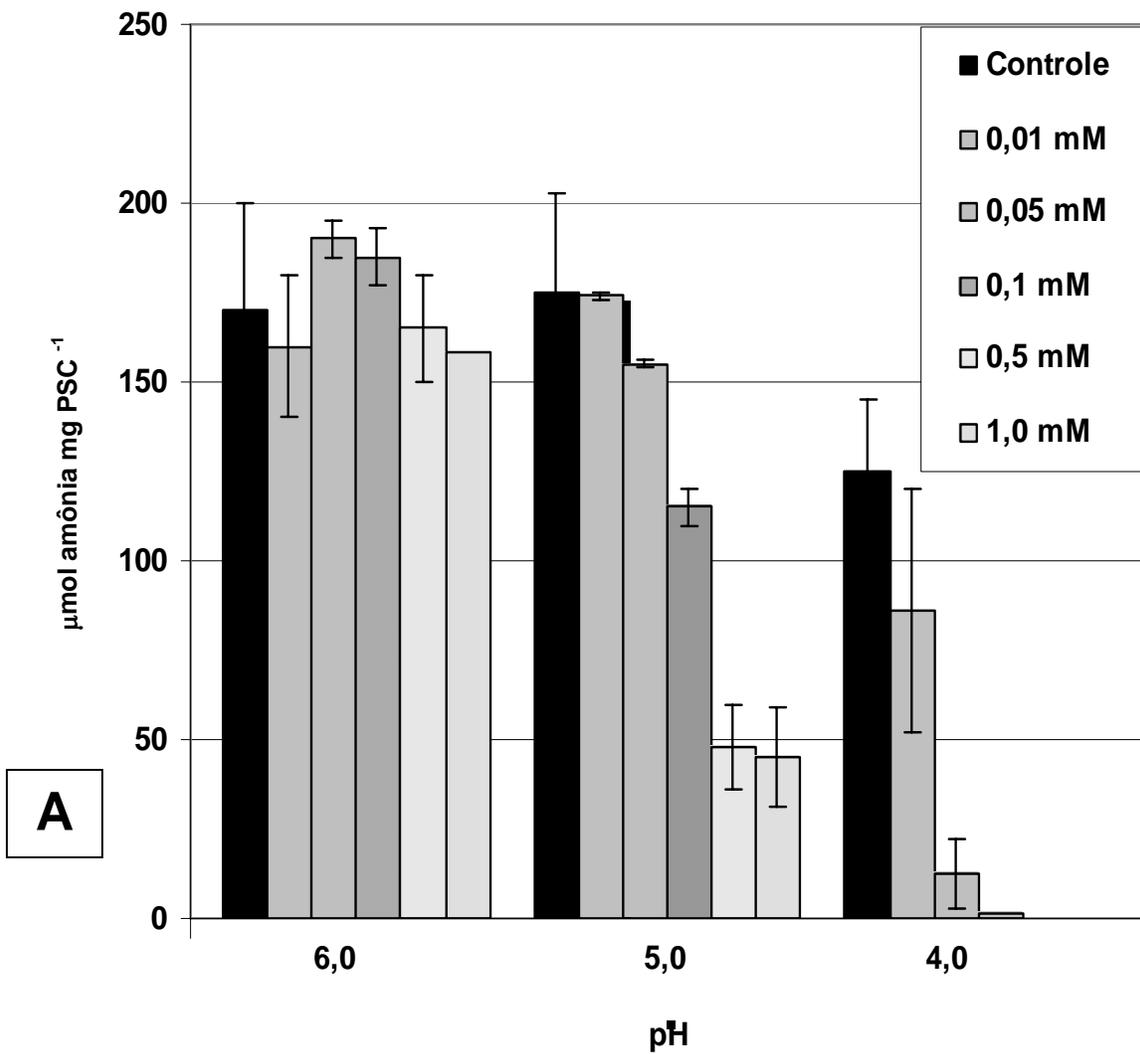
**Fig. 1.** Inibição da produção de amônia pelo fluoreto de células intactas de *S. epidermidis* (A – durante 1 hora), *S. salivarius* (Ss) ou *A. naeslundii* (An) (B – durante 2 horas) em suspensão em valores de pH constantes. Barras de erro são referentes ao desvio padrão de pelo menos três experimentos. *A. naeslundii* (B) não foi testado com 0,1mM de fluoreto.

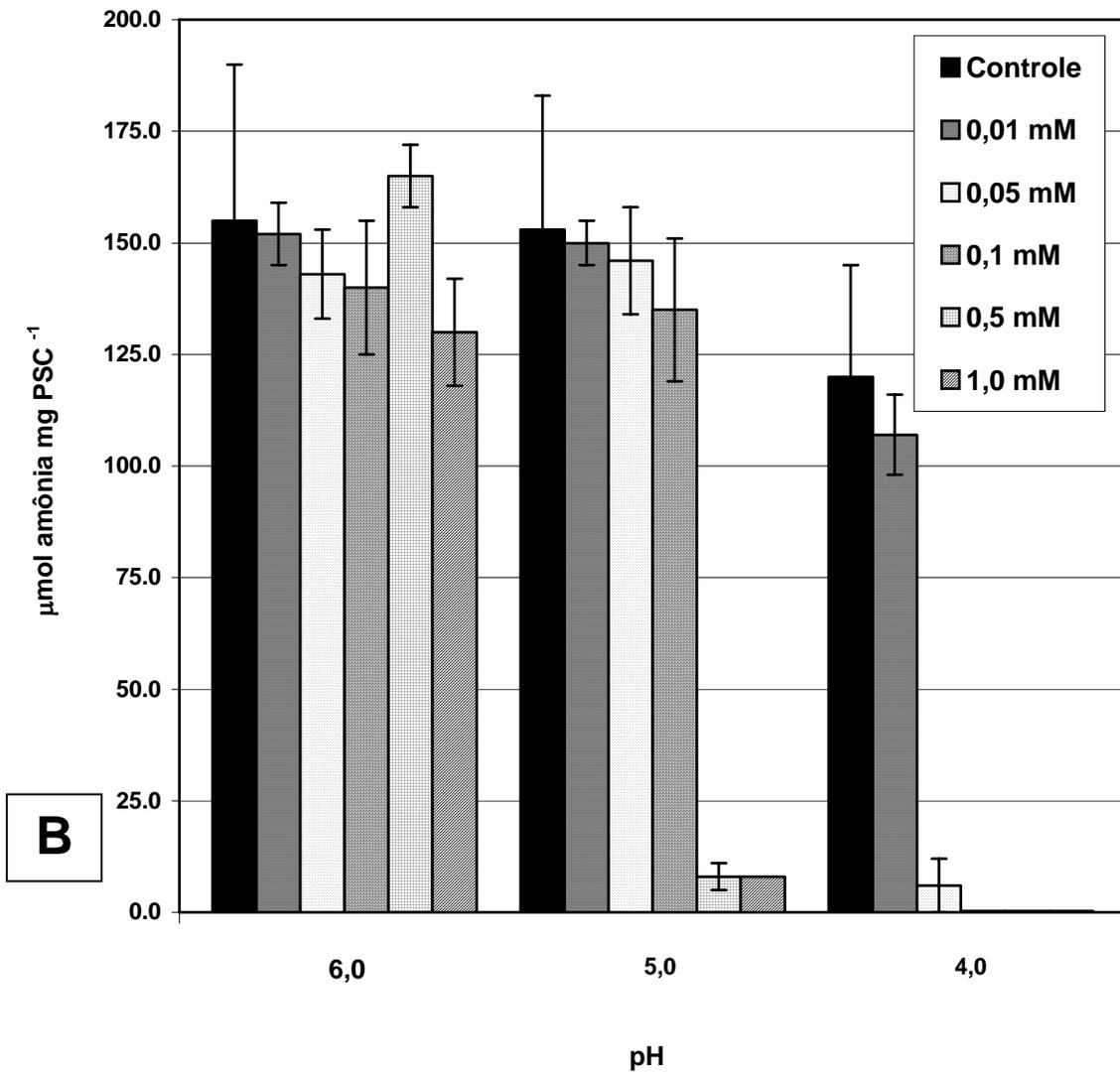


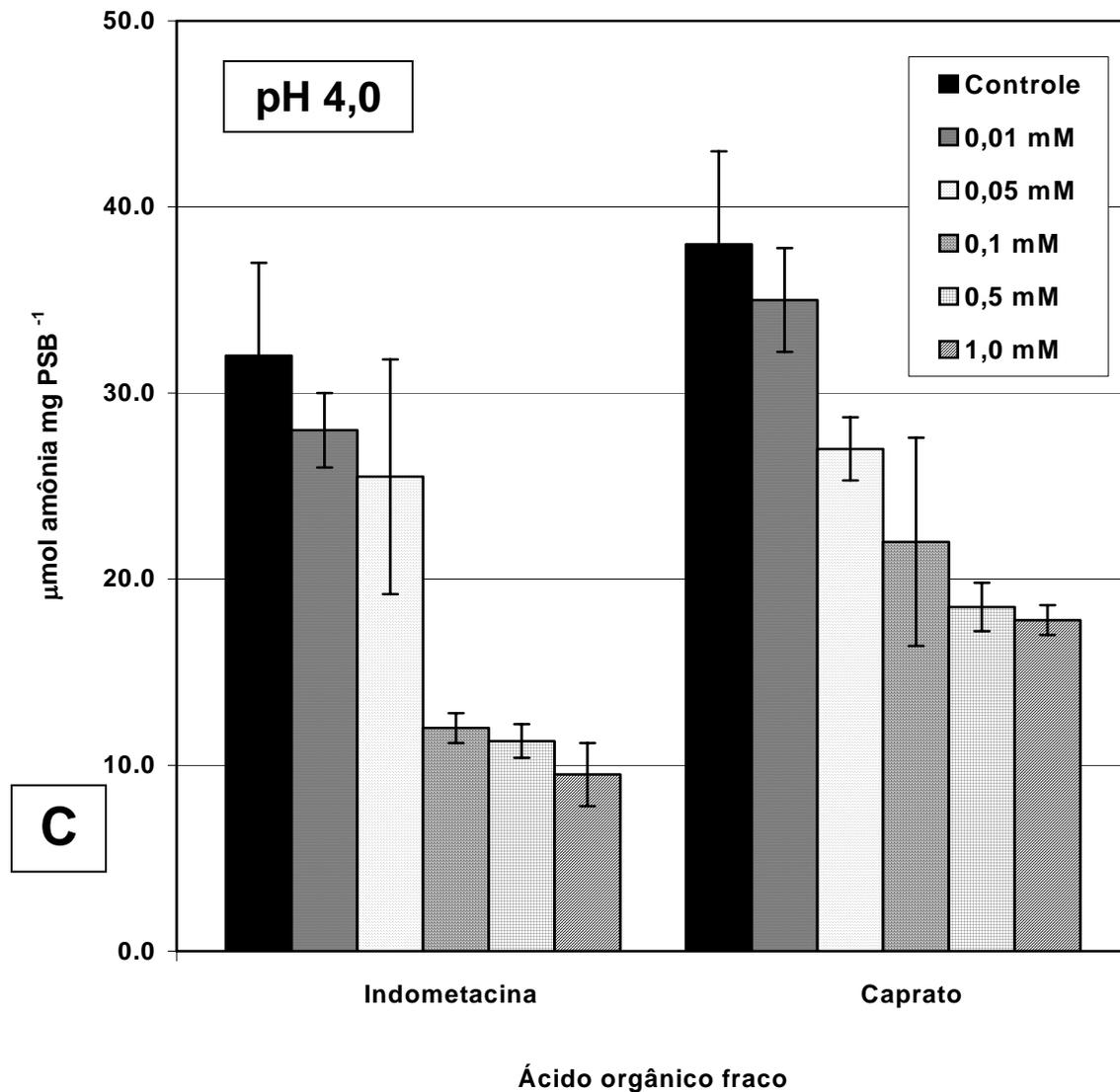




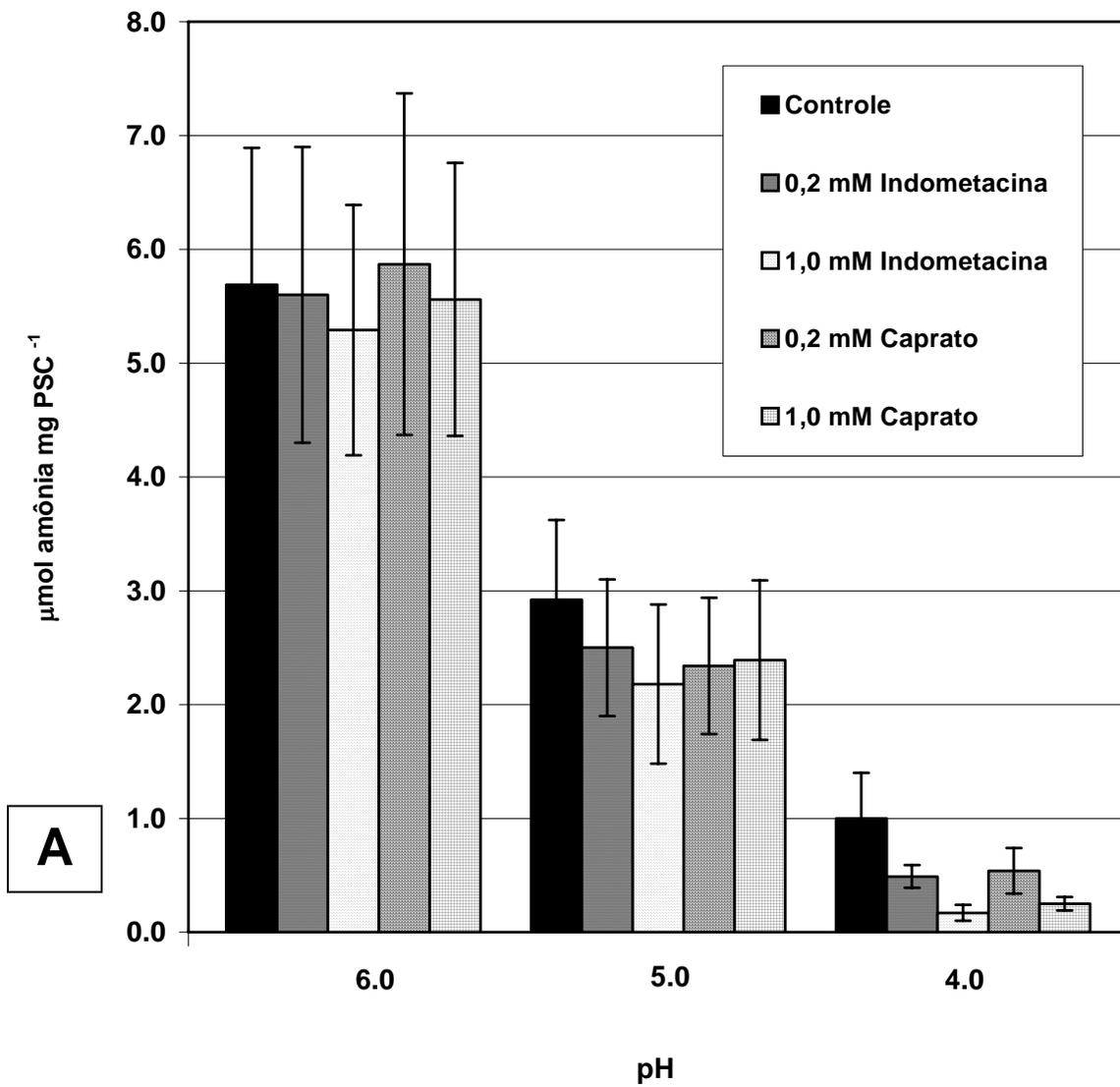
**Fig. 2.** Inibição pelo fluoreto da produção de amônia por biofilmes intactos de *S. epidermidis* (A – durante 1 hora), por biofilmes Intactos (BI) ou biofilmes dispersos (BD) de *S. salivarius* (B – durante 3 horas) e por biofilmes Intactos de *A. naeslundii* (C – durante 5 horas) em valores constantes de pH. Barras de erro são referentes ao desvio padrão de pelo menos três experimentos. Valores médios de dois experimentos separados são apresentados para *S. epidermidis* (A) em pH 5,0.

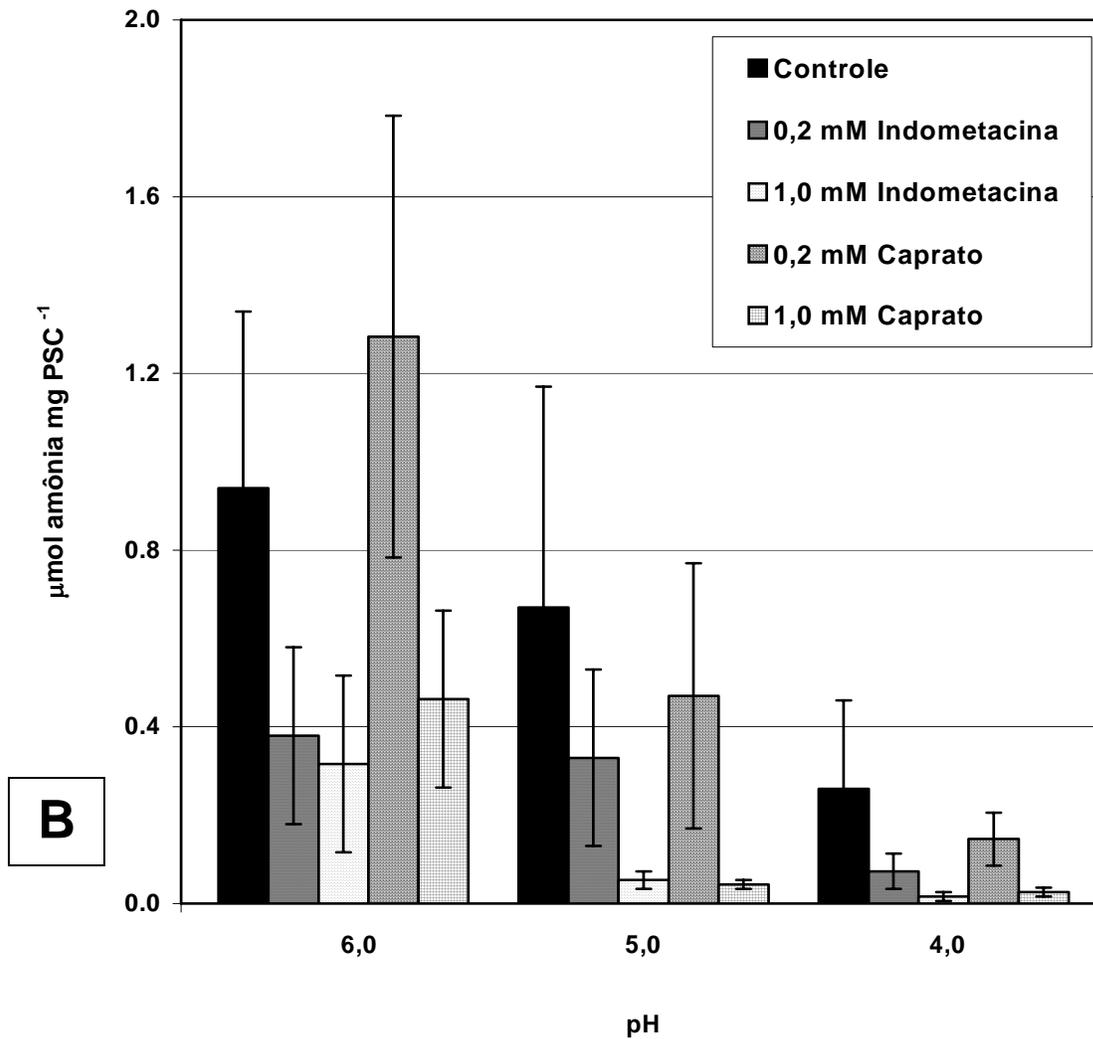




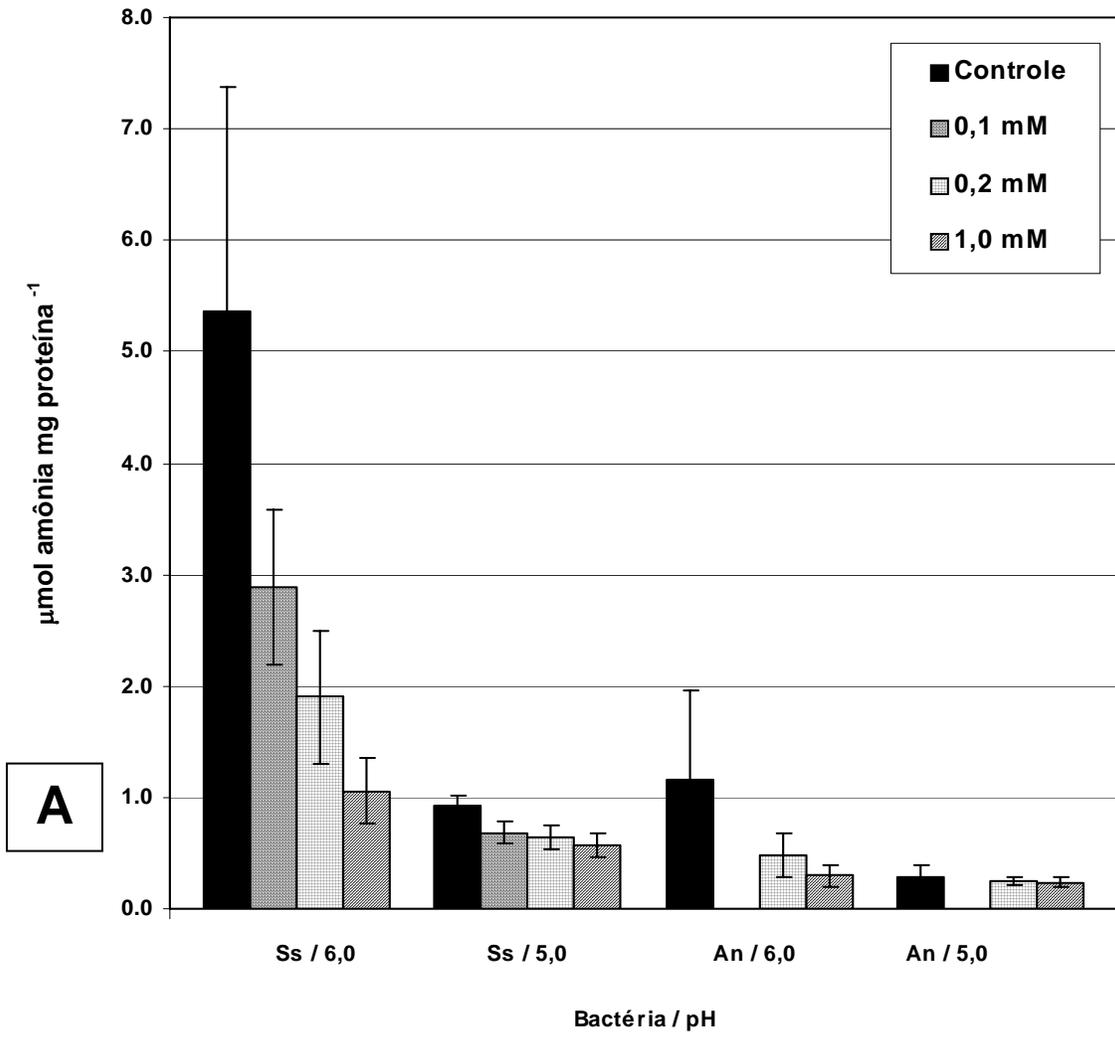


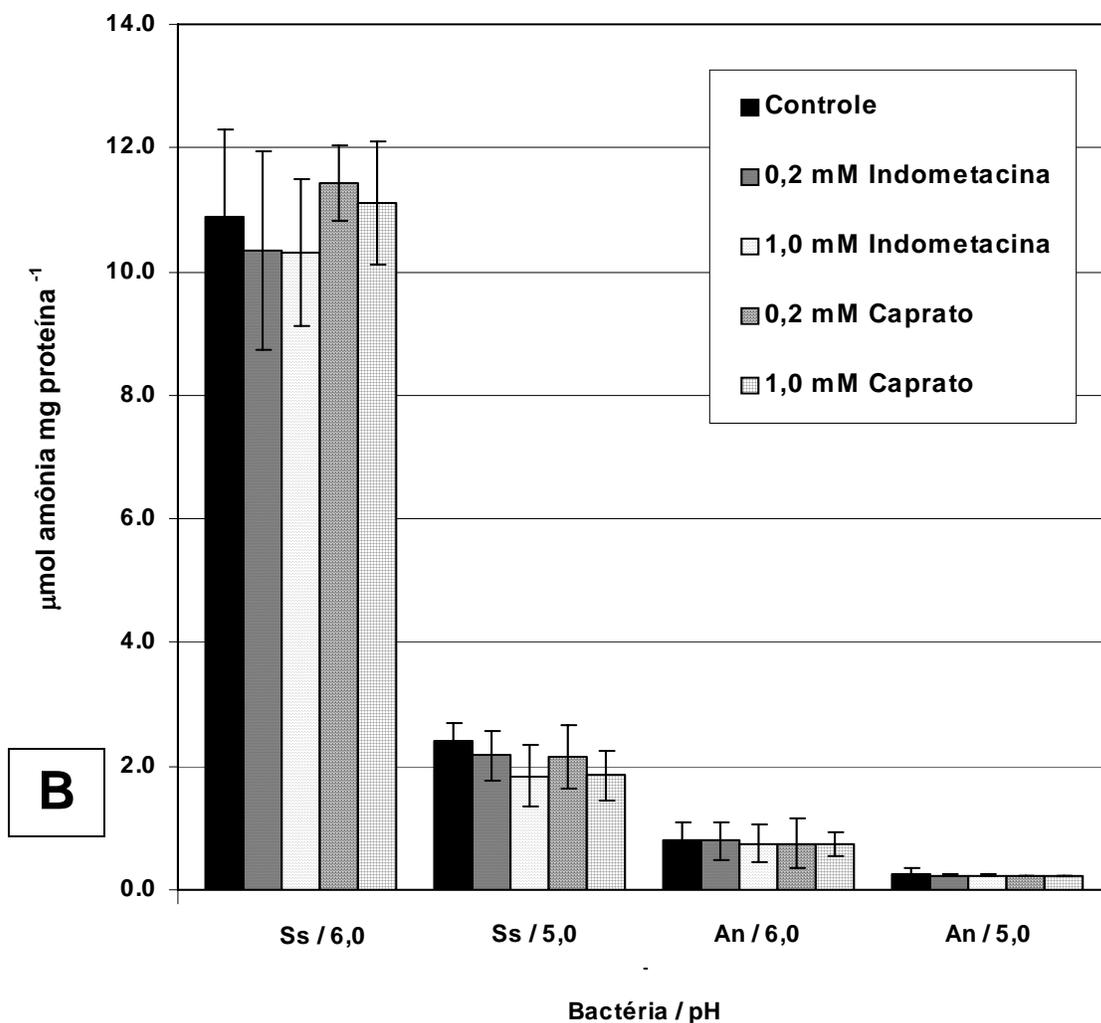
**Fig. 3.** Inibição pela Indometacina (A) ou Caprato (B) da produção de amônia por células intactas em suspensão de *S. epidermidis* ou inibição por ambos ácidos orgânicos fracos (C) da produção de amônia por biofilmes intactos de *S. epidermidis* em valores constantes de pH durante 1 hora. Barras de erro representam desvio padrão de pelo menos três experimentos.



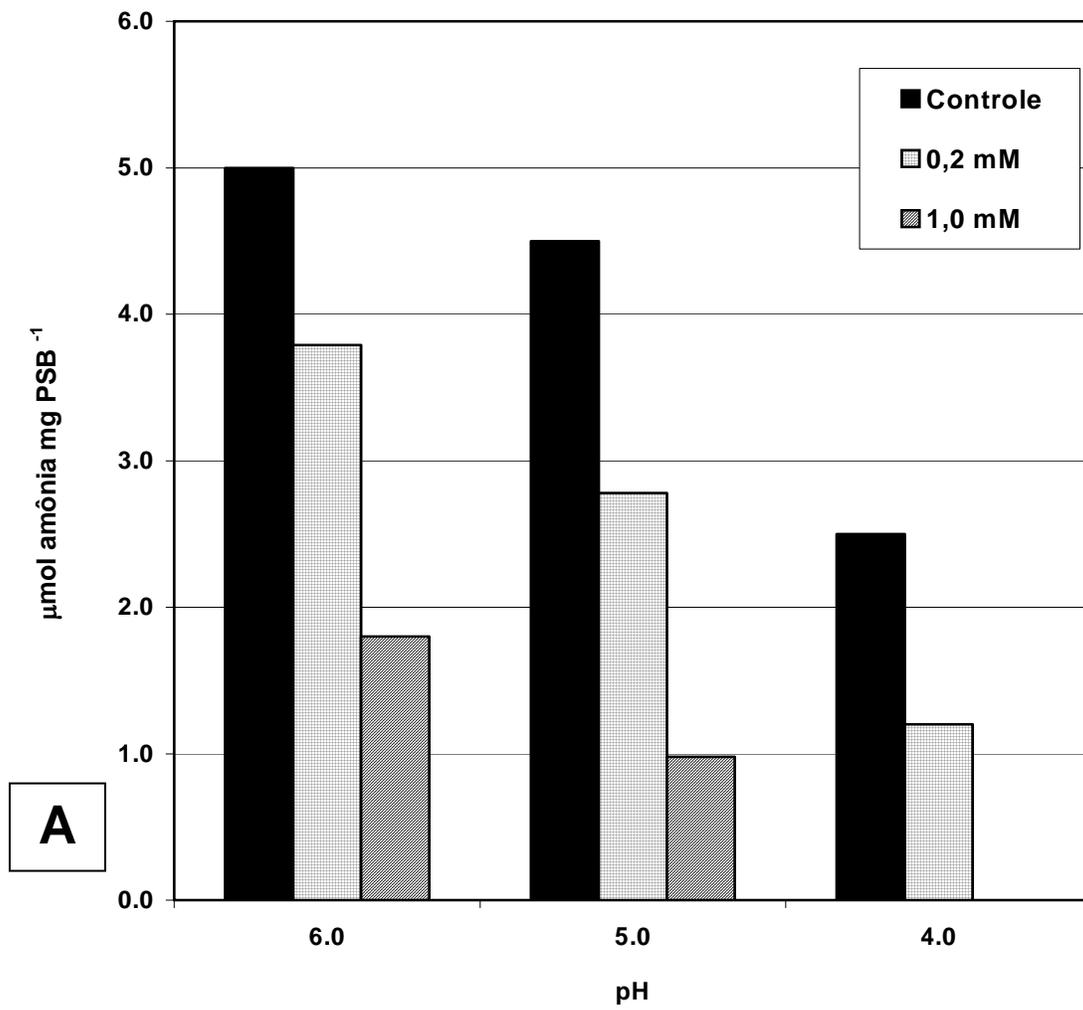


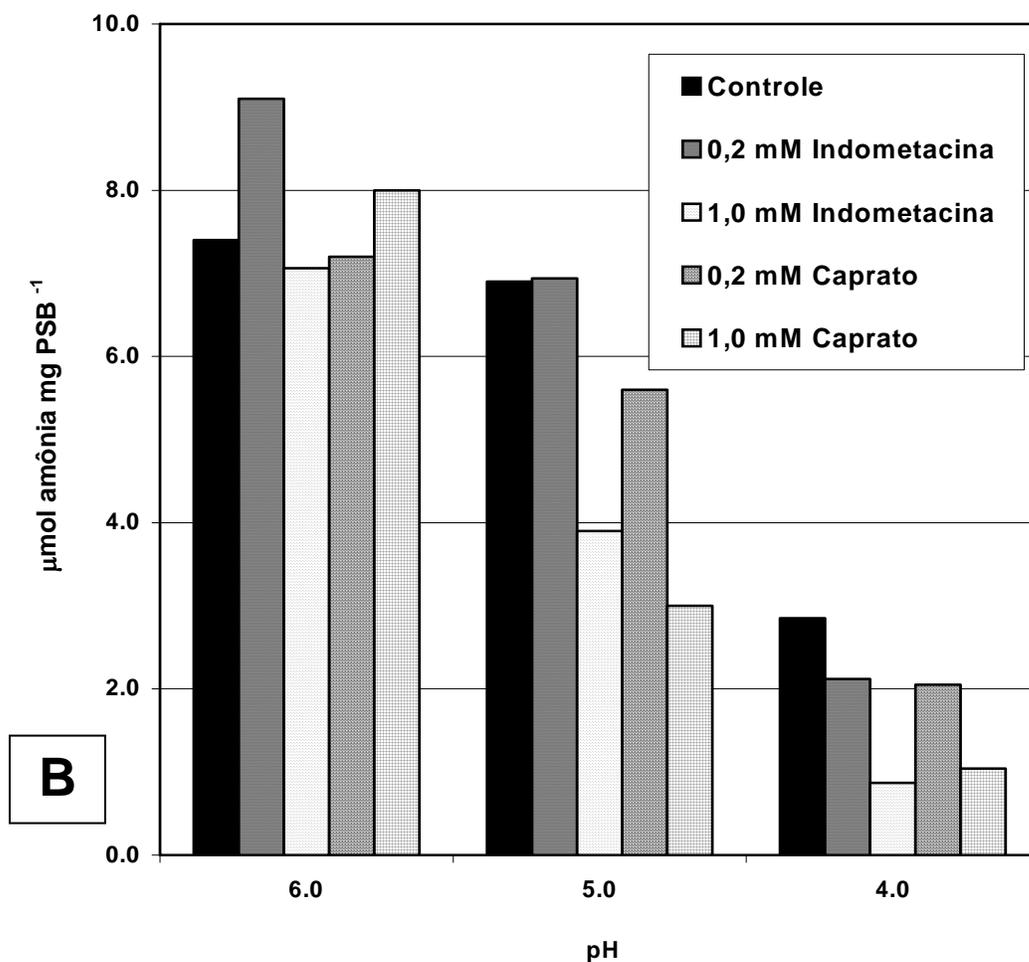
**Fig. 4.** Inibição da produção de amônia de células intactas de *S. salivarius* (A) e *A. naeslundii* (B) causadas por ácidos orgânicos fracos em valores constantes de pH durante duas horas. Barras de erro representam desvio padrão de três experimentos.



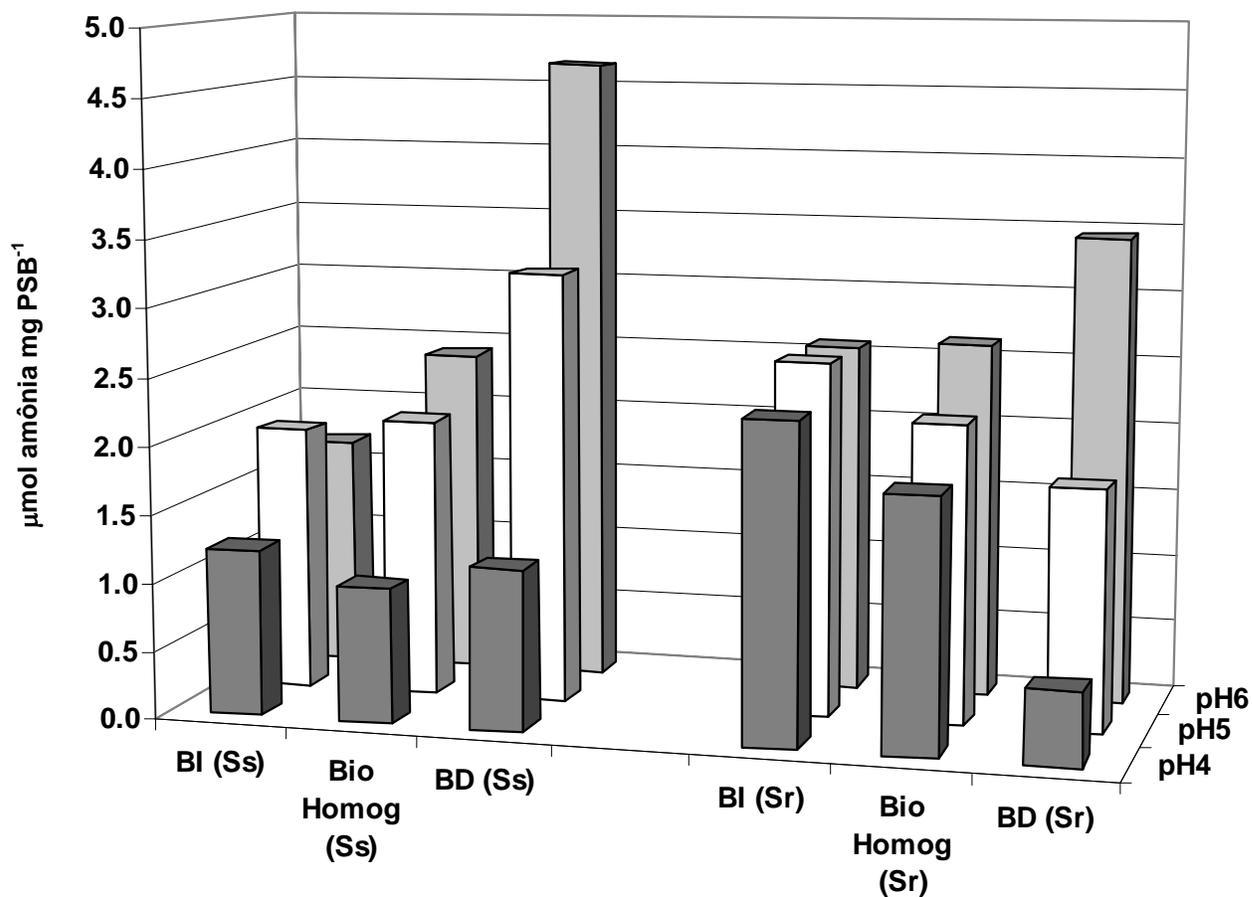


**Fig. 5.** Produção de amônia indicando atividade da urease por extratos celulares de *S. salivarius* (Ss) e *A. naeslundii* (An) e ação inibitória do fluoreto (A) ou dos ácidos orgânicos fracos (B) durante duas horas em valores constantes de pH. Barras de erro representam desvio padrão de três experimentos. *A. naeslundii* não foi testado com 0,1 mM de fluoreto.

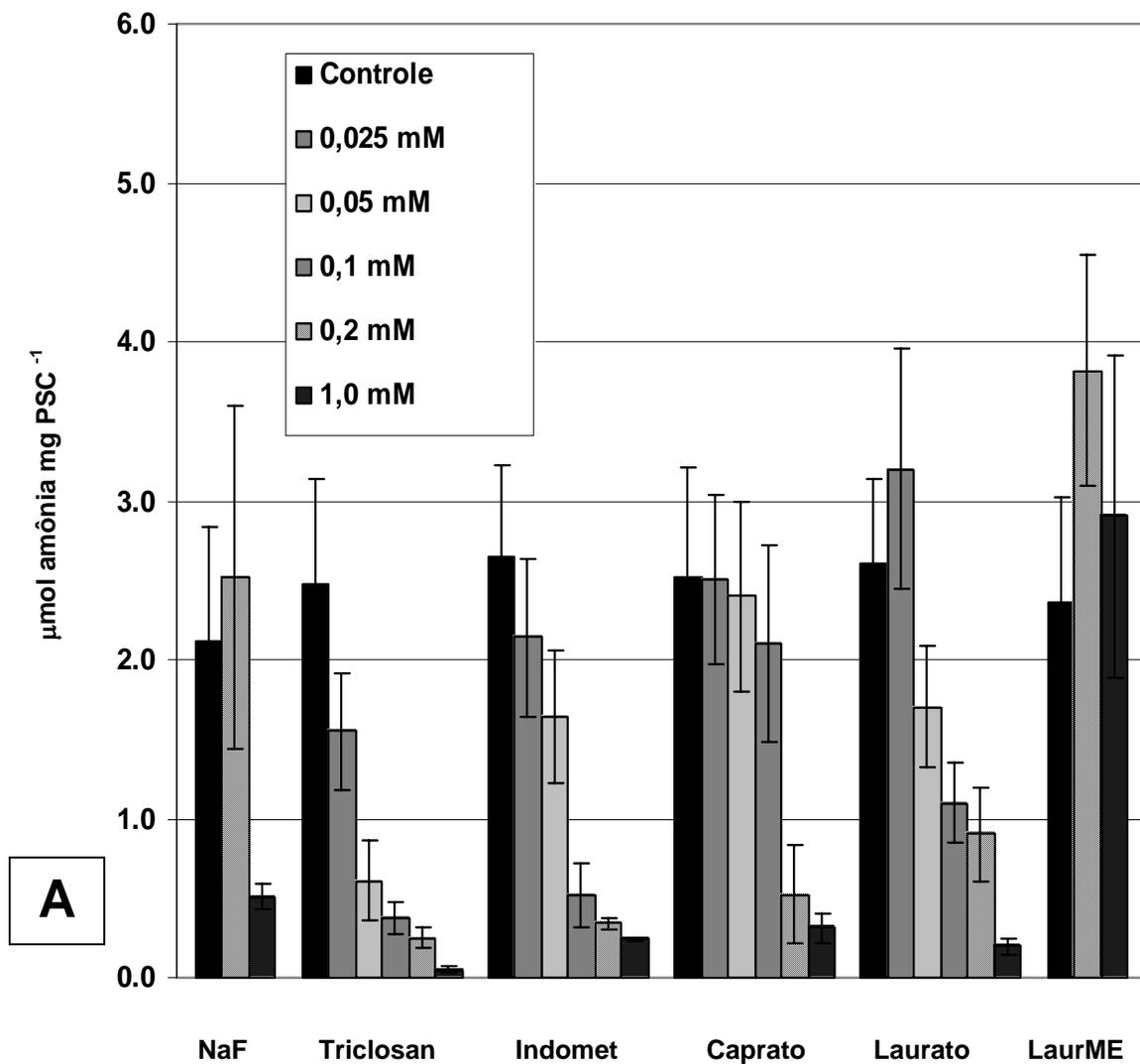


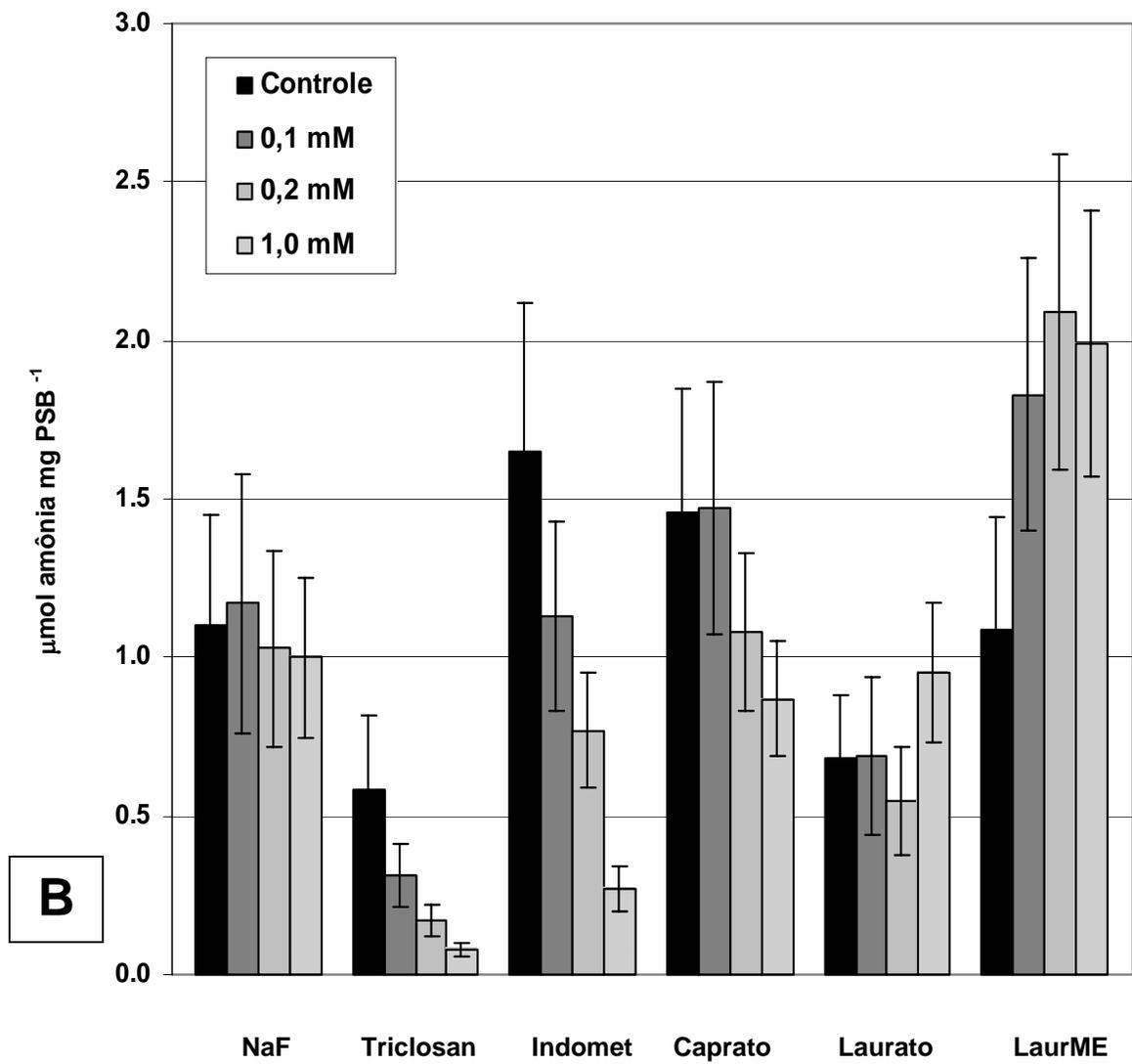


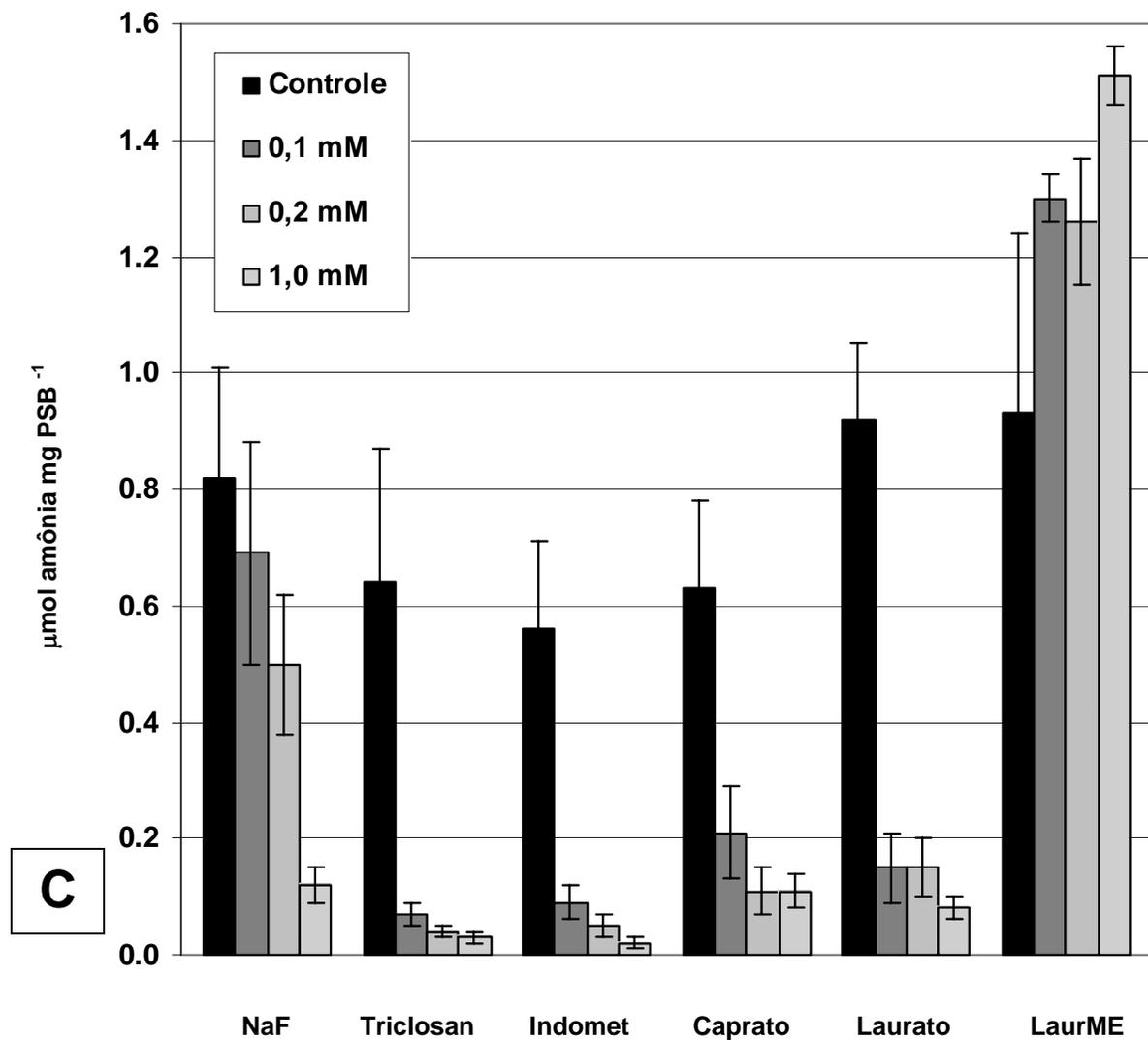
**Fig. 6.** Produção de amônia por biofilme dental humano em valores de pH diferentes e constantes e inibição pelo fluoreto (A) ou por ácidos orgânicos fracos (B) durante 2 horas. Valores médios de dois experimentos são apresentados.

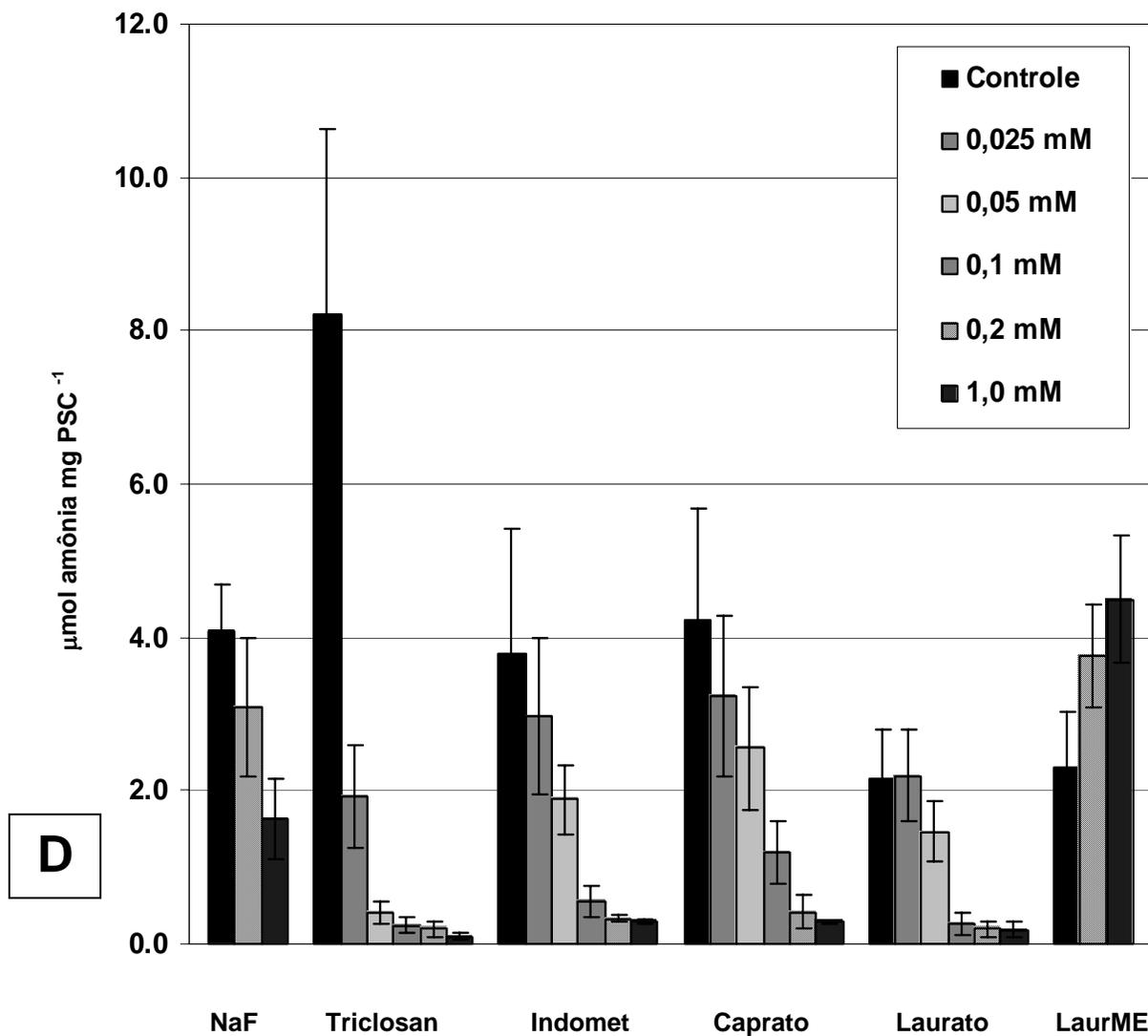


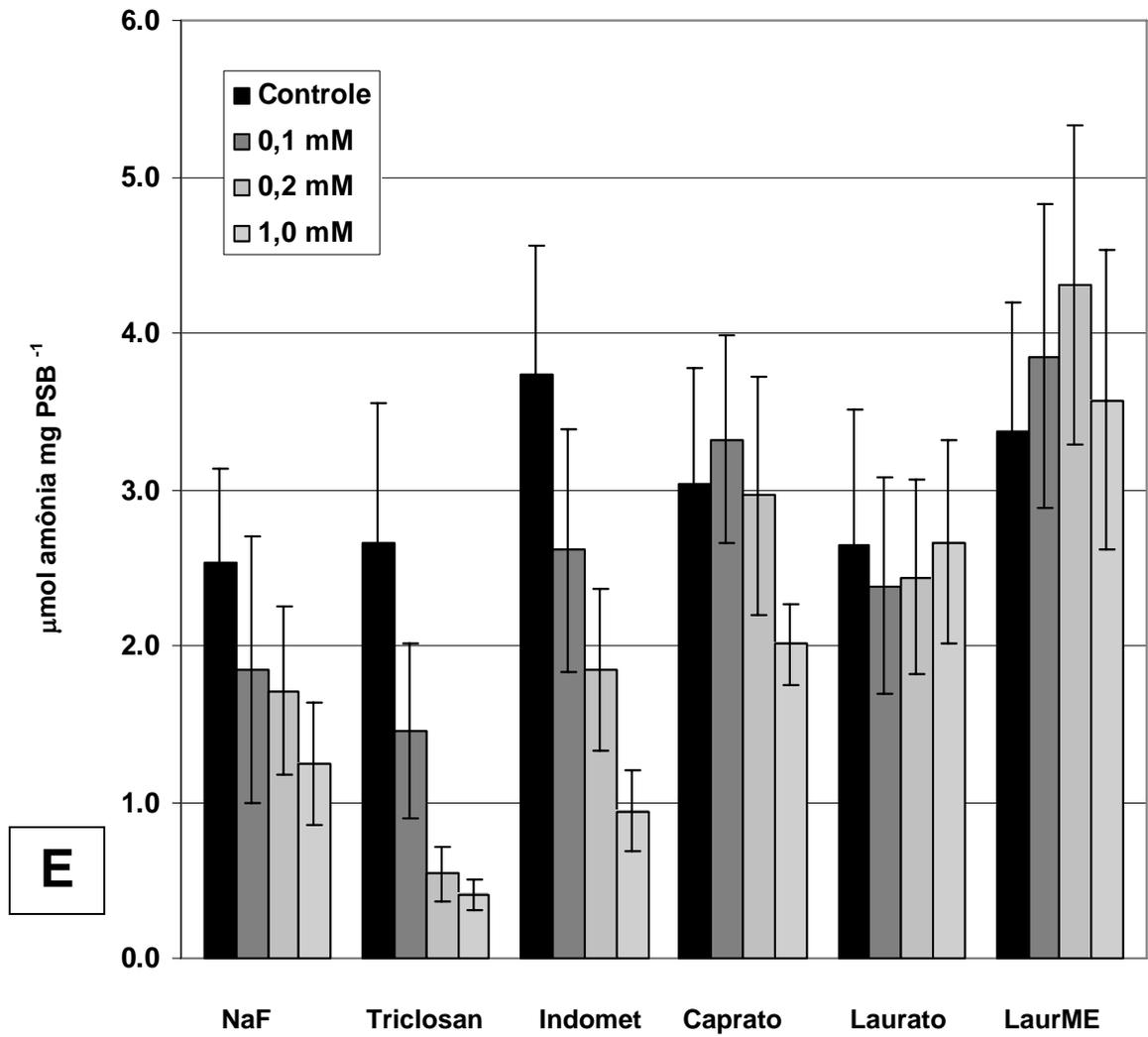
**Fig. 7.** Produção de amônia através da arginina por diferentes organizações de biofilme de *S. sanguis* e de *S. rattus* em diferentes e constantes valores de pH. **Ss** – *S. sanguis*, **Sr** – *S. rattus*, **BI** – biofilme intacto, **Bio Homog** – biofilme homogeneizado, **BD** – biofilme disperso. Média de pelo menos três experimentos. Valores de desvio padrão apresentados na Tabela 2.

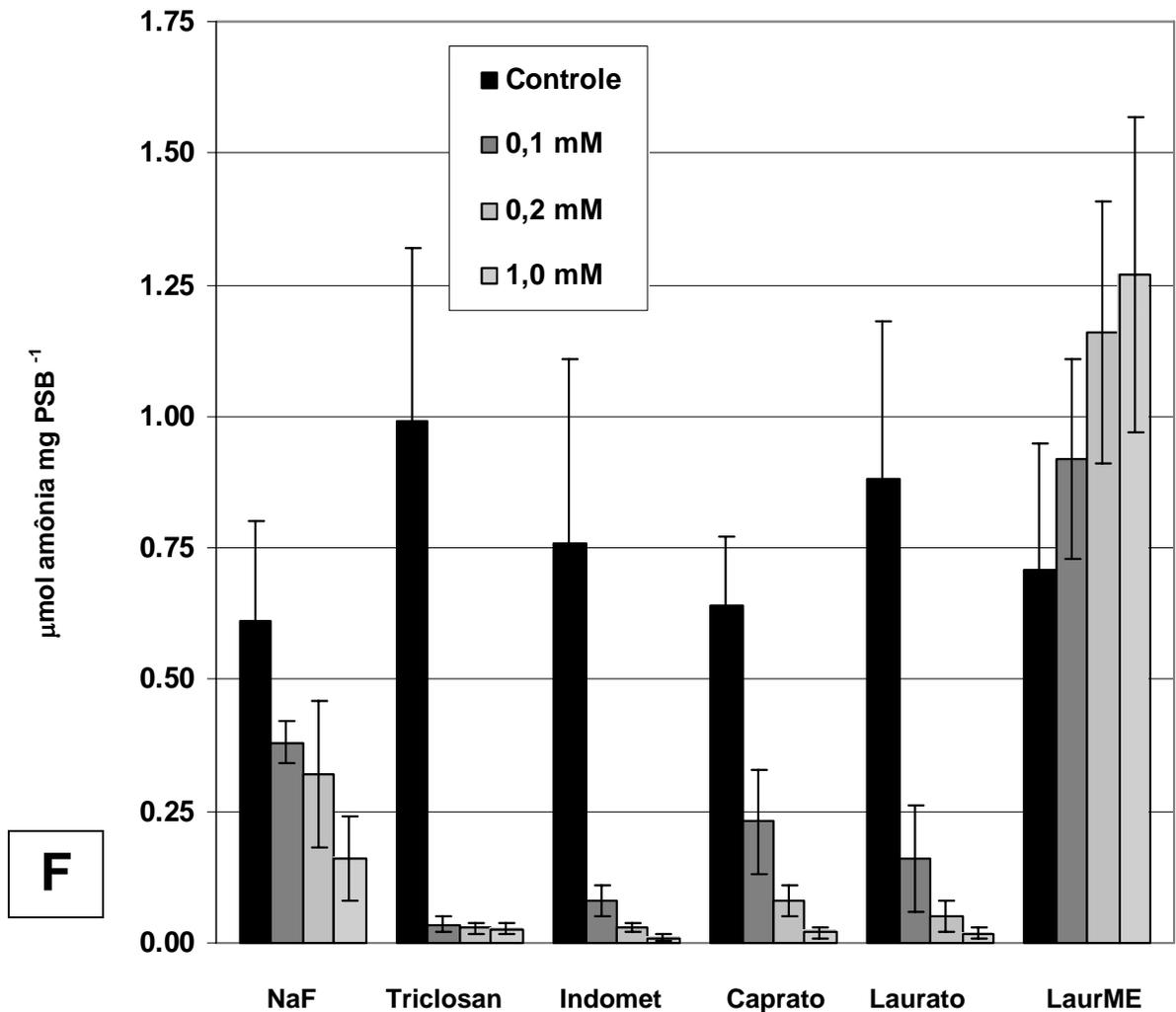




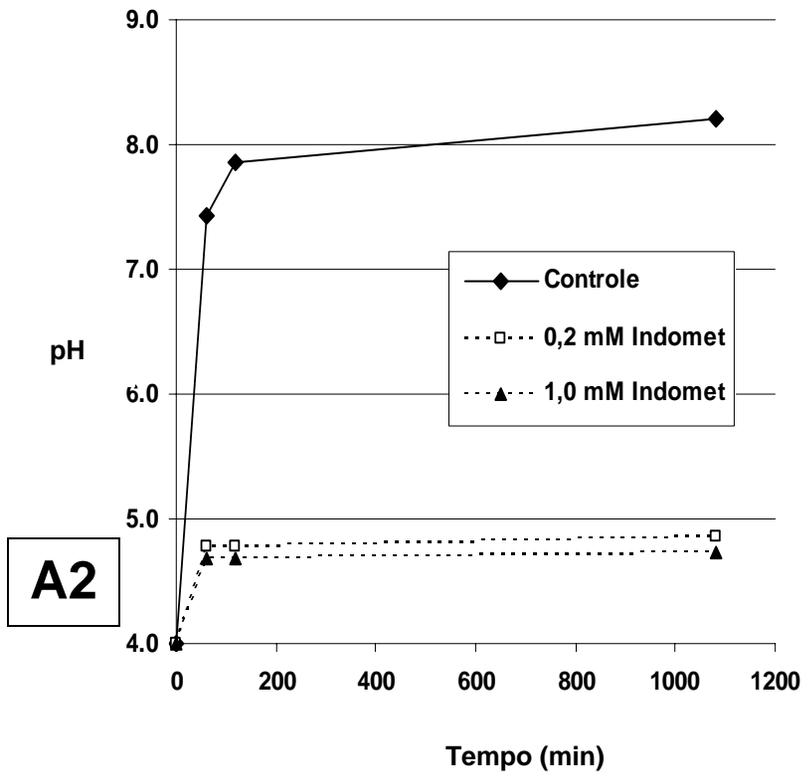
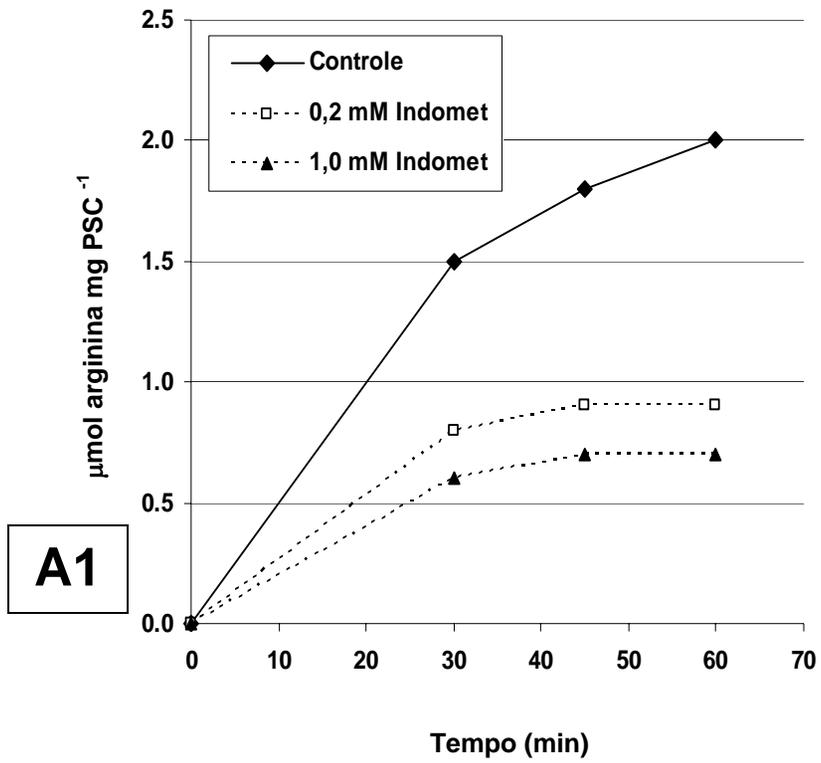


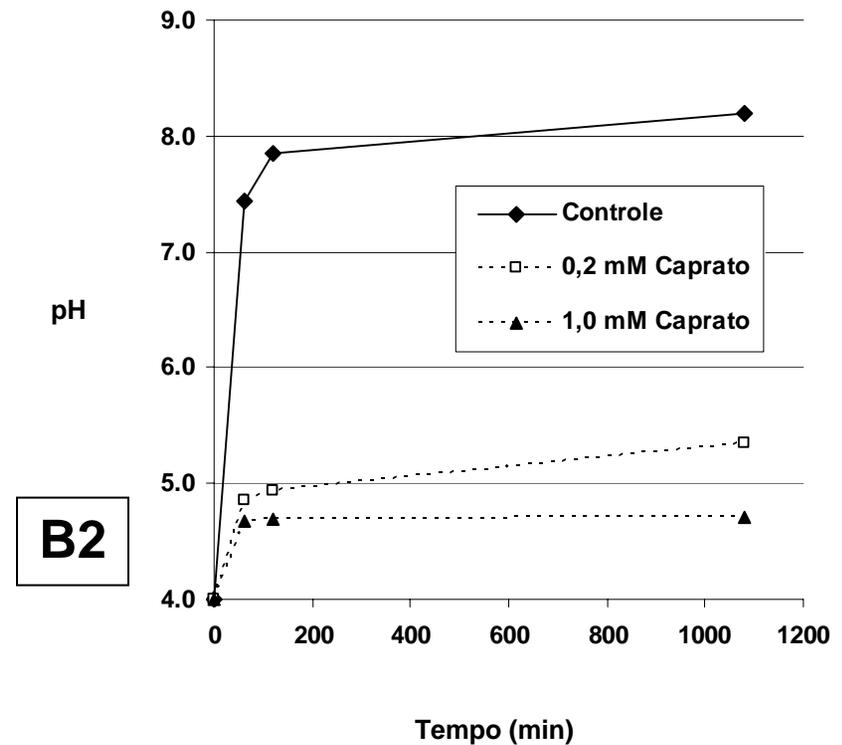
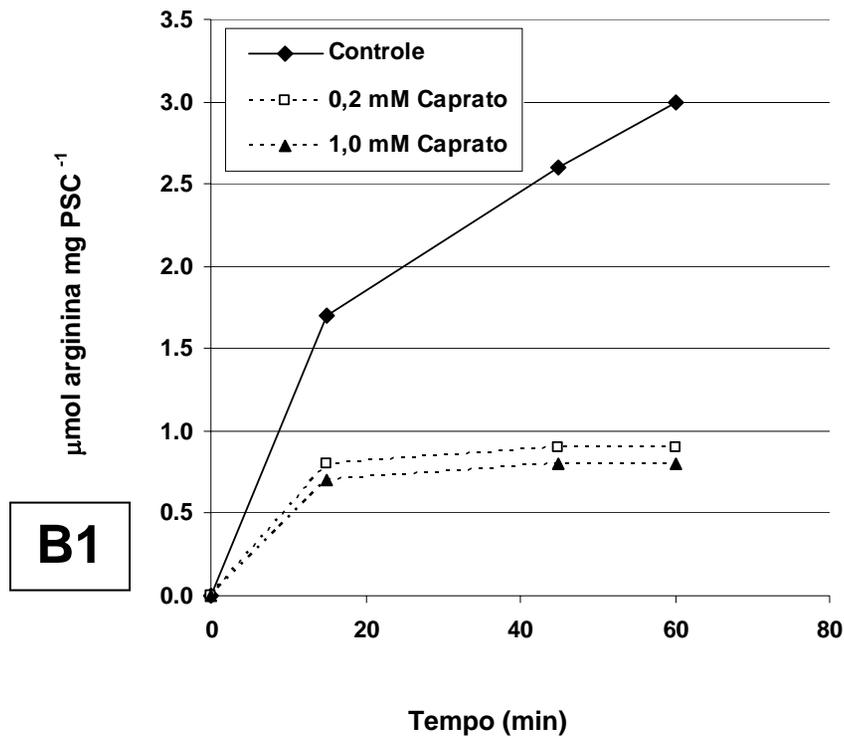




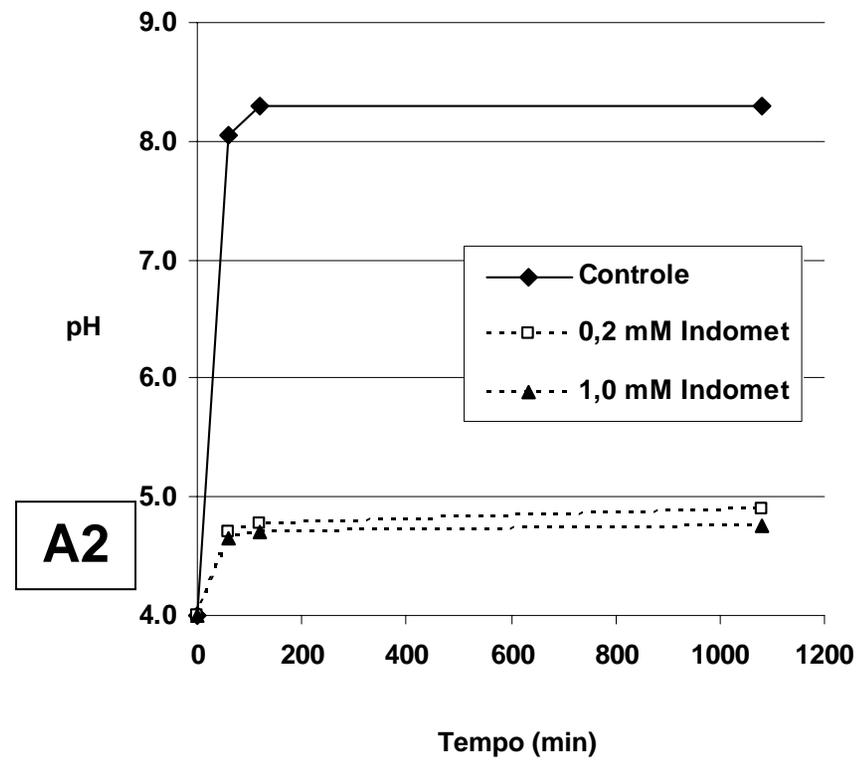
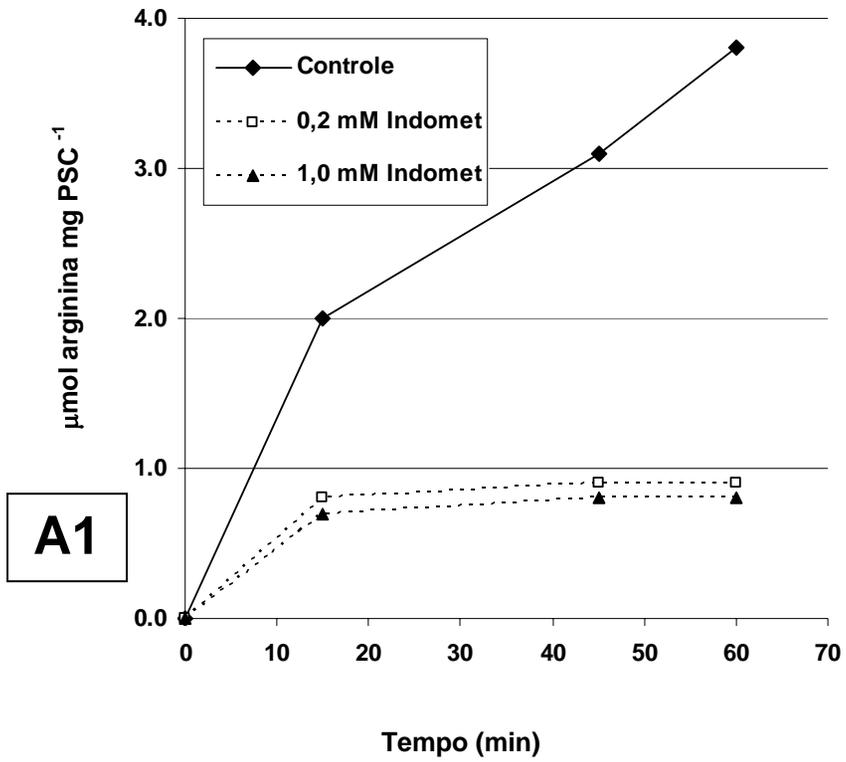


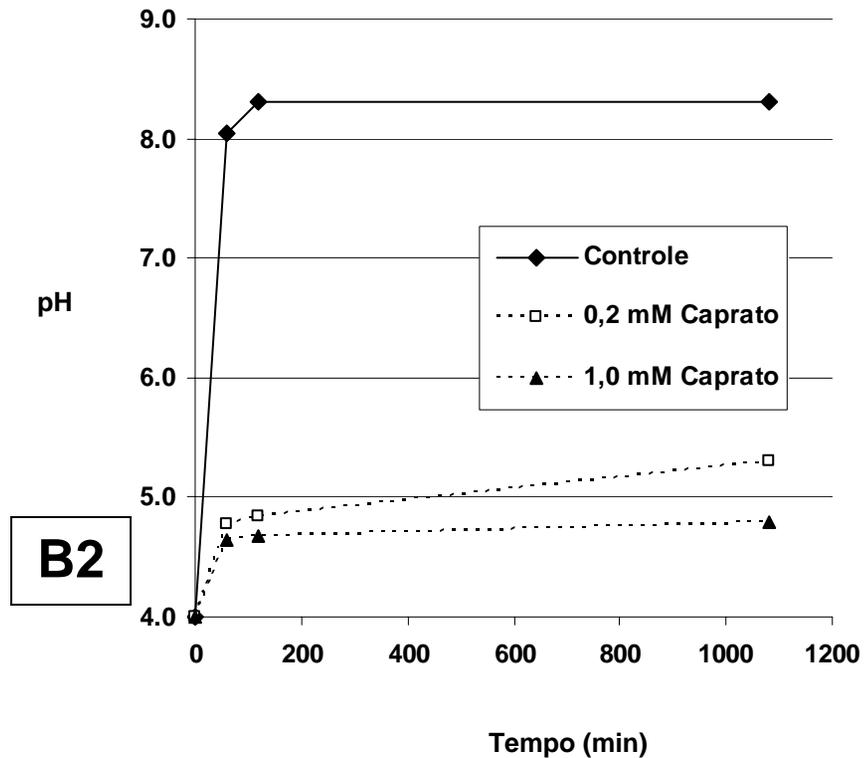
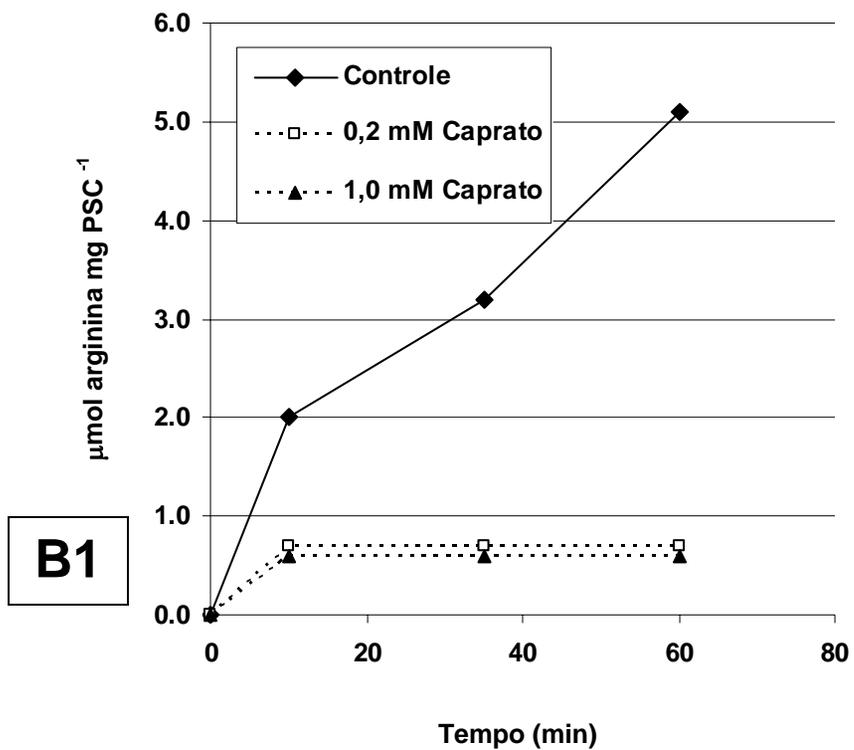
**Fig. 8.** Ação dos diferentes antimicrobianos na produção de amônia através de arginina por células em suspensão intactas (A) ou biofilmes intactos (B) ou biofilmes dispersos (C) de *S. sanguis* e por células em suspensão intactas (D), biofilmes intactos (E) ou biofilmes dispersos (F) de *S. rattus* em pH 4,0 constante. NaF – fluoreto de sódio, Indomet – indometacina, LaurME – laurato metil éster, PSC – peso seco de células. Barras de erro indicam desvio padrão de pelo menos três experimentos.



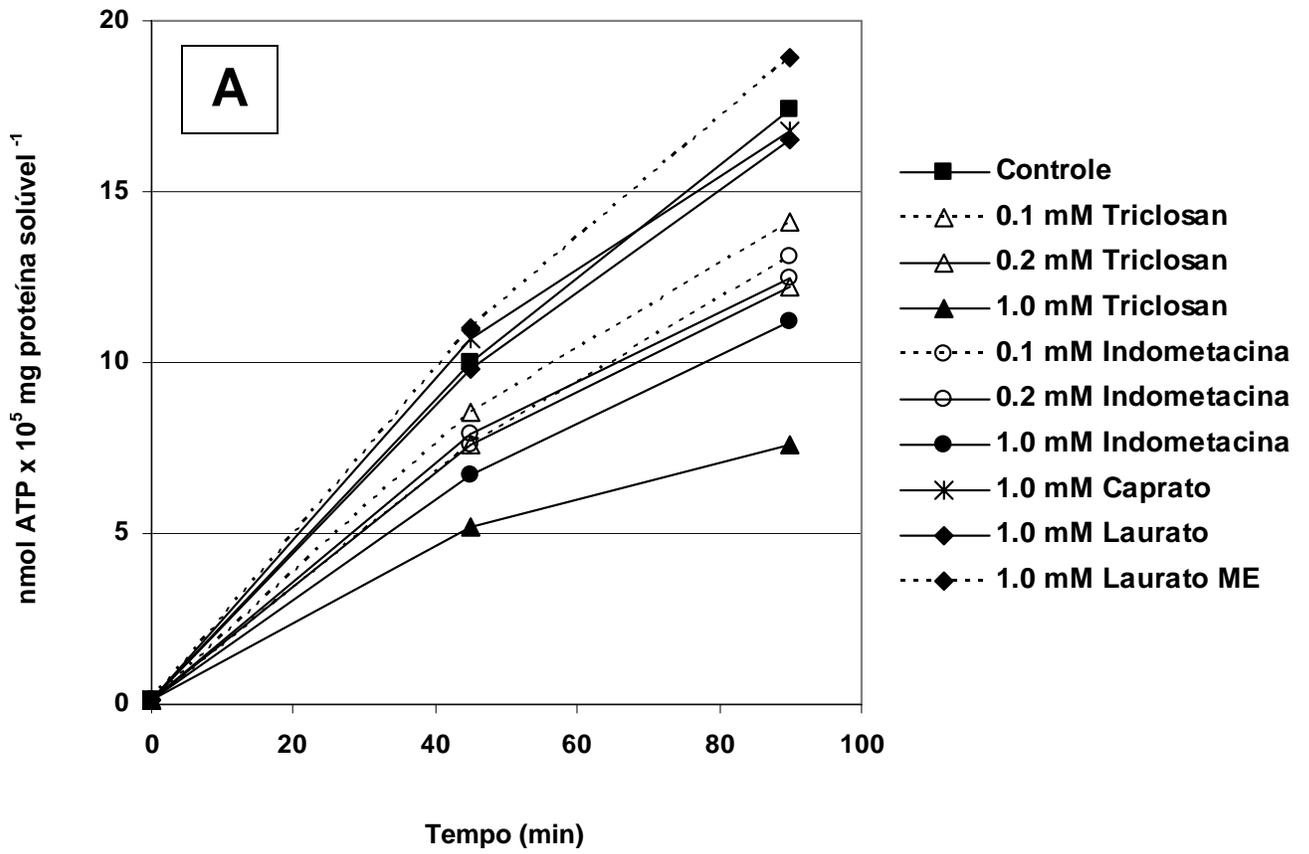


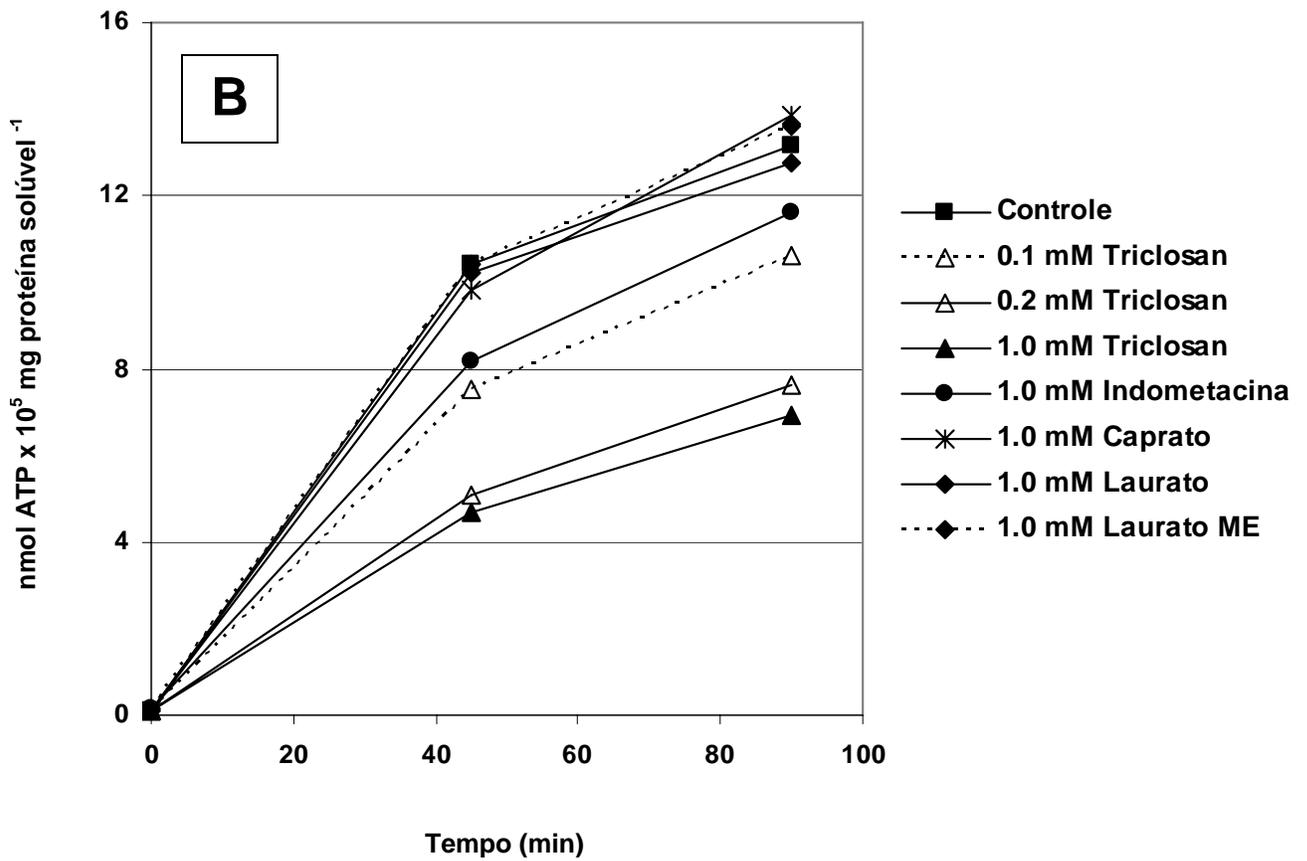
**Fig. 9.** Inibição da produção de amônia por células intactas em suspensão de *S. sanguis* em pH 4,0 constante por indometacina (A1) e caprato (B1) e irreversibilidade dos efeitos desses agentes nos experimentos seguintes de elevação de pH (A2 e B2). Indomet – indometacina.



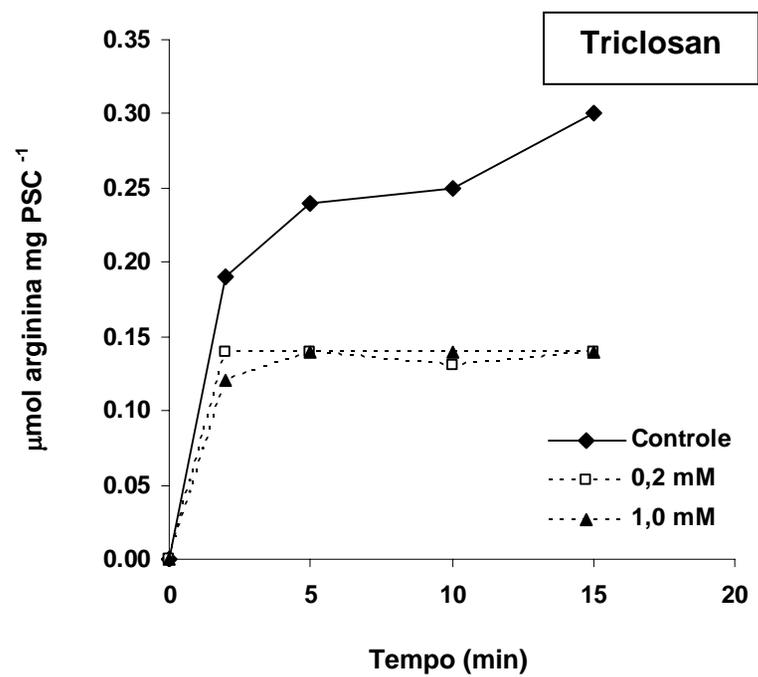
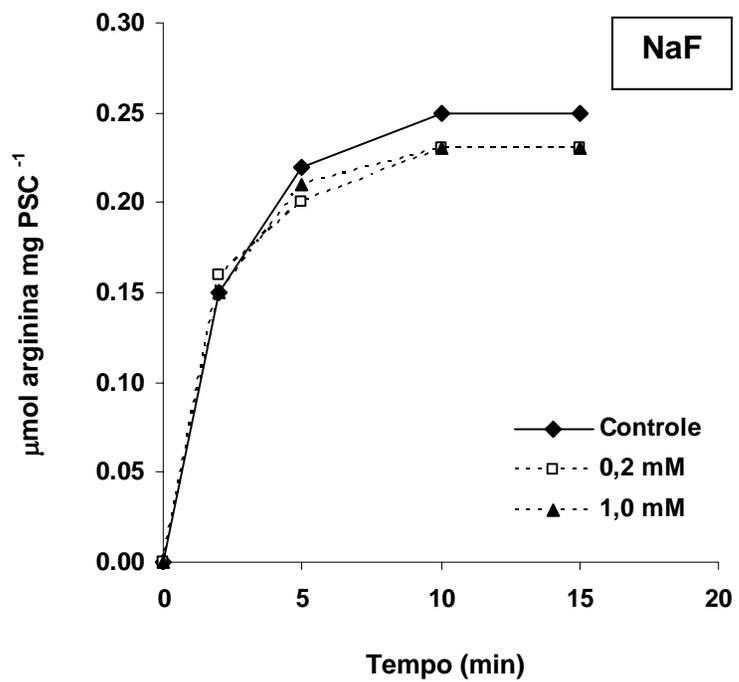


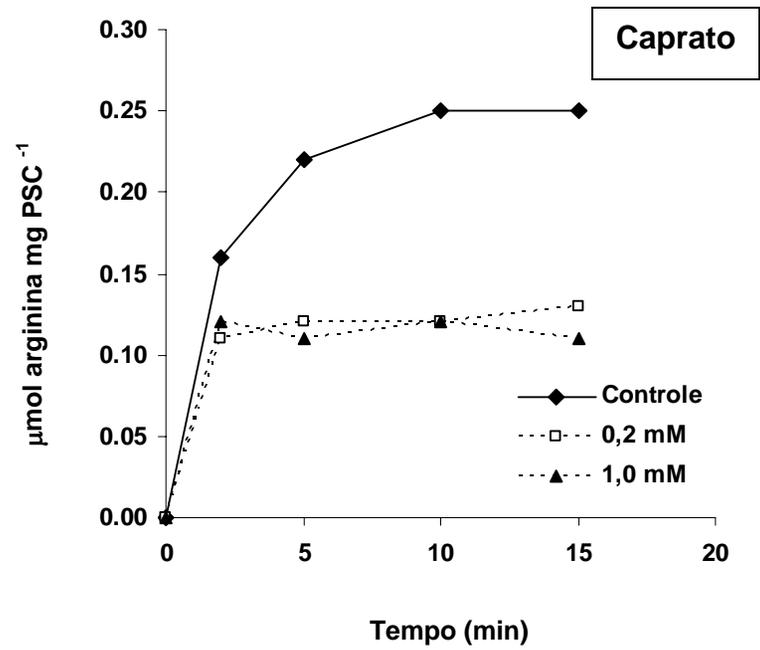
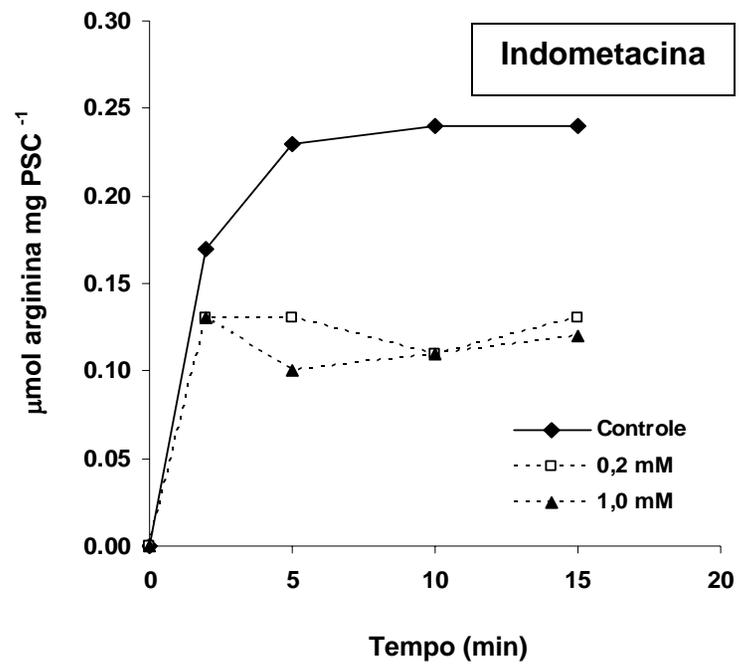
**Fig. 10.** Inibição da produção de amônia por células intactas em suspensão de *S. rattus* em pH 4,0 constante por indometacina (A1) e caprato (B1) e irreversibilidade dos efeitos desses agentes nos experimentos seguintes de elevação de pH (A2 e B2). Indomet – indometacina.

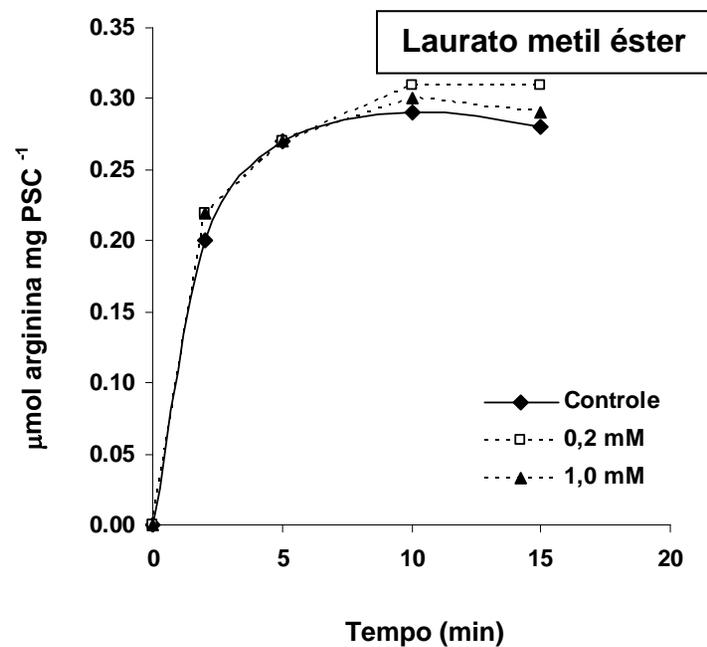
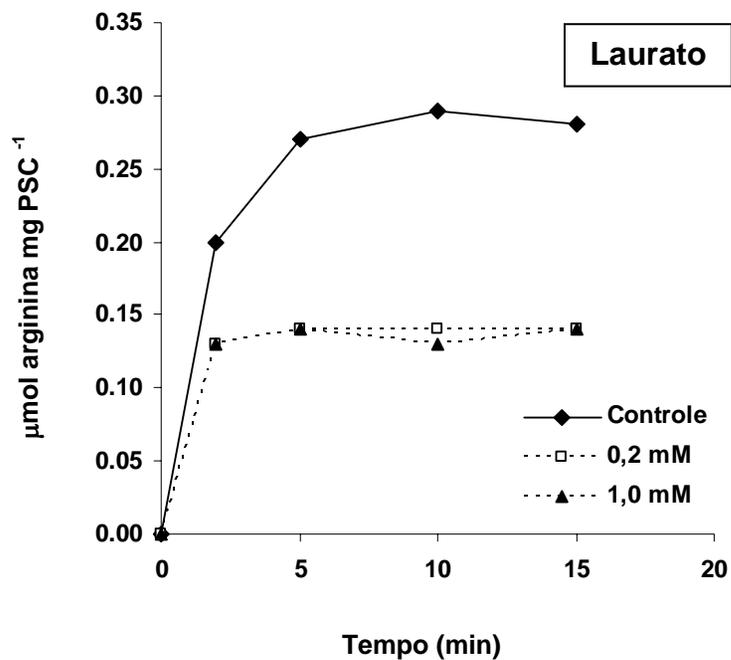




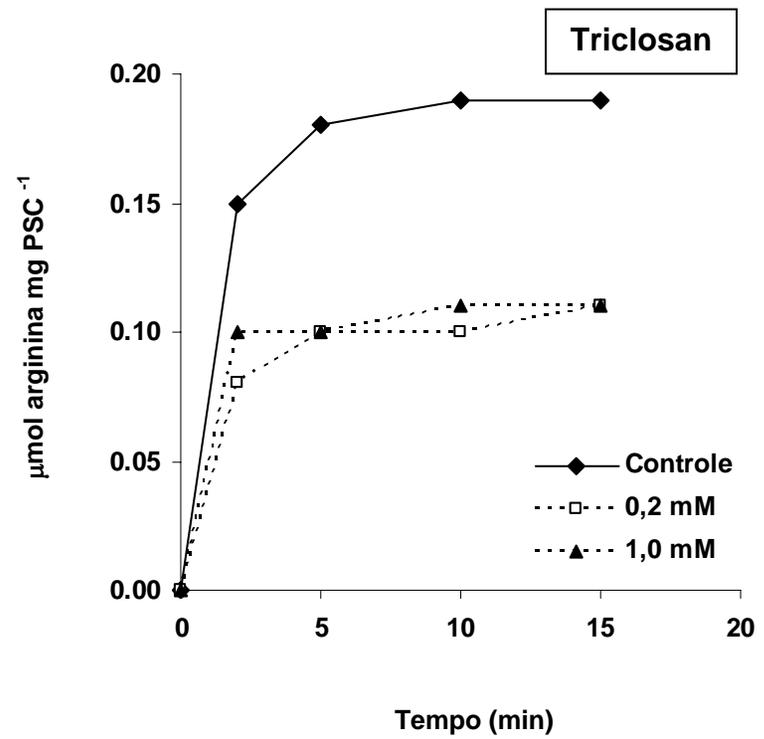
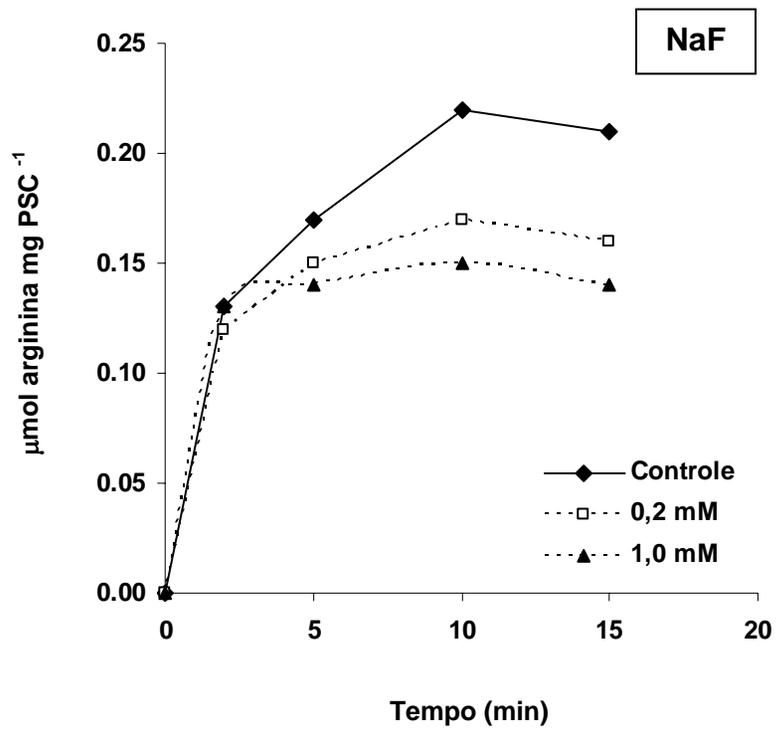
**Fig. 11.** Inibição por triclosan e por ácidos orgânicos fracos de carbamato quinase em extratos celulares de *S. sanguis* (A) e de *S. rattus* (B) em pH 6,0. Laurato ME – laurato metil éster. Valores representam a média de dois experimentos.

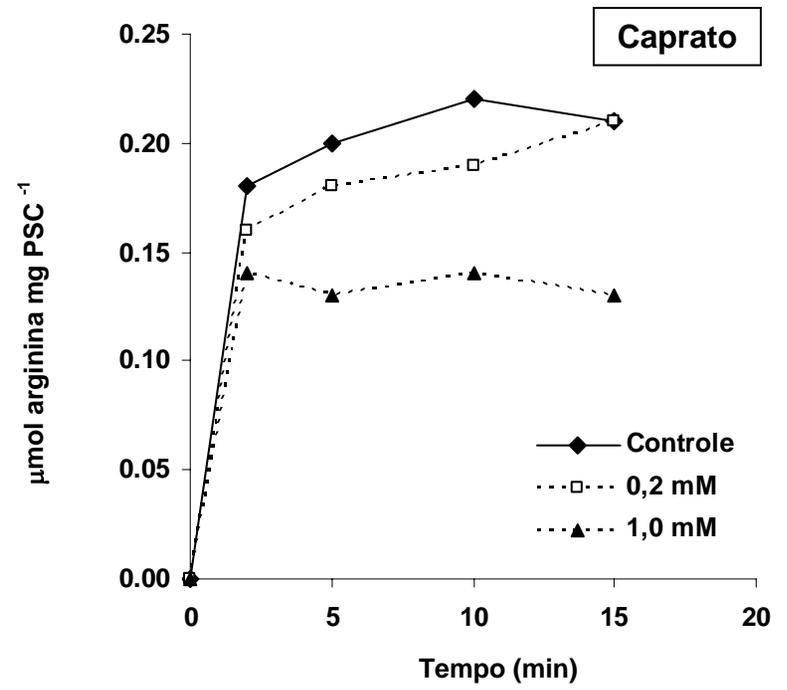
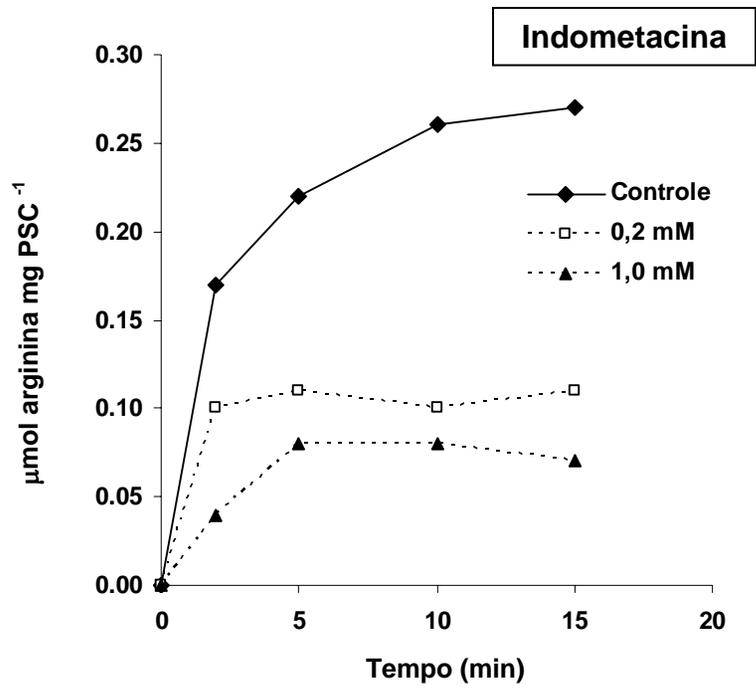


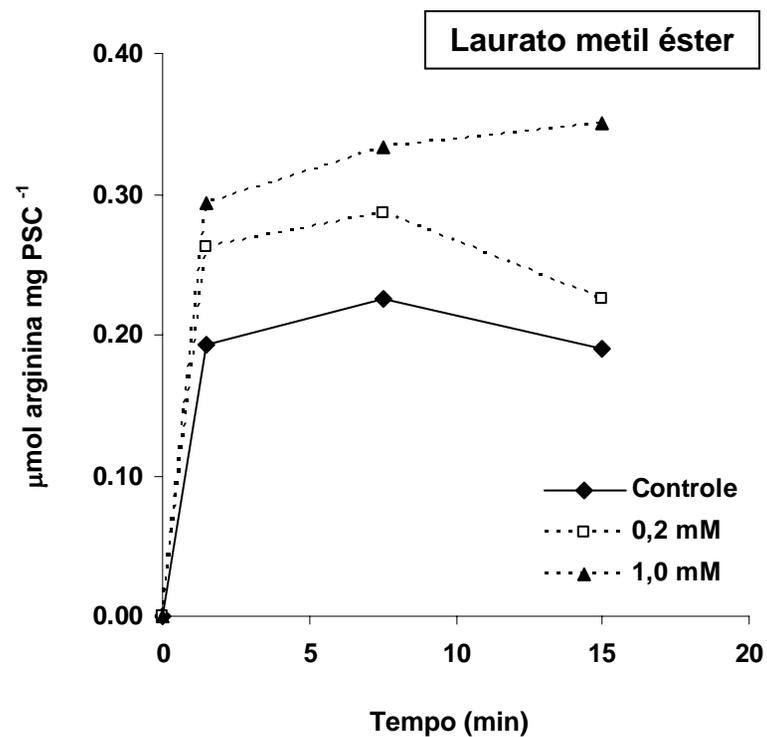
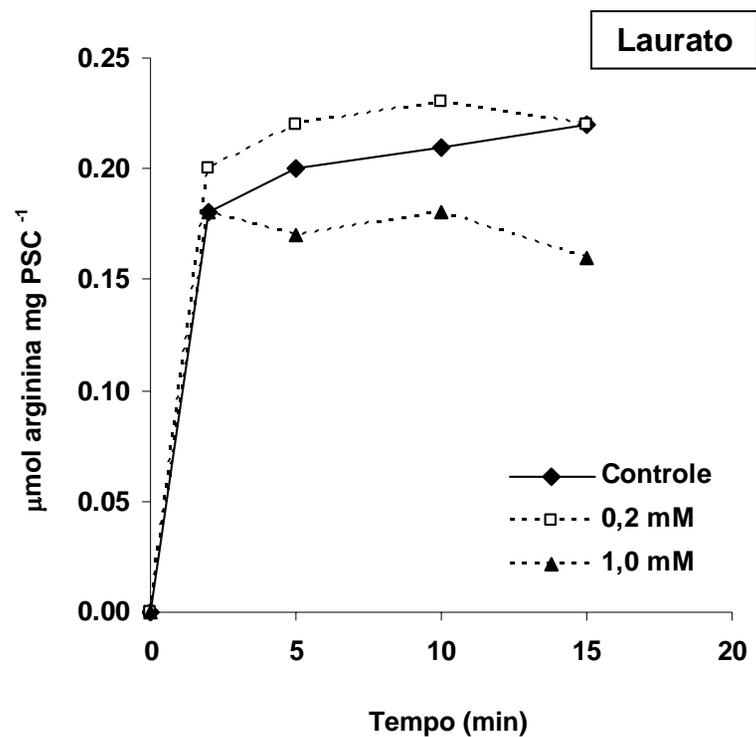




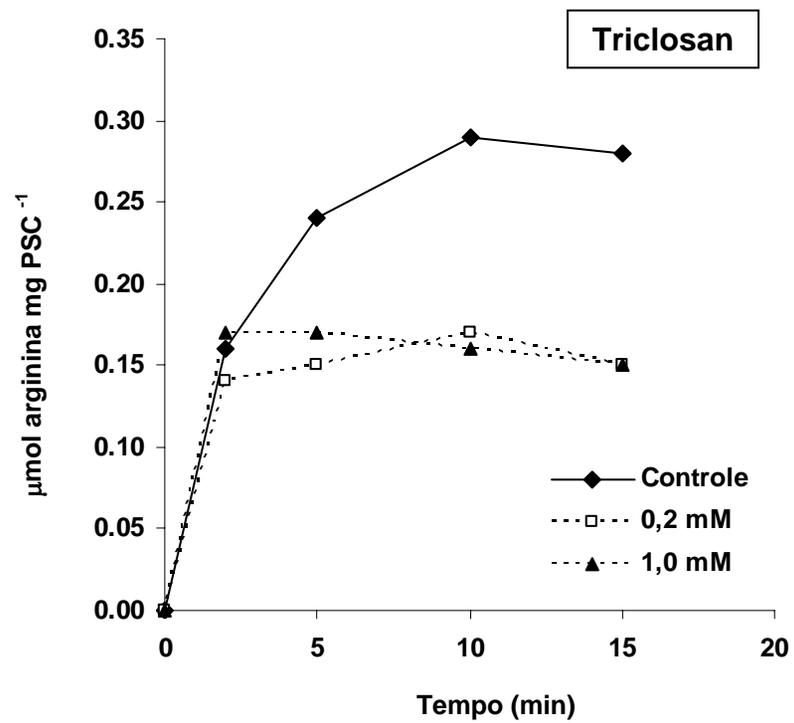
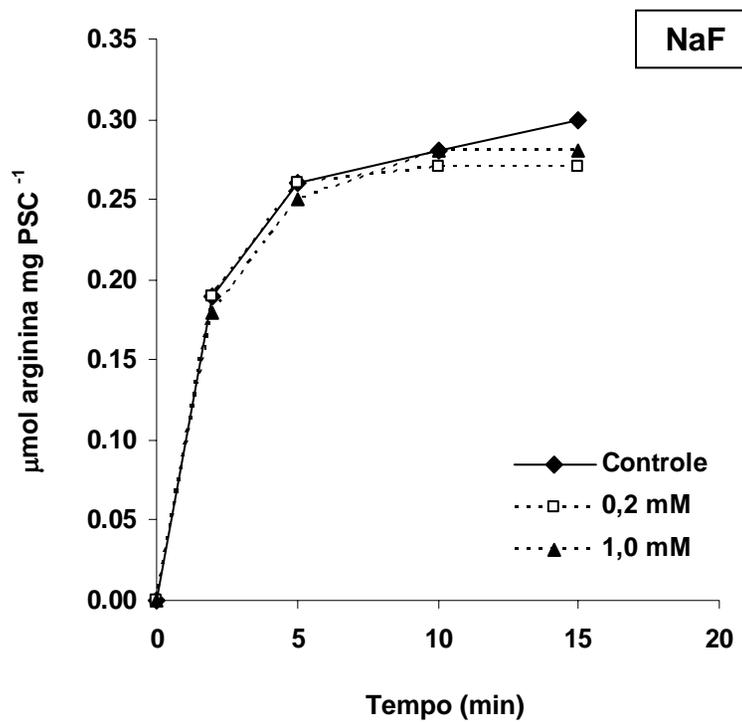
**Fig. 12.** Ação de diferentes agentes na captação de arginina por células intactas em suspensão de *S. rattus* em pH 4,0. NaF – fluoreto de sódio. Valores representam a média de três experimentos.

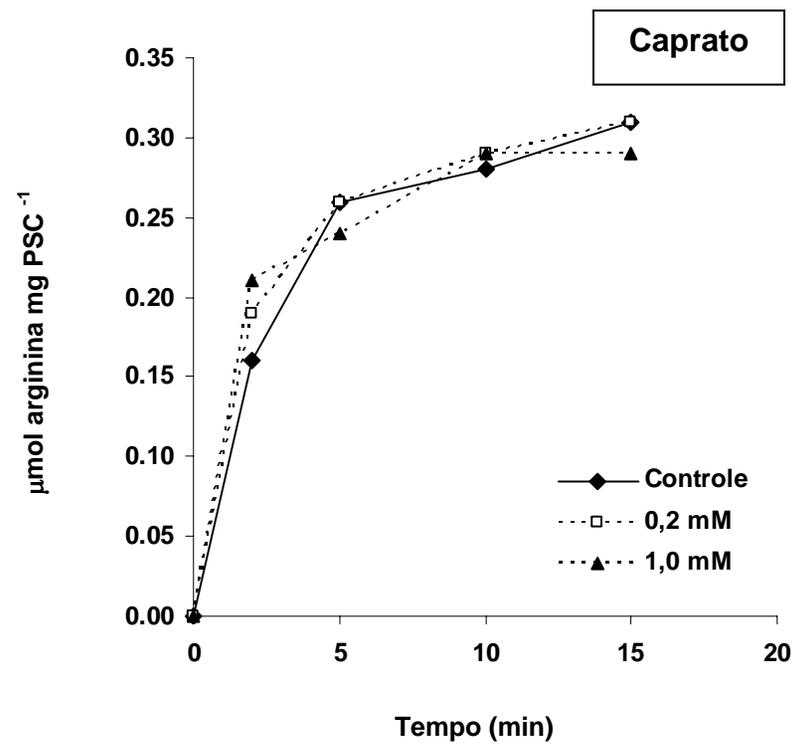
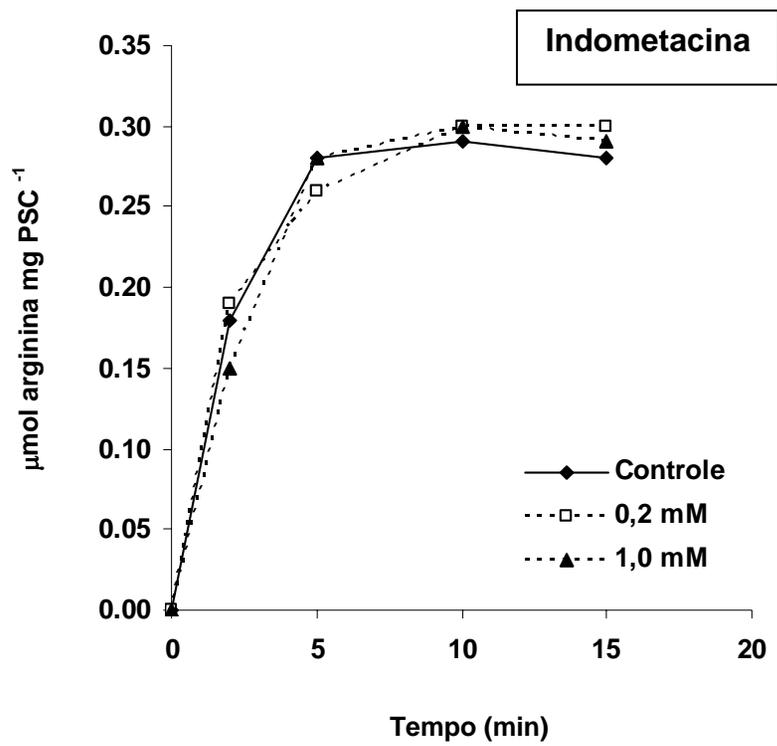


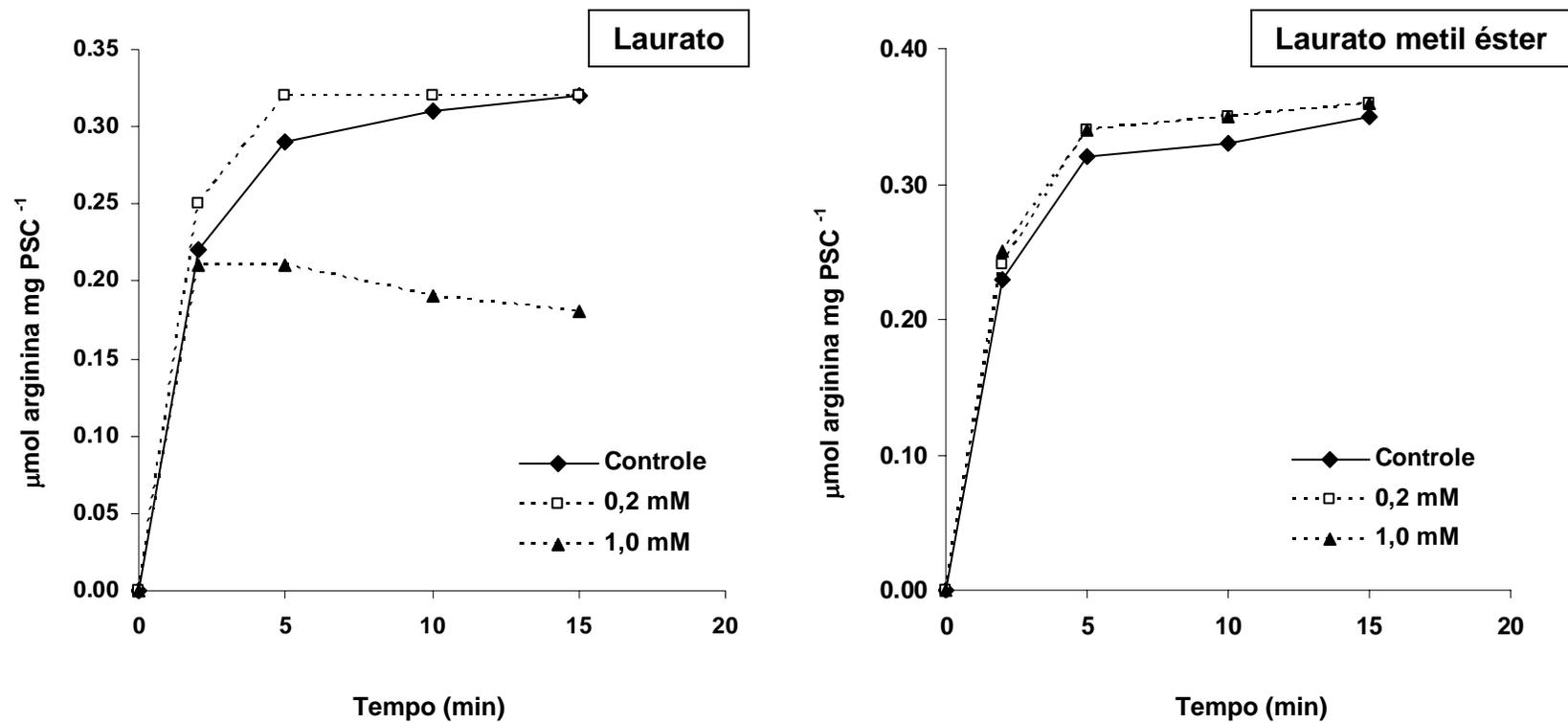




**Fig. 13.** Ação de diferentes agentes na captação de arginina por células intactas em suspensão de *S. sanguis* em pH 4,0. NaF – fluoreto de sódio. Valores representam a média de três experimentos.

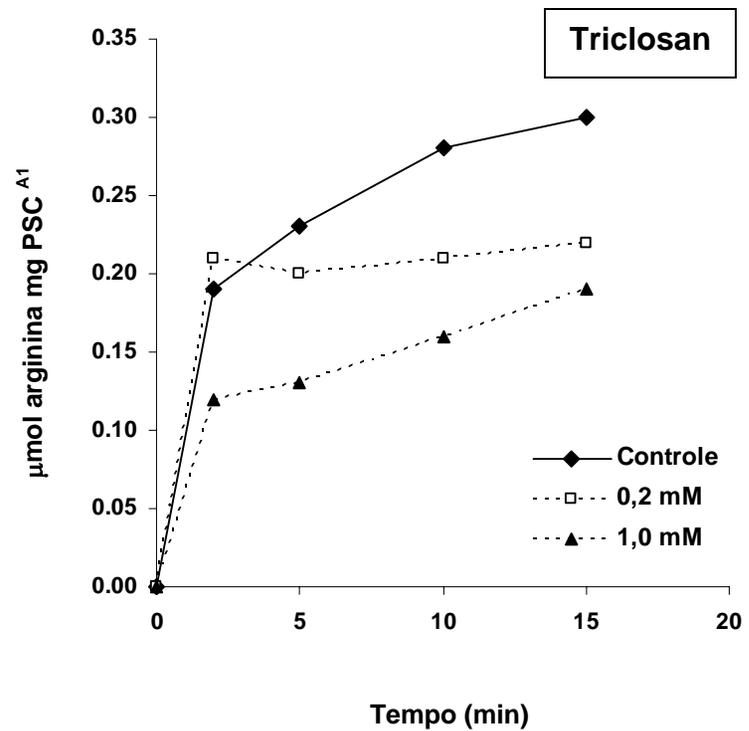
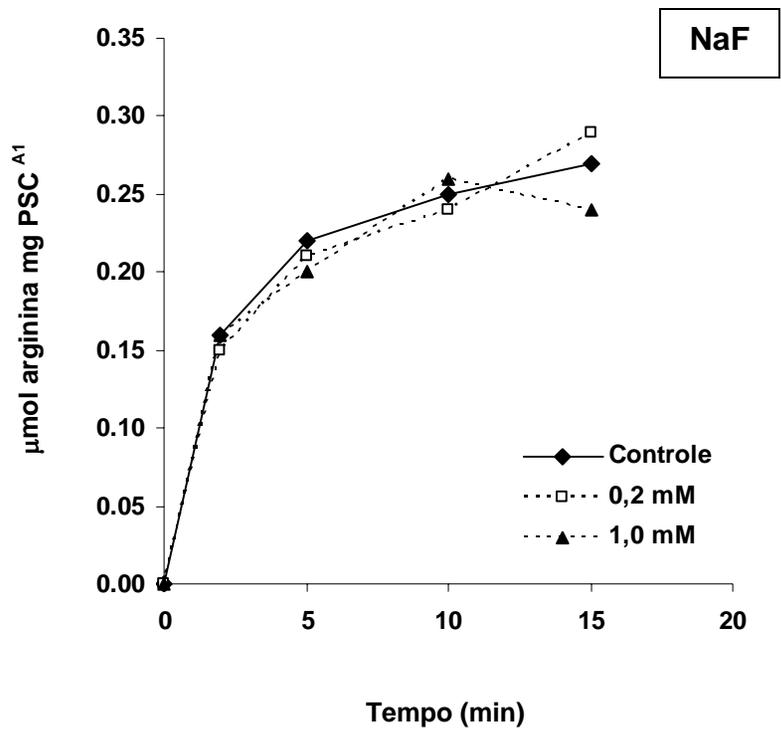


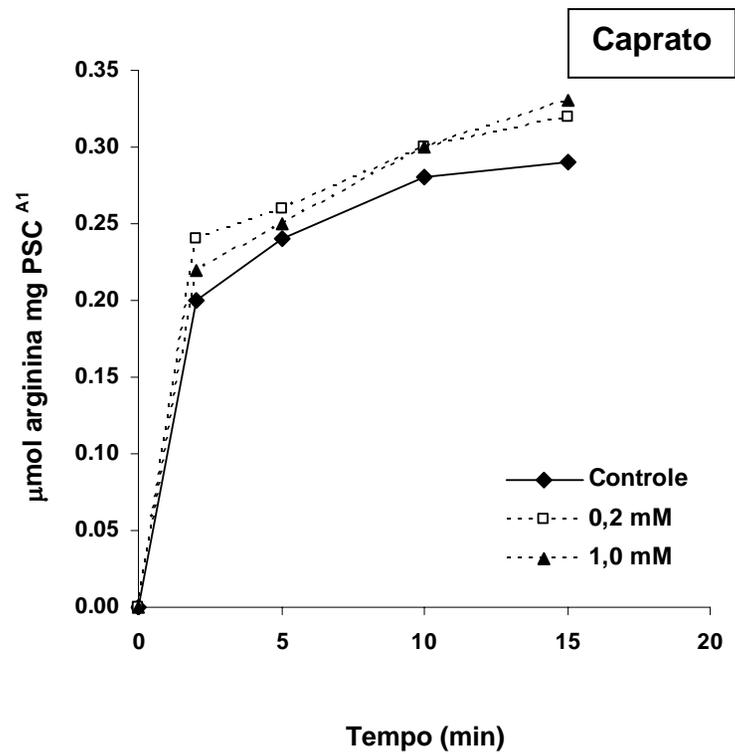
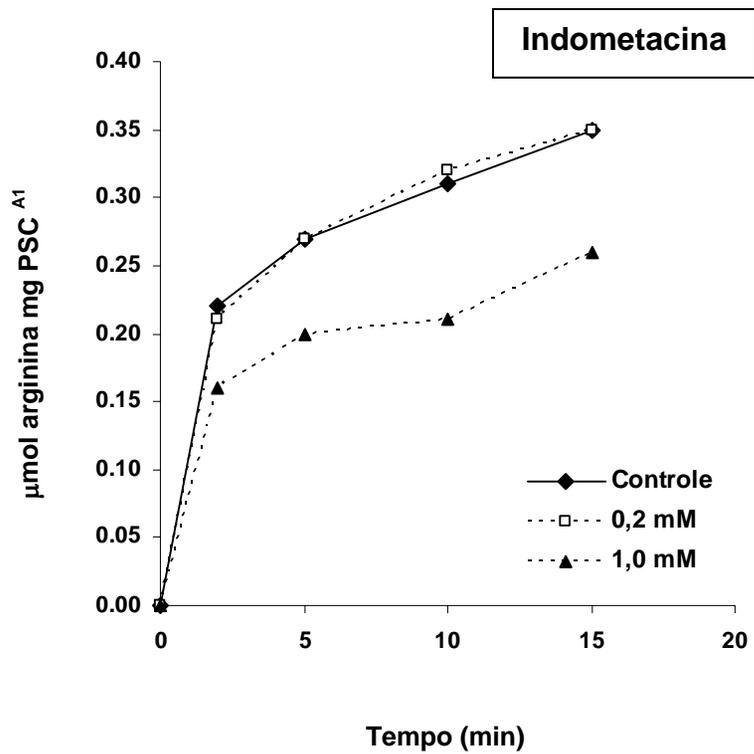


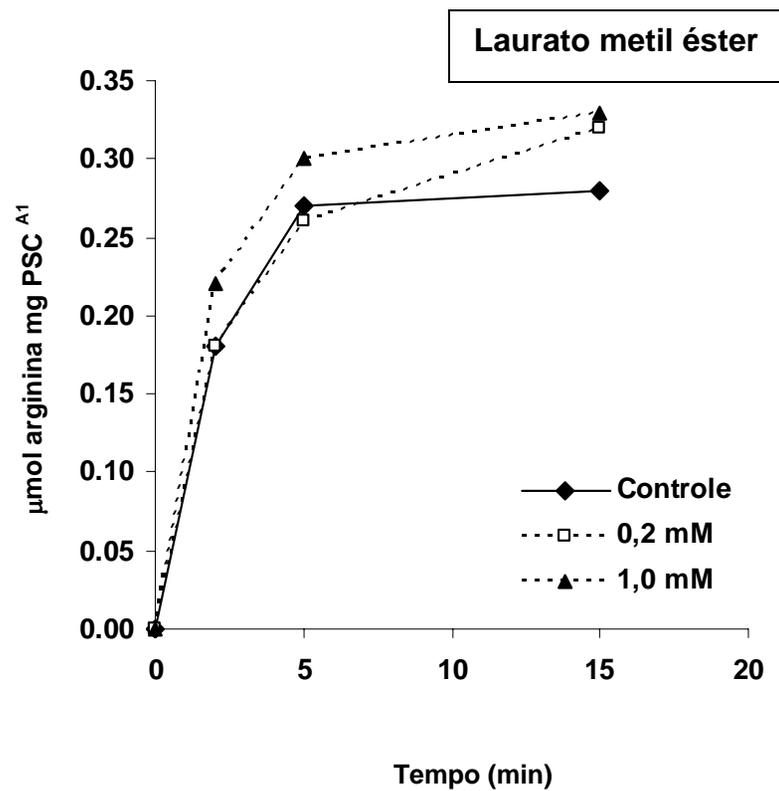
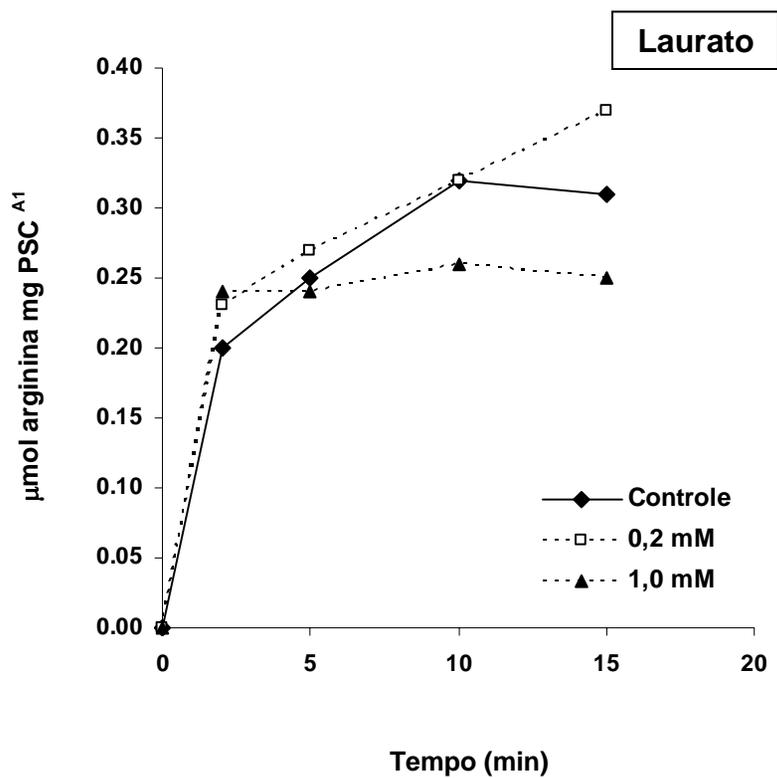


**Fig. 14.** Ação de diferentes agentes na captação de arginina por células intactas em suspensão de *S. rattus* em pH 6,0.

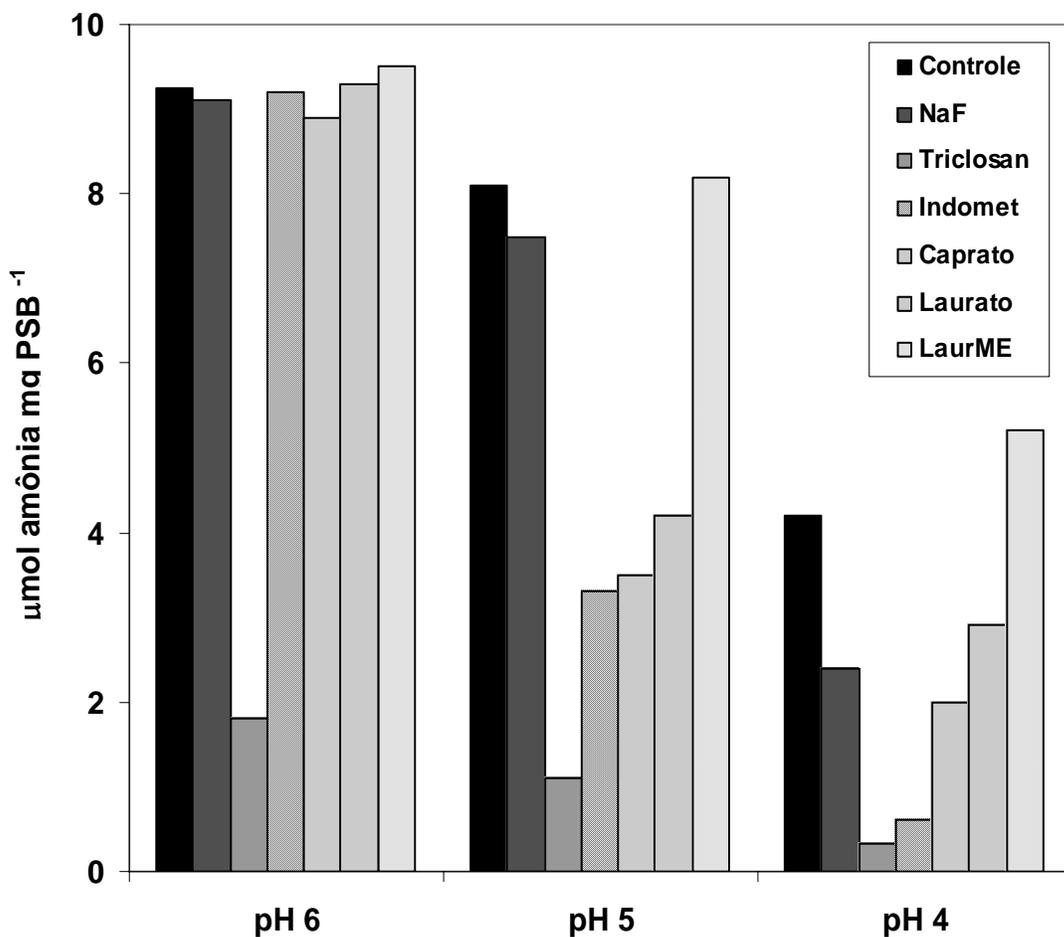
NaF – fluoreto de sódio. Valores representam a média de três experimentos.







**Fig. 15.** Ação de diferentes agentes na captação de arginina por células intactas em suspensão de *S. sanguis* em pH 6,0. NaF – fluoreto de sódio. Valores representam a média de três experimentos.



**Fig. 16.** Efeitos do pH, fluoreto, triclosan e ácidos orgânicos fracos, na concentração de 1,0 mM, na produção de amônia através de 1% arginina por biofilme bacteriano supragengival humano. NaF – fluoreto de sódio, Indomet – indometacina, LaurME – laurato metil éster. Média de dois experimentos.

## DISCUSSÃO

### 1. UREÓLISE:

Pela extensiva exposição dos indivíduos ao fluoreto na água e em uma grande variedade de outros produtos, especialmente, de higiene oral, a microbiota anfibiônica do corpo humano pode estar sendo exposta, comumente, a níveis de fluoreto que podem ser antibacterianos. Mais uma vez, um dos mecanismos propostos pelo qual o fluoreto age na redução de cáries é baseado nas suas ações antimicrobianas, reduzindo a ácido-tolerância e produção de ácido pelas bactérias na boca.

Níveis normais de fluoreto no biofilme dental são entre 0,1 e 0,5  $\mu\text{mol/g}$  de peso úmido de biofilme ou ao redor de 100 vezes o nível salivar (DUCKWORTH, MORGAN, & MURRAY, 1987; VOGEL *et al.*, 2000). Esses níveis são correspondentes a 0,1-0,5 mM, uma vez que biofilmes são constituídos principalmente por água, tanto no citoplasma bacteriano quanto na matriz extracelular de polímeros.

O fluoreto é disponível para uso humano ligado a outros componentes químicos, como, por exemplo, na forma de fluoreto de sódio (NaF), mas, em ambientes ácidos, este se dissocia e fica livre para formar HF, que permeia rapidamente as células. Sendo assim, acredita-se que há fluoreto suficiente para ações antimicrobianas na placa bacteriana oral.

Dessa forma, na cavidade oral, espera-se que os efeitos de fluoreto e ácidos orgânicos fracos em bactérias na saliva sejam pouco significativos,

uma vez que o pH é praticamente neutro e a concentração desses agentes é baixa. Há também uma forte interação entre a uréia da saliva e o fluido crevicular com bactérias ureolíticas como *S. salivarius*, fazendo com que a uréia seja rapidamente degradada. Porém, no biofilme dental bacteriano, a ureólise pode ser afetada pela acidificação a valores de pH tão baixos quanto 4,0 e pela concentração de ácidos fracos por esses biofilmes, chegando a 100 vezes mais que o nível salivar, pelo menos para o fluoreto.

Salako & Kleinberg (1989) associaram o suprimento direto de uréia da saliva ao biofilme dental próximo aos ductos das glândulas salivares e observaram que estas áreas dentais são as mais susceptíveis ao acúmulo de cálculo e seleção de bactérias ureolíticas, incluindo estafilococos Gram-positivos, como *S. epidermidis* presentes em grande quantidade no biofilme dental humano (do SOUTO, 2007) e *A. naeslundii*, assim como bactérias Gram-negativas, como *H. parainfluenzae*.

A relação entre a ureólise e a microbiota da língua é menos definida, mas pela diversidade microbiana no dorso da língua, espera-se que a acidificação e os ácidos fracos tenham efeitos significativos em bactérias urease-positivas, como *S. salivarius*.

As células de *S. epidermidis*, *S. salivarius* e *A. naeslundii*, tanto em suspensões quanto em biofilmes, se mostraram bastante ativas para o catabolismo da uréia. Acredita-se que, para a enzima urease, as condições de crescimento e a disponibilidade de nutrientes são condições essenciais que regulam a expressão do gene dessa enzima (BURNE & CHEN, 2000).

A expressão da enzima urease de *A. naeslundii* é regulada pela disponibilidade de nitrogênio no meio (MOROU-BERMÚDEZ & BURNE,

2000). Em ambientes com excesso de açúcares fermentáveis e alto risco de desenvolvimento de cárie, o biofilme bacteriano pode passar por período de limitação de nitrogênio e a expressão da urease pode ser induzida. Além disso, o catabolismo de uréia por *A. naeslundii* age, principalmente, como fonte de nitrogênio para o crescimento e para a proteção desse organismo contra a acidificação do ambiente (MOROU-BERMÚDEZ & BURNE, 1999).

A urease possui as mesmas funções em *S. salivarius*, que tem a expressão de sua enzima induzida em ambientes com valores de pH baixos (SISSONS *et al*, 1990; CHEN & BURNE, 1996), também conferindo a esse microrganismo proteção contra ácidos e fonte de nitrogênio (CHEN, WEAVER & BURNE, 2000; YALING *et al.*, 2006).

Observa-se, portanto, que esta enzima tem uma grande importância no metabolismo das bactérias orais, especialmente naquelas menos cariogênicas e menos ácido-resistentes. A urease pode aumentar a sobrevivência dessas bactérias no biofilme dental e criar uma competição mais acirrada por colonização com as bactérias cariogênicas, ácido-resistentes, podendo favorecer a diminuição da colonização do biofilme por essas últimas bactérias, diminuindo-se também o risco de desenvolvimento de cárie.

A atividade da urease de *A. naeslundii* é altamente dependente do pH do ambiente. Esta enzima possui um valor de pH ótimo para a hidrólise de uréia por células intactas em suspensão em torno de 6,0 (MOROU-BERMÚDEZ, 1999), havendo a diminuição da sua atividade à medida que o pH do ambiente cai para 4,0 e, em pH 3,0, nenhuma atividade é detectada.

Previamente e à semelhança da urease de *A. naeslundii*, Sissons & Hancock (1993) mostraram a curva de atividade da enzima urease de *S. salivarius* em função do pH do ambiente. Esta enzima, em células intactas em suspensão e em extratos celulares, teve uma ampla faixa de atividade (mais de 90%) entre os valores de pH 5,5 - 7,5, com o valor ótimo entre 6,5 - 7,0. Em pH menor que 5,5, a atividade caiu dramaticamente, não havendo atividade da enzima em pH 4,3 para os extratos e, em pH 3,4, houve ainda uma atividade residual de 3,6% em células intactas em suspensão. Esse valor residual provavelmente foi devido à habilidade dessas células em manter o  $\Delta$ pH através da membrana celular, com o citoplasma mais alcalino que o meio externo. Porém, quando a curva de atividade da urease foi observada nos valores de pH básicos, quase nenhuma atividade foi detectada em pH 9,3 para os extratos celulares e, para as células intactas, esse pH permitiu apenas a atividade enzimática de 20%.

Ureólise por células intactas em suspensão de *S. salivarius* e de *A. naeslundii* foi mais sensível à acidificação do que por células de *S. epidermidis*. Esta diferença pode ser devido à grande capacidade ureolítica de células de *S. epidermidis*, que impossibilitaria a acidificação do citoplasma em meios com pH baixo e conseqüentemente diminuiria a inibição ácida da urease.

Sabe-se que os níveis da enzima urease, por exemplo em *S. salivarius*, varia muito dependendo das condições de crescimento do microrganismo (SISSONS *et al.*, 1990), mas as diferenças aqui apresentadas para as três bactérias urease-positivas são consideradas para cultivos em

condições similares, apesar dessa enzima ser altamente conservada entre os microrganismos na natureza (MOBLEY, ISLAND & HAUSINGER, 1995).

Modelos de biofilme são muito úteis para o estudo da biologia bacteriana em ambientes com alta densidade populacional como acontece, similarmente, no biofilme dental.

Apesar da dificuldade em mimetizar a diversidade da população do biofilme bacteriano natural, os biofilmes “in vitro”, ainda assim, permitem estudos de organismos cultivados em uma superfície, em condições de densa população e limitada difusão.

Para os estudos descritos nesta tese, os biofilmes de um único organismo foram cultivados sobre lâminas de vidro e nutridos diariamente até a completa maturidade. Futuros estudos poderão também incluir biofilmes de múltiplos organismos crescidos sobre discos de hidroxiapatita em culturas contínuas. Porém, o sistema usado nesta tese envolveu crescimento bacteriano em superfície hidrofílica, de vidro, e num padrão de alimentação microbiana que é semelhante ao que ocorre na boca com adição periódica de nutrientes.

Ureólise por unidade de peso seco de biofilmes de *S. epidermidis* em pH constante 5,0 ou 4,0 foi mais lenta do que por células intactas em suspensão desta mesma bactéria. Parte da diferença pode ser devido aos biofilmes serem mais ricos em carboidratos que as células em suspensão, que são mais ricas em proteína, como mensurados pelo método de Lowry *et al.* (1951) por unidade de biomassa.

Essa diferença de valores pode ser devido também à difusão de uréia limitada para dentro dos biofilmes (STEWART, 2003), mas este efeito parece

ser pequeno para ureólise por biofilmes pois a uréia é uma molécula pequena e apresenta facilidade de difusão.

Outro fator para a menor taxa de produção de amônia em biofilmes pode ser a própria alcalinização. Quando altos níveis de amônia são produzidos dentro dos filmes das comunidades bacterianas, o pH do ambiente interno do biofilme se eleva e essa alcalinização poderia inibir a atividade da enzima urease dentro das células. Mas a amônia é uma molécula pequena também e a sua difusão rápida para fora dos biofilmes não é considerada um grande problema.

Na verdade, as taxas de metabolismo dos biofilmes por célula ou por unidade de biomassa são geralmente baixas em comparação às taxas em células cultivadas em suspensão.

O resultado de que biofilmes dispersos de *S. salivarius* não tiveram a capacidade ureolítica aumentada sugere que a difusão de uréia para dentro dos biofilmes intactos pode não ser fator limitante da ureólise. Ainda, comparando-se a ureólise de biofilmes dispersos de *S. salivarius* em pH 5,0 e 6,0, observa-se a atividade menor em pH 5,0, provavelmente porque as células dispersas do biofilme ficaram mais expostas ao pH ácido e assim mais sensíveis à acidificação.

Apesar dos possíveis efeitos benéficos da produção de amônia em relação à cárie dental, um agente comprovadamente eficiente também no controle da doença cárie, como o fluoreto, mostrou-se como um grande inibidor da síntese de álcalis orais.

Acredita-se que um importante mecanismo de inibição, pelo fluoreto, da produção de amônia por microrganismos urease-positivos seja por

inibição direta da enzima urease, como revisado por Maquis, Clock & Mota-Meira (2002) ou por acidificação do citoplasma celular e inibição ácida da urease (MARQUIS, 1995).

Outras enzimas que também sofrem a ação direta de fluoreto incluem a enolase da via glicolítica, fosfatases, peroxidases e catalase. A acidificação do citoplasma causada pelo fluoreto também pode inibir a glicólise (MARQUIS, 1990) e a enzima NADH oxidase (PHAN *et al*, 2002) citoplasmática de estreptococos orais.

A concentração de fluoreto no biofilme pode se tornar mais alta quando são utilizados dentifrícios ou outros produtos contendo fluoreto. Este tende a ser retido em altas concentrações no biofilme dental por períodos longos após a exposição a esse agente, provavelmente porque as bactérias do biofilme mantêm pelo menos algum  $\Delta\text{pH}$  através da membrana celular, com o citoplasma mais alcalino que o meio externo. Este  $\Delta\text{pH}$  age favorecendo a captação e a retenção de fluoreto pelas células (MARQUIS, CLOCK, & MOTA-MEIRA, 2002). O fluoreto também age diminuindo o  $\Delta\text{pH}$ , mas não a ponto de descarregar completamente a força próton-motora através da membrana celular bacteriana de células com metabolismo ativo.

Uma questão importante em relação aos efeitos do fluoreto na atividade da urease “in vivo” é se os níveis de fluoreto presentes no biofilme dental são realmente inibitórios. A resposta, baseada nos resultados aqui apresentados, é que o fluoreto seria altamente inibitório em meio com pH ácido, especialmente 4,0, que é próximo ao pH mínimo mensurado no biofilme “in vivo”.

Dos três microrganismos testados, células intactas em suspensão de *S. epidermidis* foram as mais resistentes à acidificação do meio e à inibição da atividade da urease pelo fluoreto. Novamente, parece que essa resistência é baseada principalmente na alta capacidade ureolítica desse microrganismo, que diminui qualquer tendência à acidificação do citoplasma celular. Para células intactas em suspensão de *S. salivarius* e *A. naeslundii*, 0,1 mM de fluoreto teve grande efeito inibitório em pH 5,0 e quase totalmente eliminou a atividade da urease em pH 4,0.

Parte da dependência ao pH na inibição da urease por fluoreto em células intactas pode ser devido ao acúmulo intracelular de fluoreto pelas células em ambientes acidificados (EISENBERG & MARQUIS, 1980; WHITFORD *et al.*, 1977). Assim, a urease no citoplasma bacteriano estaria mais exposta aos altos níveis de fluoreto à medida que o pH do ambiente fosse cada vez menor.

Os resultados de outros estudos, particularmente o de Todd & Hausinger (2000), em conjunto com os resultados aqui presentes, demonstraram que a inibição direta da enzima urease pelo fluoreto é aumentada pela acidificação do ambiente.

Assim, a dependência ao pH na inibição da atividade da urease pelo fluoreto em células intactas bacterianas é complexa, porque envolve tanto o aumento da captação de fluoreto pelas células como a sensibilidade aumentada da enzima em citoplasmas ácidos.

A inibição pelo fluoreto da urease é similar à inibição pelo fluoreto da enzima enolase, pois é quase irreversível (MARQUIS, CLOCK & MOTA-MEIRA, 2002).

Todd & Hausinger (2000) encontraram que a ligação do fluoreto e do níquel no sítio ativo da urease de *K. aerogenes* resultou em diminuição progressiva dos valores de  $V_{max}$  e aumento dos valores de  $K_m$  até a atividade enzimática ser totalmente inibida. Provavelmente, a inibição da urease envolve dois níqueis (Ni-1 e Ni-2) presentes no sítio ativo e que podem ligar fluoreto. Parece que essa ligação é aumentada com a ligação do substrato, sendo formados complexos, por exemplo, de urease-uréia-F ou urease-carbamato(prodoto)-F. No entanto, foi mostrado que o fluoreto pôde se dissociar lentamente do complexo com a urease e esta enzima aos poucos pôde retomar sua atividade.

As diferenças na resposta ao fluoreto entre células intactas em suspensão de *S. salivarius* e células intactas das outras duas bactérias testadas parecem ser devido principalmente às diferenças na fisiologia das células ao invés de diferenças nas enzimas urease, provavelmente pela capacidade das células em manter um  $\Delta pH$  através da membrana celular e, assim, resistirem à acidificação do citoplasma.

Outra característica do biofilme dental que poderia afetar a sensibilidade da atividade da urease ao fluoreto é a própria natureza do biofilme. Entretanto, biofilmes de *S. epidermidis* ou *S. salivarius* foram praticamente tão sensíveis ao fluoreto quanto as suspensões. Biofilmes de *A. naeslundii*, por outro lado, mostraram mais resistência ao fluoreto em comparação às células em suspensão. Porém, embora a ureólise por bactérias em biofilmes intactos tenha sido mais resistente ao fluoreto do que por células em suspensão intactas, a maior inibição ocorreu por níveis de fluoreto presentes na placa bacteriana.

Da mesma forma que o fluoreto, os ácidos orgânicos fracos podem inibir enzimas pela acidificação do citoplasma celular por serem, também, carreadores de prótons pela membrana em ambientes com pH ácido, como relatado por Belli, Buckley & Marquis (1995).

Mesmo sabendo-se que indometacina e caprato não são inibidores diretos da enzima urease, observou-se que estes ácidos foram efetivos na inibição da atividade ureolítica de células intactas das três bactérias testadas. Porém, sabe-se que alguns ácidos orgânicos fracos podem inibir enzimas diretamente, mas somente em concentrações muito altas (STRATFORD & ANSLOW, 1998), que não foram utilizadas na presente pesquisa.

No presente estudo, os ácidos orgânicos fracos indometacina e caprato foram utilizados para se diferenciar os efeitos diretos do fluoreto ligando-se no sítio ativo da urease associado ao níquel dos seus efeitos indiretos de acidificação do citoplasma celular em bactérias urease-positivas.

Indometacina foi tão potente quanto fluoreto na inibição da produção de amônia por células intactas em suspensão de *S. epidermidis* em pH 4,0, assim como observado anteriormente por Belli, Buckley & Marquis (1995) e por Marquis (1995) na inibição da glicólise por *S. mutans*.

Os biofilmes de *S. epidermidis* em pH 4,0 foram mais resistentes aos dois ácidos orgânicos fracos do que as células em suspensão intactas, e isso pode ser explicado pela já conhecida resistência dos biofilmes à acidificação do ambiente.

Assim, a acidificação do citoplasma é importante para a inibição da produção de amônia por células intactas, mesmo aquelas organizadas em biofilmes. Porém, foram necessárias concentrações um pouco maiores de

ácidos orgânicos fracos que de fluoreto para se conseguir efeitos significativos.

Dessa forma, parece que a inibição da atividade da urease de células intactas de *S. epidermidis* e *A. naeslundii* pelo fluoreto envolve tanto efeitos indiretos causados pelo prejuízo ao  $\Delta$ pH da membrana celular bacteriana, assim como inibição direta por ligação do fluoreto à enzima urease. Por outro lado, a inibição por fluoreto da ureólise em *S. salivarius* parece ser mais devido à ligação do fluoreto à enzima urease do que por acidificação do citoplasma.

Ainda, a inibição por fluoreto da produção de amônia por biofilme dental humano, assim como por *S. salivarius*, parece ser devido basicamente à inibição direta envolvendo ligação ao sítio ativo da enzima urease ao invés de inibição indireta associada à acidificação do citoplasma celular.

Conclui-se, portanto, que tanto efeitos diretos ou indiretos do fluoreto são importantes na inibição da produção de amônia em células intactas e biofilmes e esses efeitos são mais complexos que aqueles de ácidos orgânicos fracos. Observou-se também que níveis de fluoreto no biofilme dental (0,1 a 0,5 mM) parecem ser altamente inibitórios para a urease no pH do biofilme cariogênico que é ao redor de 4,0.

A exposição humana aos ácidos fracos, especialmente benzoato e sorbato nos alimentos, que aumentou bastante nos últimos anos, pode ter efeito na atividade ureolítica de bactérias orais em humanos. Para doenças orais como a cárie, a inibição da ureólise não seria desejável, mas para outras doenças em que o íon amônia age como agente inflamatório, a inibição seria benéfica.

## 2. ARGINÓLISE:

O SAD bacteriano parece ser ativo na placa dental, como previamente relatado por Burne & Marquis (2000) e funciona em ambientes com pH menores que o mínimo para glicólise e crescimento bacteriano (MARQUIS, CASIANO-COLÓN & BURNE, 1992).

Naturalmente, as bactérias expostas da placa oral e que são pouco tolerantes ao pH ácido, desenvolvem uma adaptação fenotípica e proteção à ação prejudicial ácida, que é aumentada pela arginólise promovida pelo SAD (CURRAN, LIEOU & MARQUIS, 1995). Isso pode permitir que bactérias não tão cariogênicas e ácido-tolerantes sobrevivam na presença dos ácidos sintetizados pelas bactérias ácido-resistentes, alterando o padrão de colonização e, provavelmente, a cariogenicidade da placa dental.

A atividade do SAD nos biofilmes intactos de *S. sanguis* e *S. rattus* foi significativamente menor do que nas suspensões, possivelmente por limitação de difusão do substrato para o interior do biofilme. Isso pôde ser confirmado quando biofilmes homogeneizados ou dispersos de ambas as bactérias apresentaram maior produção de amônia em meios com pH aumentado, sugerindo realmente que há uma limitação de difusão em biofilmes intactos.

Por outro lado, em valores de pH mais ácidos, a produção de amônia foi diminuída, muito provavelmente por sensibilidade das células ao ácido, proporcionada pela dispersão dos biofilmes. As células do biofilme podem

possivelmente ter sido danificadas quando processadas para dispersão, mas estas apareceram escuras no microscópio de contraste de fase, sugerindo que se houve dano celular, este não foi significativo. Dessa forma, observa-se que arginólise por estes biofilmes ocorre na faixa de pH estudada e que a produção de amônia, CO<sub>2</sub> e ATP pode ocorrer na placa bacteriana cariogênica, desde que seja na ausência de antimicrobianos.

Os resultados de estudos preliminares com biofilme dental humano sugerem que os efeitos inibitórios estudados em estreptococos orais “in vitro” podem também ocorrer “in situ” na cavidade oral.

A dispersão dos biofilmes de *S. sanguis* e de *S. rattus* fez com que houvesse uma maior sensibilidade das células aos antimicrobianos, indicando que a resistência das células do biofilme foi devido principalmente ao estado do biofilme e não à resistência fisiológica das células.

Antimicrobianos são usados extensivamente no controle de infecções orais. Dentre os agentes mais comumente utilizados em produtos de higiene oral estão os ácidos fracos, especialmente fluoreto, e outros compostos como triclosan e zinco. Além disso, humanos geralmente ingerem ácidos orgânicos fracos utilizados como preservativos alimentares ou aqueles como indometacina, usada como agente antiinflamatório.

Previamente, observou-se que zinco foi inibitório para a produção de amônia através da arginina por *S. rattus* ou através da uréia por *S. salivarius* e é um potente inibidor das enzimas arginina desaminase e urease (PHAN *et al.*, 2004). Butilparabeno, que também é utilizado como preservativo em cosméticos e em alguns produtos de higiene oral, se mostrou (MA *et al.*,

1999) um potente inibidor da arginólise por *S. rattus* e inibiu a captação de arginina e a enzima arginina desaminase.

As enzimas catabólicas do SAD não são muito sensíveis à ação do fluoreto, exceto quando este se encontra em concentrações muito altas (BURNE, PARSONS & MARQUIS, 1991). Assim, o mecanismo mais aceito para a inibição da arginólise pelo fluoreto é o rompimento de sistemas de transporte da membrana celular que carregam substratos para dentro da célula. O fluoreto, por causar a acidificação do citoplasma, anula o  $\Delta\text{pH}$  e, conseqüentemente, o  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ , que é a força próton-motora da membrana e que dirige o seu funcionamento eficiente. Se os sistemas de transporte estão ligados à membrana, qualquer dano a ela causado implicará, geralmente, em dano a esses sistemas também.

Para os inibidores testados neste estudo, a membrana celular se mostrou como o maior alvo para a inibição do SAD, enquanto que a enzima citoplasmática carbamato quinase foi o segundo maior alvo para a ação dos agentes, como o triclosan e a indometacina.

O mecanismo maior de captação de arginina para o SAD através da membrana celular em estreptococos durante o catabolismo desse aminoácido é via antiporter arginina/ornitina ou *arcD*, e é energizado pela concentração do gradiente de arginina e ornitina através da membrana celular (DRIESSEN, MOLENAAR & KONINGS, 1989; GRISWOLD *et al.*, 2004) sem gasto de ATP (DRIESSEN, VERHOOGT & KONINGH, 1989). A captação de arginina pelo antiporter requer que a ornitina seja produzida no citoplasma celular e que a concentração deste gradiente seja maior no citoplasma que no meio externo celular.

O gene *arcD* para o antiporter de *S. gordonii* foi recentemente identificado (DONG *et al.*, 2002) e parece que um gene deste tipo de “antiporter” está presente também na maioria dos estreptococos SAD-positivos e em organismos relacionados, como parte de um operon *arc*.

No entanto, estreptococos orais também possuem permeases ATP-dependentes na membrana para a captação de arginina, que é um aminoácido essencial para *S. mutans*, por exemplo (TERLECKYJ, WILLETT & SHOCKMAN, 1975). Em seguida, Poolman *et al.* (1995) caracterizou bem um sistema de transporte de oligopeptídeo do tipo ABC em lactococos, semelhante aos de estreptococos, que têm uma variedade de sistemas de transporte para a captação de peptídeos. Estes sistemas podem ser energizados por ATP, porém eles, geralmente, requerem uma membrana energizada e  $\Delta\mu_{H^+}$  para operar eficientemente.

Aproximadamente metade da captação total da arginina pelas células de ambas as bactérias SAD-positivas foi insensível aos inibidores durante a exposição inicial a esses agentes, enquanto a segunda parte da captação foi altamente sensível.

A captação inicial insensível aos agentes pode ter envolvido troca através do antiporter arginina/ornitina e pode ter havido também ligação passiva de arginina catiônica. Presumivelmente, o componente inibidor-sensível da captação depende de energização da membrana por ação da F-ATPase e formação de  $\Delta p$ , a força próton-motora através da membrana e a produção de ATP.

Inibidores do SAD de células intactas não inibiram duas enzimas do sistema, arginina desaminase e ornitina carbamiltransferase, envolvidas na

produção intracelular de ornitina. Assim, esses agentes inibidores do SAD de células intactas provavelmente não inibiriam o antiporter inicialmente mesmo se as células tivessem níveis bons citoplasmáticos de ornitina de catabolismo prévio de arginina. Porém, se os níveis de ornitina fossem baixos na célula e nova síntese fosse necessária para a função do antiporter, esses agentes inibiriam a captação de arginina por esse transportador.

A inibição de carbamato quinase em células intactas resultaria em inibição parcial da produção de amônia porque esta é produzida inicialmente na reação irreversível catalisada pela enzima arginina desaminase. Entretanto, o resultado da inibição de carbamato quinase indica um alvo citoplasmático para a inibição do SAD, mas oferece somente explicação parcial para as ações de triclosan e indometacina em células intactas.

As ações dos ácidos fracos pareceram dependentes primeiramente das suas propriedades de ácido fraco. Qualquer outra ação desses ácidos, como por exemplo inibição de enzimas citoplasmáticas, poderia ser aumentada pela maior captação das formas protonadas dos ácidos fracos para dentro das células em valores de pH baixos, próximos aos valores de  $pK_a$  dos agentes (MARQUIS, CLOCK, & MOTA-MEIRA, 2002).

A baixa atividade do fluoreto contra o SAD de ambas as bactérias está em contraste aos dados anteriores que mostram grande inibição pelo fluoreto da glicólise por estreptococos orais em pH 4,0 em suspensões expostas aos níveis micromolares desse agente (MARQUIS, 1990) e em biofilmes (MARQUIS, dados não publicados).

Surpreendentemente, fluoreto não se mostrou como potente inibidor do SAD de células em suspensão ou biofilmes, mesmo sabendo-se que este

agente é altamente efetivo em dissipar o  $\Delta\text{pH}$  da membrana e rapidamente se difundir para dentro dos biofilmes por seu tamanho molecular pequeno (MARQUIS, CLOCK, & MOTA-MEIRA, 2002).

No entanto, resultados de estudos prévios (BURNE, PARSONS, & MARQUIS, 1991) indicaram que as enzimas dos SAD não são inibidas por fluoreto, exceto quando expostas a concentrações extremamente altas, como de 1,0 a 10 mM.

O fluoreto poderia ser um grande inibidor, mas não nos níveis regularmente encontrados em biofilmes dentais. Certamente, fluoreto é altamente eficaz na inibição da glicólise de células em suspensão e em biofilmes de forma pH-dependente (MARQUIS, 1995).

O resultado de que fluoreto foi mais efetivo na inibição de produção de amônia de biofilme dental humano do que de biofilme cultivado em laboratório pode ser explicado por possível acúmulo de fluoreto residual no biofilme dental, uma vez que os hospedeiros doadores do biofilme moram em área com água fluoretada e utilizam dentifrícios com fluoreto.

Sabendo-se que os ácidos orgânicos fracos diminuem o  $\Delta\text{pH}$  através da membrana celular (MARQUIS, CLOCK, & MOTA-MEIRA, 2002), observou-se que o resultado encontrado de que esses ácidos inibem a captação de arginina de forma pH-dependente indica que o  $\Delta\text{pH}$  da membrana tem relação com a sensibilidade à inibição da captação de arginina. Parece, então, que a captação de arginina acima de um nível basal está ligada ao  $\Delta\text{pH}$  e ao  $\Delta\text{p}$ , na membrana celular, e este  $\Delta\text{pH}$  associado à captação é que parece ser o alvo principal dos inibidores.

Anteriormente, Rutherford, Ma & Marquis (1998) reportaram que ácidos fracos inibem a captação de arginina e peptídeos por estreptococos orais.

Os ácidos orgânicos fracos testados mostraram potência significativa como inibidores do SAD de células em suspensão, mas foram menos efetivos contra os biofilmes. A dependência ao pH na inibição do SAD pelos ácidos fracos indicou que a inibição estava relacionada principalmente à ação ácido-fraca, embora houvesse alguma indicação de que pôde ter havido outras ações específicas particulares de cada ácido testado. O resultado de que laurato metil éster não foi inibitório sustenta a hipótese de que um grupo carboxil ionizável é necessário para as ações inibitórias aqui descritas.

A indicação é clara de que a captação de arginina em pH 4,0 foi inibida pelos mesmos agentes que inibiram a produção de amônia através da arginina via SAD e que os ácidos orgânicos fracos têm potência menor quando o pH do meio é aumentado para 6,0.

As concentrações inibitórias da produção de amônia por triclosan em suspensões e biofilmes de *S. sanguis* e *S. rattus* podem ser comparadas às concentrações desse agente na inibição da glicólise por células em suspensão e biofilmes de *S. mutans*, com valores de  $DI_{50}$  de 0,06 mM/h e 0,1 mM/h, respectivamente (PHAN & MARQUIS, 2006). Esses valores são próximos a níveis bactericidas de triclosan para suspensões de *S. sanguis* com valores D (tempo para matar 90% da população inicial) de 13 min para 0,5 mM de triclosan ou 30 min para 0,05 mM de triclosan. Para biofilmes, os valores D foram 45 min com 1,0 mM de triclosan e com 0,1 mM por uma hora não ocorreu morte celular (MARQUIS, dados não publicados).

Este agente tem uma variedade de ações inibitórias em estreptococos orais (PHAN & MARQUIS, 2006), como inibição do sistema fosfotransferase fosfoenolpiruvato:açúcar (PTS) e das enzimas da glicólise no citoplasma celular, principalmente piruvato quinase e desidrogenase láctica.

O triclosan foi claramente inibitório do SAD no biofilme dental supragengival humano, sugerindo que formulações de produtos de higiene oral contendo tanto triclosan com arginina ou peptídeos de arginina não seriam mais efetivas na redução da cárie dental do que as formulações com somente triclosan. A ação inibitória de triclosan não foi muito afetada por alterações do pH.

Neste estudo, triclosan se mostrou como grande inibidor de carbamato quinase. Em estreptococos orais, triclosan não inibe a enoil-ACP redutase envolvida na síntese de ácidos graxos não saturados, como o faz em organismos como *Escherichia coli* ou *P. aeruginosa*, pois a enzima de estreptococos tem resistência intrínseca ao triclosan.

Os biofilmes estudados apresentaram resistência aumentada ao triclosan, comparados com células em suspensão. Isso se deve provavelmente à maior densidade de biomassa dos biofilmes. Essa mesma resistência nos biofilmes com triclosan foi encontrada previamente na glicólise por biofilmes de *S. mutans* (PHAN & MARQUIS, 2006).

Os inibidores do SAD poderiam ter ações benéficas em termos de saúde oral se o objetivo fosse reduzir a formação de cálculo dental. Além disso, pode ser de suma importância na inibição de sistemas semelhantes ao SAD em bactérias envolvidas na patogenia da doença periodontal.

Inibição da síntese de citrulina pode também reduzir a produção de aminas biogênicas ou carcinogênicas derivadas do catabolismo desse aminoácido. Há também outros efeitos sistêmicos patogênicos derivados do SAD, especialmente a forma ativa nos peptídeos com desaminação de resíduos arginil terminais, que poderiam ser inibidos pelos antimicrobianos testados neste estudo.

Ácidos orgânicos fracos (no biofilme dental acidificado), triclosan e outros inibidores do SAD podem, então, ser agentes desejáveis para reduzir a alcalinização ao invés de aumentá-la. Este assunto claramente merece mais investigação para que se obtenha o papel completo de como o SAD de bactérias orais podem ser controlados em suas ações no hospedeiro.

### **3. PRODUÇÃO DE ÁLCALIS E RELAÇÃO COM DOENÇAS ORAIS E SISTÊMICAS:**

Como revisado inicialmente nesta tese, há uma sólida evidência que a amônia produzida pelos microrganismos orais pode ser relevante em relação às doenças bucais, tanto com efeitos benéficos quanto prejudiciais.

Os efeitos benéficos se relacionam, principalmente, à doença cárie, em que a alcalinização da placa dental é considerada como condição imprescindível para a redução da cariogenicidade do biofilme bacteriano (BURNE & MARQUIS, 2000; BURNE & CHEN, 2000). Acredita-se que a ação é, nesse caso, principalmente a neutralização dos ácidos produzidos pelas bactérias que estão realizando glicólise (SHU *et al.*, 2007). Então, sabendo-se que o dano na doença cárie é devido à dissolução ácida do tecido mineral

dentário, a neutralização desse ácido poderia reduzir a erosão de esmalte e dentina.

Por exemplo, pacientes com doença renal crônica, possuem concentrações de uréia na saliva de 5 a 25 vezes maior que indivíduos saudáveis (PETERSON, WOODHEAD & CRALL, 1985), determinando uma incidência de cárie muito baixa, mesmo consumindo uma dieta rica em carboidratos e tendo o fluxo salivar reduzido (LUCAS & ROBERTS, 2005).

Da mesma forma demonstrou-se, recentemente, que a hidrólise de uréia, por exemplo, com resultante alcalinização do meio, pode induzir diretamente a deposição de fosfato de cálcio no microcosmo do biofilme de bactérias orais (WONG *et al.*, 2002). Assim, a síntese desses álcalis pode resultar também na maior tendência à formação de cálculos sobre as superfícies dentárias de pacientes com doença renal crônica, o que pôde ser confirmado por estudos clínicos (GAVALDA *et al.*, 1999; SOUZA *et al.*, 2005). Alguns estudos ainda descrevem uma maior tendência ao desenvolvimento de gengivite e periodontite nesses pacientes (DAVIDOVICH *et al.*, 2005 a; DAVIDOVICH *et al.*, 2005 b; NAUGLE *et al.*, 1998).

Assim, os efeitos não desejados da formação de cálculos parecem ser simplesmente causados pela elevação do pH do meio, enquanto que nas outras doenças, gengivite e, possivelmente, periodontite, os efeitos adversos da síntese de álcalis podem estar mais relacionados à produção específica de amônia (citotóxica em mucosas) do que somente à elevação do pH (BURNE & CHEN, 2000).

Ainda, Shu e colaboradores (2003) mostraram que a produção de amônia através da uréia pode ser importante para se manter a diversidade microbiana no biofilme, por não permitir que espécies de bactérias ácido-tolerantes dominem quantitativamente o biofilme rico em carboidratos. Assim, o pH mais elevado do biofilmes permite a sobrevivência de bactérias não-cariogênicas ácido-sensíveis e de bactérias periodontopatogênicas, sendo estas últimas não desejáveis no biofilme oral.

Em outras partes do corpo, a ureólise pode ter efeitos adversos como, por exemplo, a urease de *H. pylori* que é considerado um fator de virulência para essa bactéria, pois permite que ela sobreviva ao ambiente ácido do estômago (BEREWILL & KIST, 2002) e esteja associada à patologia da gastrite crônica e da úlcera duodenal, sendo um fator de risco para o câncer de estômago.

Outro papel da ureólise é o favorecimento da formação de cálculo renal por bactérias urease-positivas (du TOIT *et al.*, 1995), como os Gram-negativos *Proteus mirabilis*, algumas bactérias entéricas e *Ureaplasma spp.*, e também por bactérias Gram-positivas como estafilococos e corinebactérias.

Observam-se também alguns efeitos benéficos da produção de amônia através do SAD. van Wuyckhuysse *et al.* (1995) encontraram que níveis de arginina e lisina ou peptídeos contendo esses aminoácidos na saliva das glândulas parótidas de adultos sem incidência de cárie foram significativamente maiores do que os níveis desses aminoácidos na saliva de adultos com história de cárie dental. Ou seja, pode-se observar

uma relação inversa entre concentração desses aminoácidos na saliva e presença de cárie dental.

Isso pode estar relacionado ao favorecimento da sobrevivência de espécies bacterianas pouco ácido-resistentes e não cariogênicas no biofilme dental, evitando-se, assim, a prevalência de espécies ácido-resistentes e acidogênicas nesse biofilme (BURNE, 1998). Um exemplo disso é *S. sanguis*, que através do SAD e produção de amônia, permite sua manutenção no biofilme dental e aumenta a competição e diversidade desse meio com outras bactérias não SAD-positivas.

O SAD de bactérias ácido-láticas é ativo em valores de pH até menores que o mínimo para a glicólise e para o crescimento. Essa ácido tolerância permite que bactérias SAD-positivas revertam a acidificação letal do meio através da arginólise quando este aminoácido está presente (CASIANO-COLÓN & MARQUIS, 1988).

A produção de amônia através do SAD também possui efeitos não desejáveis. Como relatado anteriormente, bacilos Gram-positivos anaeróbios estritos assacarolíticos como *E. nodatum* possuem a capacidade de catabolizar arginina através do SAD e produzir amônia e butirato no biofilme gengival (UEMATSU & HOSHINO, 1992). Desse modo, esses bacilos podem colaborar para a patogenicidade das doenças periodontais humanas. Além disso, *E. nodatum* pode ter papel fundamental no desenvolvimento e progressão da doença por estar presente proeminentemente nas bolsas gengivais e por ser um membro do complexo microbiano laranja (UEMATSU *et al.*, 2003).

Ainda, *P. gingivalis*, *P. nigrescens*, *P. intermedia* e *F. nucleatum* fermentam resíduos de aminoácidos arginina, lisina, aspartato ou glutamato presentes em peptídeos, produzindo amônia, propionato e butirato (GHARBIA & SHAH, 1991; TAKAHASHI & SATO, 2001; TAKAHASHI & YAMADA, 2000). Esses produtos são tóxicos para os tecidos do hospedeiro e podem interferir a resposta imunológica, além da presença da amônia também favorecer o aumento do pH do biofilme e permitir a manutenção dessas espécies periodontopatogênicas no meio subgengival.

*P. aeruginosa* possui também o SAD que cataboliza arginina quando este é o único catabólito presente no meio e permite o seu crescimento em anaerobiose (WINTELER *et al.*, 1996). Isso pode ter implicação na patogenia periodontal associada a essa bactéria, uma vez que *P. aeruginosa* foi isolada em grande quantidade de biofilmes subgengivais de pacientes com periodontite crônica em comparação aos biofilmes de pacientes saudáveis (do SOUTO, 2007). Essa bactéria também causa várias outras infecções sistêmicas, principalmente em pacientes imunocomprometidos.

Outras bactérias envolvidas em patogenias sistêmicas e que possuem o SAD, que pode ser um fator de virulência para essas bactérias, são *Bacillus* spp., micoplasmas e *S. pyogenes*. Esta última é uma bactéria do grupo A dos estreptococos e é agente etiológico da amigdalite e pode apresentar como seqüelas da sua infecção no hospedeiro a endocardite e a glomerulonefrite.

Dessa forma, o SAD que cataboliza arginina possui as mesmas funções em *S. pyogenes* que em bactérias ácido-láticas, como por exemplo a proteção contra o ácido pela produção de amônia, a síntese de ATP e a síntese de citrulina. Além disso, a atividade de arginina desaminase em *S.*

*pyogenes* foi relacionada à inibição da proliferação de linfócitos T humanos (DEGNAN *et al.*, 1998) e permite que essa bactéria sobreviva em ambientes ácidos como no interior dos fagolisossomos (DEGNAN *et al.*, 2000).

#### **4. PERSPECTIVAS FUTURAS:**

Parece que a maior resistência dos biofilmes à acidificação e aos efeitos das substâncias ativas na membrana, em ambientes ácidos, é de grande auxílio em relação aos esforços que têm sido realizados para o desenvolvimento de regimes anticárie, baseados no aumento da produção de álcalis na placa dental pelo aumento de suprimento oral de arginina e uréia.

No entanto, é bastante evidente, pelos resultados apresentados aqui, que os antimicrobianos testados podem ser os empecilhos para o sucesso desses esforços.

Esses resultados adquirem uma grande importância quando se relacionam a presença quase constante de fluoreto na placa dental e as bactérias urease-positivas aí presentes. Acredita-se, pois, que o sistema ureólise, sendo inibido pelo fluoreto quando o pH oral é criticamente ácido (como 4,0), gere um maior risco de desenvolvimento de cárie e não uma proteção contra a desmineralização dentária que poderia ser conferida pelos álcalis provenientes da ureólise.

A arginólise pelos biofilmes, a partir da arginina livre como substrato, parece ser menos sensível à ação dos agentes. Porém, na boca, os peptídeos contendo arginina são a maior fonte de substrato para o SAD e a

captação desses peptídeos parece ser altamente sensível à ação dos agentes, porque esta requisita a manutenção do  $\Delta\mu_{H^+}$  através da membrana celular para funcionar efetivamente. Este potencial da membrana é reduzido pelos agentes, prejudicando, então, a captação desses peptídeos. Claramente, trabalhos futuros devem enfatizar os estudos de captação de peptídeos por bactérias SAD-positivas e os efeitos da acidificação do ambiente e dos agentes ativos de membrana.

Os efeitos do fluoreto na síntese de álcalis, assim como das outras substâncias ativas na membrana plasmática celular, mostraram que o conceito atual de sistemas de produção de amônia, no ambiente oral, como proteção contra a cárie dental principalmente, deve ser reinterpretado, uma vez que eles, no geral, inibiram a atividade desses sistemas.

Além disso, a inibição da produção de álcalis orais poderia exercer forte influência na prevenção de formação de cálculos e até de doenças periodontais. Porém, essa hipótese precisa ser avaliada clinicamente, uma vez que o papel da amônia nas periodontopatias ainda não está bem esclarecido.

O esclarecimento completo de como, onde e em que proporção agem os antimicrobianos, principalmente o fluoreto, sobre a produção de ácidos e álcalis no biofilme bacteriano oral tem uma enorme importância no desenvolvimento de bases sólidas para estudos posteriores clínicos que objetivem a determinação de agentes de higiene oral mais eficazes na prevenção e controle de doenças orais, com ênfase na cárie dental e nas doenças periodontais.

Além disso, sabendo-se que tanto a urease quanto o SAD estão presentes como fatores de virulência em bactérias colonizadoras de outras regiões do corpo humano e que são possíveis agentes etiopatogênicos de doenças sistêmicas, e se sabendo também que esses sistemas produtores de álcalis são inibidos pelos antimicrobianos estudados nesta pesquisa, pensa-se que estes antimicrobianos poderiam ser utilizados como ferramentas úteis no tratamento dessas doenças como coadjuvantes ou substituindo os antibióticos, que são os antimicrobianos normalmente utilizados contra essas bactérias e que podem ser menos eficazes quando bactérias resistentes estão presentes. Obviamente, muitos estudos laboratoriais e clínicos são ainda necessários para a completa elucidação desta hipótese.

## CONCLUSÕES

De modo geral, todos os antimicrobianos testados inibiram em pelo menos algum grau a produção de amônia pelas bactérias, em suspensões ou em biofilmes, e pelo biofilme dental humano, agindo através de diferentes mecanismos de ação. Dessa forma, conclui-se especificamente que:

1. Todas as bactérias testadas em suspensão ou biofilme possuem capacidade de produzir amônia através da uréia ou arginina em diferentes níveis e na faixa de pH de 4,0 a 6,0;

2. O biofilme dental supragengival humano, na faixa de pH de 4,0 a 6,0 e com suprimento de uréia ou arginina, pode produzir amônia, comprovando que a síntese de álcalis pode ocorrer realmente na boca;

3. Fluoreto de sódio, indometacina e caprato inibem a síntese de amônia por *S. epidermidis*, *S. salivarius* e *A. naeslundii* em suspensões e em biofilmes, sendo estes mais resistentes à inibição pelos agentes do que as suspensões;

4. Fluoreto é mais potente que indometacina e caprato na inibição da ureólise e todos eles têm ação pH-dependente, ou seja, quanto menor é o pH, maior é a inibição;

5. Fluoreto de sódio, indometacina e caprato também inibem a síntese de amônia via ureólise por biofilme dental supragengival humano com potência também pH-dependente e com fluoreto como o mais potente;

6. O fluoreto inibe diretamente a enzima urease por ligação no seu sítio ativo e indiretamente por acidificação do citoplasma celular, enquanto que indometacina e caprato inibem a urease apenas indiretamente;

7. Fluoreto de sódio, triclosan, indometacina, caprato e laurato inibem a síntese de amônia por *S. sanguis* e *S. rattus* em suspensões e em biofilmes, sendo estes mais resistentes à inibição que as suspensões e de forma pH-dependente, com triclosan e indometacina como os agentes mais potentes;

8. Fluoreto de sódio, triclosan, indometacina, caprato e laurato também inibem a produção de amônia por biofilme dental supragengival humano via arginólise de forma pH-dependente e tendo o triclosan e a indometacina como os agentes mais potentes;

9. Em comparação à ureólise, fluoreto se apresenta como um inibidor fraco da arginólise em *S. sanguis*, *S. rattus* e em biofilme humano;

10. Das três enzimas do SAD, apenas carbamato quinase é inibida diretamente por algum dos agentes testados. São eles triclosan e indometacina;

11. Fluoreto não se apresenta como um potente inibidor da captação de arginina pelas bactérias SAD-positivas, sendo triclosan e indometacina os agentes mais inibidores;

12. O provável mecanismo de ação dos outros ácidos orgânicos fracos, caprato e laurato, além de indometacina, é a acidificação do citoplasma celular, inibindo indiretamente as enzimas do SAD;

13. Laurato metil éster, ao contrário dos outros antimicrobianos, estimulou a arginólise de suspensões e de biofilmes de *S. sanguis* e *S. rattus* em pH 4,0, através de mecanismo de ação não conhecido.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOZA-SILVA, E. 2003. Ação de substâncias na membrana citoplasmática sobre a produção de álcalis por *Actinomyces naeslundii* e *Streptococcus rattus*. Tese de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

BARBOZA-SILVA, E., CASTRO, A. C. D. & MARQUIS, R. E. 2005. Mechanisms of inhibition by fluoride of urease activities of cell suspensions and biofilms of *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus salivarius*, *Actinomyces naeslundii* and of dental plaque. Oral Microbiol. Immunol., **20**: 323-332.

BARBOZA-SILVA, E. & MARQUIS, R. E. 2003. Mechanisms of fluoride inhibition of ammonia production by oral bacteria. Anais da "81<sup>st</sup> General Session of the International Association for Dental Research" (IADR), Gotemburgo, Suécia. Resumo 0076;

BARBOZA-SILVA, E. & MARQUIS, R. E. 2004. Fluoride as an inhibitor for urease activity of *Actinomyces naeslundii* and *Streptococcus salivarius*. Anais da "104<sup>th</sup> General Meeting of the American Society for Microbiology" (ASM), Nova Orleans, LA, EUA. Resumo K-170;

BELLI, W. A., BUCKLEY, D. H. & MARQUIS, R. E. 1995. Weak acid effects and fluoride inhibition of glycolysis by *Streptococcus mutans* GS-5. Can. J. Microbiol., **41**: 785 - 791.

BELLI, W. A. & 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. & MARQUIS, R. E. 1987. Membrane ATPases and acid tolerance of *Actinomyces viscosus* and *Lactobacillus casei*. Appl. Environ. Microbiol., **53**: 331-338.

BENDER, G. R., SUTTON, S. V. W. & MARQUIS, R. E. 1986. Acid tolerance, proton permeabilities, and membrane ATPases of oral streptococci. Infect. Immun., **53**: 331 - 338.

BEREWILL, S. & KIST, M. 2002. Molecular microbiology and pathogenesis of *Helicobacter* and *Campylobacter* updated: a meeting report of the 11th

- conference on *Campylobacter*, *Helicobacter* and related organisms. Mol. Microbiol., **45**: 255–262.
- BIZZINI, A., ENTENZA, J. M. & MOREILLON, P. 2007. Loss of penicillin tolerance by inactivating the carbon catabolite repression determinant CcpA in *Streptococcus gordonii*. J. Antimicrob. Chemother., **59**:607-615.
- BOWDEN, G. H. W. 1990. Microbiology of root surface caries in humans. J. Dent. Res., **69**: 1205-1210.
- BOWDEN, G. H. W., ELLWOOD, D. C. & HAMILTON, J. R. 1979. Microbial ecology of the oral cavity. Adv. Microb. Ecol., **3** :135-217.
- BOWEN, W. H., PEARSON, S. K. & JERUSSI, T. P. 2000. Influence of (S)-ketoprofen and fluoride on caries in rats. Oral Dis., **6** : 12 - 14.
- BRADSHAW, D. J. & MARSH, P. D. 1999. Use of continuous flow techniques in modeling dental plaque biofilms. Meth. Enzymol., **310** : 279 - 295.
- BURNE, R. A. 1995. Desastres ecológicos orais: o papel da reserva de curto prazo de polissacarídeos extracelulares. In: BOWEN, W. H. & TABAK, L. H. Cariologia para a década de 90. Editora Santos, São Paulo, p. 351-364.
- BURNE, R. A. 1998. Oral streptococci... products of their environment. J. Dent. Res., **77**:445-52.

BURNE, R. A. & CHEN, Y-Y. M. 2000. Bacterial ureases in infectious diseases. *Microbes and Infection*, **2** : 533 - 542.

BURNE, R. A. & MARQUIS, R. E. 2000. Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. *FEMS Microbiol. Lett.*, **193** : 1 - 6.

BURNE, R. A. & MARQUIS, R. E. 2001. Biofilm acid/base physiology and gene expression in oral bacteria. *Meth. Enzymol.*, **337** : 403 - 415.

BURNE, R. A., PARSONS, D. T. & MARQUIS, R. E. 1989. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the genes of the arginine deiminase system of *Streptococcus sanguis* NCTC 10904. *Infect. Immun.*, **57** : 3540 - 3548.

BURNE, R. A., PARSONS, D. T. & MARQUIS, R. E. 1991. Environmental variables affecting arginine deiminase expression in oral streptococci. In: DUNNY, G. M., CLEARY, P. P. & MCKAY, L. L. *Genetics and Molecular Biology of Streptococci, Lactococci and Enterococci*, American Society for Microbiology, Washington, DC, p. 276 - 280.

BURNE, R. A., QUIVEY, R. G. & MARQUIS, R. E. 1999. Physiologic homeostasis and stress responses in oral biofilms. *Meth. Enzymol.*, **310** : 441 - 460.

CALDELARI, I., LOELIGER, B., LANGEN, H., GLAUSER, M. P. & MOREILLON, P. 2000. Deregulation of the arginine deiminase (*arc*) operon in penicillin-tolerant mutants of *Streptococcus gordonii*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**: 2802-2810.

CASIANO-COLÓN, A. & MARQUIS, R. E. 1988. Role of the arginine deiminase system in protecting oral bacteria and an enzymatic basis for acid tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54** : 1318 - 1324.

CHEN, Y-Y. M. & BURNE, R. A. 1996. Analysis of *Streptococcus salivarius* urease expression using continuous chemostat culture. *FEMS Microbiol. Lett.*, **135** : 223 - 229.

CHEN, Y-Y. M., CLANCY, K. A. & BURNE, R. E. 1996. *Streptococcus salivarius* urease: genetic and biochemical characterization and expression in a dental plaque *Streptococcus*. *Infect. Infect. Immun.*, **64** : 585-592.

CHEN, Y-Y. M., WEAVER, C. A. & BURNE, R. E. 2000. Dual functions of *Streptococcus salivarius* urease. *J. Bacteriol.*, **182** : 4667 - 4669.

COSTERTON, J. W., LEWANDOWSKI, Z. CALDWELL, D. E. KORBER, D. R. & LAPPIN-SCOTT, H. M. 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.*, **49**: 711-745.

COSTERTON, J. W., STEWART, P. S. & GREENBERG, E. P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, **284** : 1318-1322.

CUNIN, R., GLANSDORFF, N., PIERARD, A. & STALON, V. 1986. Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiol. Rev.*, **50**: 314-352.

CURRAN, T. M., BUCKLEY, D. H. & MARQUIS, R. E. 1994. Quasi-irreversible inhibition of enolase of *Streptococcus mutans* by fluoride. *FEMS Microbiol. Lett.*, **119** : 283 - 288.

CURRAN, T. M., LIEOU, J. & MARQUIS, R. E. 1995. Arginine deiminase system and acid adaptation of oral streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**: 4494 - 4496.

CURRAN, T. M., MA, Y., RUTHERFORD, G. C. & MARQUIS, R. E. 1998. Turning on and turning off the arginine deiminase system in oral streptococci. *Can. J. Microbiol.*, **44**: 1078 - 1085.

CURTIS, M. A., KEMP, C. W., ROBRISH, S. A. & BOWEN, W. H. 1983. Stickland reactions in dental plaque. *Infect. Immun.*, **42**: 431 - 433.

DAVEY, M. E. & O'TOOLE, G. A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*, **64**: 847 - 867.

DAVIDOVICH, E., DAVIDOVITS, M., EIDELMAN, E., SCHWARZ, Z. & BIMSTEIN, E. 2005 a. Pathophysiology, therapy, and oral implications of

renal failure in children and adolescents: an update. *Pediatr. Dent.*, **27**: 98-106.

DAVIDOVICH, E., SCHWARZ, Z., DAVIDOVITCH, M., EIDELMAN, E. & BIMSTEIN, E. 2005 b. Oral findings and periodontal status in children, adolescents and young adults suffering from renal failure. *J. Clin. Periodontol.*, **32**: 1076-82.

DAVIS, B. A., RAUBERTAS, R. F., PEARSON, S. K. & BOWEN, W. H. 2001. The effects of benzoate and fluoride on dental caries in intact and desalivated rats. *Caries Res.*, **35**: 331 - 337.

DEGNAN, B. A., FONTAINE, M. C., DOEBEREINER, A. H., LEE, J. J., MATSROENI, P., DOUGAN, G., GOODACRE, J. A. & KEHOE, M. A. 2000. Characterization of na isogenic mutant of *Streptococcus pyogenes* Manfredo lacking the ability to make streptococcal acid glycoprotein. *Infect. Immun.*, **68**: 2441–2448.

DEGNAN, B. A., PALMER, J. M., ROBSON, T., JONES, C. E. D., FISCHER, M., GLANVILLE, M., MELLOR, G. D., DIAMOND, A. G., KEHOE, M. A. & GOODACRE, J. A. 1998. Inhibition of human peripheral blood mononuclear cell proliferation by *Streptococcus pyogenes* cell extract is associated with arginine deiminase activity. *Infect. Immun.*, **66**: 3050–3058.

DONG, Y., CHEN, Y-Y. M. & BURNE, R. A. 2004. Control of expression of the arginine deiminase operon of *S. gordonii* by CcpA and Flp. J. Bacteriol., **186**: 2511-2514.

DONLAN, R. M. & COSTERTON, J. W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin. Microbiol. Rev., **15** : 167-193.

do SOUTO, R. M. 2007. Prevalência de bactérias patogênicas “não-orais” em amostras de biofilme subgengival e saliva de pacientes com periodontite ou saúde periodontal. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

DRIESSEN, A. J. M., MOLENAAR, D. & KONINGS, W. N. 1989. Kinetic mechanism and specificity of the arginine-ornithine antiporter of *Lactococcus lactis*. J. Biol. Chem., **264** : 10362 - 10370.

DRIESSEN, A. J. M., VERHOOGT, H. C. & KONINGH, W. N. 1992. Novel mechanism of guanidino compound transport in bacteria: arginine:ornithine exchange. In: DE DEYN, P. P., MARESCAU, B., STALON, V. & QURESHI, I. A. Guanidino Compounds in Biology and Medicine, John Libbey and Company, London, p. 03 - 12.

DUCKWORTH, R. M., MORGAN, S. N. & MURRAY, A. M. 1987. Fluoride in saliva and plaque following use of fluoride-containing mouth-washes. *J. Dent. Res.*, **66**: 1730-1734.

DUNNE Jr., W. M. 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin. Microbiol. Rev.*, **15**: 155-166.

du TOIT, P. J., van ASWEGEN, C. H., NEL, J. A., STEYN, P. L., LIGTHELM, A. J. & PLESSIS, D. J. 1995. In vivo effects of urease-producing bacteria involved with the pathogenesis of infection-induced urolithiasis on renal urokinase and sialidase activity. *Urol. Res.*, **23**: 335–338.

EISENBERG, A. D. & MARQUIS, R. E. 1980. Uptake of fluoride by cells of *Streptococcus mutans* in dense suspensions. *J. Dent. Res.*, **59**: 1187–1191.

ELDER, B. & NANCOLLAS, G. H. 1995. Aspectos físico-químicos da mineralização e desmineralização dos componentes do dente. In: BOWEN, W. H. & TABAK, L. H. *Cariologia para a década de 90*. p. 187 - 196.

EKLUND, T. 1980. Inhibition of growth and uptake processes in bacteria by some chemical food preservatives. *J. Appl. Bacteriol.*, **48** : 423 - 432.

FERRO, K. J., BENDER, G. R. & MARQUIS, R. E. 1983. Coordinately repressible arginine deiminase system in *Streptococcus sanguis*. *Curr. Microbiol.*, **9**: 145-150.

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

GATERMANN, S., JOHN, J. & MARRE, R. 1989. *Staphylococcus saprophyticus* urease: characterization and contribution to uropathogenicity in unobstructed urinary tract infection in rats. *Infect. Immun.*, **57**: 110–116.

GAVALDA, C., BAGAN, J., SCULLY, C., SILVESTRE, F., MILIAN, M. & JIMENEZ, Y. 1999. Renal hemodialysis patients: oral, salivary, dental and periodontal findings in 105 adult cases. *Oral Dis.*, **5**: 299-302.

GENCO, R. J. 1992. Host responses in periodontal disease: current concepts. *J. Periodontol.*, **63 (S)**: 338-355.

GHARBIA, S. E. & SHAN, H. N. 1991. Pathways of glutamate catabolism among *Fusobacterium* species. *J. Gen. Microbiol.*, **137**: 1201-1206.

GIBBONS, R. J. & SOCRANSKY, S. S. 1962. Intracellular polysaccharide storage by organisms in dental plaques. Its relation to dental caries and microbial ecology of the oral cavity. *Arch. Oral Biol.*, **7**: 73-80.

GRISWOLD, A. R., CHEN, Y-Y. M. & BURNE, R. A. 2004. Analysis of an agmatine deiminase gene cluster in *Streptococcus mutans* UA159. J. Bacteriol., **186**: 1902-1904.

GRISWOLD, A. R., CHEN, Y-Y. M., SNYDER, J. A. & BURNE, R. A. 2004. Characterization of the arginine deiminase operon of *Streptococcus rattus* FA-1. Appl. Environ. Microbiol., **70**: 1321-1327.

GRISWOLD, A. R., JAMESON-LEE, M. & BURNE, R. A. 2006. Regulation and physiologic significance of the agmatine deiminase system of *Streptococcus mutans* UA159. J. Bacteriol., **188**: 834-841.

GUTKNECHT, J. & WALTER, A. 1981. Hydrofluoric and nitric acid transport through lipid bilayer membranes. Biochim. Biophys. Acta, **644** ; 153 - 156.

HE, G., PEARCE, E. I. F. & SISSONS, C. H. 2002. Inhibitory effect of ZnCl<sub>2</sub> on glycolysis in human oral microbes. Arch Oral Biol., **47**: 117 – 129.

HOLT, S. C., KESAVALU, L., WALKER, S. & GENCO, C. A. 1999. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. Periodontol. 2000, **20**: 168-238.

HURWITZ, C., BRAUN, C. B. & PEABODY, R. A. 1965. Washing bacteria by centrifugation through a water-immiscible layer of silicones. J. Bacteriol., **90**: 1692 - 1695.

JENG, J-H., CHAN, C-P., HO, Y-S., LAN, W-H., HSIEH, C-C. & CHANG, M-C. 1999. Effects of butyrate and propionate on the adhesion, growth, cell cycle kinetics and protein synthesis of cultured human gingival fibroblasts. *J. Periodontol.*, **70**: 1435-1442.

KOLENBRANDER, P. E. 2000. Oral microbial communities: Biofilms, interactions and genetic system. *Annu. Rev. Microbiol.*, **54** : 413 - 437.

KOLENBRANDER, P. E., ANDERSEN, R. N., BLEHERT, D. S., EGLAND, P. G., FOSTER, J. S. & PALMER Jr, R. J. 2002. Communication among oral bacteria. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*, **66** : 486 - 505.

KOLENBRANDER, P. E., ANDERSEN, R. N., KAZMERZAK, K., WU, R. & PALMER Jr, R. J. 1999. Spatial organization of oral bacteria in biofilms. *Meth. Enzymol.*, **310**: 322-334.

KOLENBRANDER, P. E. & LONDON, J. 1993. Adhere today, here tomorrow: oral bacteria adherence. *J. Bacteriol.*, **175**: 3247-3252.

KOO, H., SHENG, J., NGUYEN, P. T. M. & MARQUIS, R. E.. 2006. Co-operative inhibition by fluoride and zinc of glucosyl transferase production and polysaccharide synthesis by mutans streptococci in suspension cultures and biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.*, **254**: 134-140.

LAMBERT, R. J. & STRATFORD, M. 1999. Weak-acids preservatives: modeling microbial inhibition and response. J. Appl. Microbiol., **86** : 157 - 164.

LEWIS, K. 2001. Riddle of biofilm resistance. Antimicrob. Agents Chemother., **45**: 999-1007.

LOESCHE, W. J. 1986. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol. Rev., **50** : 353 - 380.

LOESCHE, W. J. 1993. Cárie dental: uma infecção tratável. Editora Cultura Médica, Rio de Janeiro, 349 p.

LOESCHE, W. J. & GROSSMAN, N. S. 2001. Periodontal disease as a specific, albeit chronic, infection: diagnosis and treatment. Clin. Microbiol. Rev., **14**: 727-752.

LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N. J., FARR, A. J. & RANDALL, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., **193**: 265-275.

LUCAS, V. S. & ROBERTS, G. J. 2005. Oro-dental health in children with chronic renal failure and after renal transplantation: a clinical review. Pediatr. Nephrol., **20**: 1388-1394.

MA, Y. & MARQUIS, R. E. 1996. Irreversible paraben inhibition of glycolysis by *Streptococcus mutans* GS-5. Lett. Appl. Microbiol., **23** : 329 -333.

MA, Y., RUTHERFORD, G. C., CURRAN, T. M., REIDMILLER, J. S. & MARQUIS, R. E. 1999. Membrane locus and pH sensitivity of paraben inhibition of alkali production by oral streptococci. Oral Microbiol. Immunol., **14**: 244 - 249.

MARCOTTE, H. & LAVOIE, M. C. 1998. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. Microbiol. Molec. Rev., **62**: 71-109.

MARQUIS, R. E. 1990. Diminished acid tolerance of plaque bacteria caused by fluoride. J. Dent. Res., **69(S)**: 672 - 675.

MARQUIS, R. E. 1995. Antimicrobial actions of fluoride for oral bacteria. Can. J. Microbiol., **41**: 955 - 964.

MARQUIS, R. E., BENDER, G. R., MURRAY, D. R. & WONG, A. 1987. Arginine deiminase system and bacterial adaptation to acid environments. Appl. Environ. Microbiol., **53**: 198 - 200.

MARQUIS, R. E., BURNE, R. A., PARSONS, D. T. & CASIANO-COLÓN, A. E. 1995. Arginina desiminase e geração de álcali na placa. In: BOWEN, W. H.

& TABAK, L. H. *Cariologia para a década de 90*. Editora Santos, São Paulo, p. 309 - 317.

MARQUIS, R. E., CASIANO-COLÓN, A. & BURNE, R. A. 1992. Role of the arginine deiminase system in the acid-base physiology of oral streptococci. In: DE DEYN, P. P., MARESCAU, B., STALON, V. & QURESHI, I. A. *Guanidino Compounds in Biology and Medicine*. John Libbey and Company, London, p. 309 - 317.

MARQUIS, R. E., CLOCK, S. A. & MOTA-MEIRA, M. 2002. Fluoride and organic weak acids as modulators of microbial physiology. *FEMS Microbial. Rev.*, 26: 493-510.

MARSH, P. D. 1991. Sugar, fluoride, pH and microbial homeostasis in dental plaque. *Proc. Finn. Dent. Soc.*, **87**: 515-525.

MARSH, P. D. 1994. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv. Dent. Res.*, **8**: 263-271.

MARSH, P. D. & MARTIN, M. 1999. *Oral Microbiology*, 3. ed. Chapman & Hall Ltd., London, United Kingdom.

McGRAW, W. T., POTEMPA, J., FARLEY, D. & TRAVIS, J. 1999. Purification, characterization, and sequence analysis of a potential virulence

- factor from *Porphyromonas gingivalis*, peptidylarginine deiminase. Infect. Immun., **67**: 3248-56.
- McNABB, P. C. & TOMASI, T. B. 1981. Host defense mechanisms at mucosal surfaces. Annu. Rev. Microbiol., **35**: 477-496.
- MOBLEY, H. L. T., GARNER, R. M. & BAUERFILED, P. 1995. *Helicobacter pylori* nickel-transport gene *nixA*: synthesis of catalytically active urease in *Escherichia coli* independent of growth conditions. Mol. Microbiol., **16**: 97-109.
- MOBLEY, H. L. T., ISLAND, M. D. & HAUSINGER, R. P. 1995. Molecular biology of microbial ureases. Microbiol. Rev., **59** : 451 - 480.
- MOORE, W. E. C. BURMEISTER, J. A. BROOKS, C. N., RANNEY, R. R. HINKELMANN, K. H. SCHICKEN, R. M. & MOORE, L. V. H. 1993. Investigation of the influences of puberty, genetics and environment on the composition of subgingival periodontal floras. Infect. Immun., **61**: 2891-2898.
- MOORE, L. V. H., MOORE, W. E. C., CATO, E. P., SMIBERT, R. M. BURMEISTER, J. A., BEST, A. M. & RANNEY, R. R. 1987. Bacteriology of human gingivitis. J. Dent. Res., **66**: 989-995.
- MOROU-BERMÚDEZ, E. 1999. Molecular and physiologic characterization of urease of *Actinomyces naeslundii* WVU 45. PhD. Thesis, University of Rochester, Rochester, NY, EUA.

MOROU-BERMÚDEZ, E. & BURNE, R. A. 1999. Genetic and physiologic characterization of urease of *Actinomyces naeslundii*. Infect. Immun., **67** : 504 - 512.

MOROU-BERMÚDEZ, E. & BURNE, R. A. 2000. Analysis of urease expression in *Actinomyces naeslundii* WVU 45. Infect. Immun., **68** : 6670 - 6676.

NAUGLE, K., DARBY, M. L., BAUMAN, D. B., LINEBERGER, L. T. & POWERS, R. 1998. The oral health status of individuals on renal dialysis. Ann. Periodontol., **3**: 197-205.

NGUYEN, P. T. M., ABRANCHES, J., PHAN, T-N. & MARQUIS, R. E. 2002. Repressed respiration of oral streptococci grown in biofilms. Curr. Microbiol., **44**: 262-266.

NIEDERMAN, R. BRUNKHORST, B., SMITH, S. WEINREB, R. N. & RYDER, M. I. 1990. Ammonia as a potential mediator of adult human periodontal infection: inhibition of neutrophil function. Arch. Oral Biol., **35**: 205-209.

NYVAD, B. 1993. Microbial colonization of human tooth surfaces. Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand., **101**: 7-45.

- OLIVER, R. C., BROWN, L. J. & LOE, H. 1998. Periodontal disease in the United States population. *J. Periodontol.*, **69**: 269-278.
- PAPAPANOU, P. N. 1996. Periodontal disease: epidemiology. *Ann. Periodontol.*, **1**: 1-36.
- PARK, I. S. & HAUSINGER, R. P. 1995. Requirement of carbon dioxide for in vitro assembly of the urease nickel metallocenter. *Science*, **267**: 1156-1158.
- PAULETTO, N., SILVER, J. G. & LARJAVA, H. 1997. Nonsteroidal anti-inflammatory agents: potential modifiers of periodontal disease progression. *J. Can. Dent. Assoc.*, **63**: 824 - 829.
- PEARSON, R. M. & SMITH, J. A. B. 1943. The utilization of urea in the bovine rumen. 2. The conversion of urea to ammonia. *Biochem. J.*, **37**: 148–153.
- PETERSON, S., WOODHEAD, J. & CRALL, J. 1985. Caries resistance in children with chronic renal failure: plaque pH, salivary pH, and salivary composition. *Pediatr. Res.*, **19**: 796 - 799.
- PHAN, T-N., BUCHNER, T., SHENG, J., BALDECK, J. D. & 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.

PHAN, T-N & MARQUIS, R. E. 2006. Triclosan inhibition of membrane enzymes and glycolysis of *Streptococcus mutans* in suspensions and biofilms. *Can. J. Microbiol.*, **52**: 977-983.

PHAN, T-N, NGUYEN, P.T.M., ABRANCHES, J. & MARQUIS, R. E. 2002. Fluoride and organic weak acids as respiration inhibitors of oral streptococci in acidified environments. *Oral Microbiol. Immunol.*, **17** : 119 - 124.

PHAN, T. N., REIDMILLER, J. S. & MARQUIS, R. E. 2000. Sensitization of *Actinomyces naeslundii* and *Streptococcus sanguis* in biofilms and suspensions to acid damage by fluoride and other weak acids. *Arch. Microbiol.*, **174** : 248 - 255.

POOLMAN, B., DRIESSEN, A. J. M. & KONINGS, W. N. 1987. Regulation of arginine-ornithine exchange and the arginine deiminase pathway in *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, **169** : 5597 - 5604.

POTERA, C. 1999. Forming a link between biofilms and disease. *Science*, **283**: 1837-1839.

RASTOGI, S. C., SCHOUNTEN, N. & WEIJLAND, W. 1995. Contents of methy-, ethyl-, butyl- and benzylparaben in cosmetics products. *Contact Dermatitis*, **32** : 28 - 30.

ROBERTS, A. P., PRATTEN, J., WILSON, W. & MULLANY, P. 1999. Transfer of a conjugative transposon, Tn5397 in a mixed oral biofilm. FEMS Microbiol. Lett., **177**: 63-66.

ROGERS, A. H., PFENNING, A. L., GULLY, N. J. & ZILM, P. S. 1991. Factors affecting peptide catabolism by oral streptococci. Oral Microbiol. Immunol., **6**: 72-75.

RUTHERFORD, G. C., MA, Y. & MARQUIS, R. E. 1998. Inhibition of the arginine deiminase system of oral streptococci by weak acids and parabens. Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology, Abstr. K204.

SAIER, M. H., CHAUVAUX, S., DEUTSCHER, J., REIZER, J. & YE, J. J. 1995. Protein phosphorylation and regulation of carbon metabolism in Gram-negative versus Gram-positive bacteria. Trends Biochem. Sci., **20** : 267 - 271.

SALAKO, N. O. & KLEINBERG, I. 1989. Incidence of selected ureolytic bacteria in human dental plaque from sites with differing salivary access. Arch. Oral Biol., **34**: 787-791.

SAMARANAYAKE, L. P. 2002 a. Normal oral flora, the oral ecosystem and dental plaque. In: SAMARANAYAKE, L. P. Essential Microbiology for Dentistry. Churchill Livingstone, Edinburg, p. 207-216.

SAMARANAYAKE, L. P. 2002 b. Microbiology of dental caries. In: SAMARANAYAKE, L. P. Essential Microbiology for Dentistry. Churchill Livingstone, Edinburg, p. 217-223.

SCHACHTELE, C. F. & JENSEN, M. E. 1982. Comparison of methods for monitoring changes in the pH of human dental plaque. J. Dent. Res., **61** : 1117 - 1125.

SHENG, J. & MARQUIS, R. E. 2006. Enhanced acid resistance of oral streptococci at lethal pH values associated with acid-tolerant catabolism and with ATP synthase activity. FEMS Microbiol. Lett., **262**: 93-98.

SHENG, J. & MARQUIS, R. E. 2007. Malolactic fermentation by *Streptococcus mutans*. FEMS Microbiol. Lett., **272**: 196-201.

SHU, M., BROWNGARDT, C. M., CHEN, Y-Y. M. & BURNE, R. A. 2003. Role of urease enzymes in stability of a 10-species oral biofilm consortium cultivated in a constant-depth film fermenter. Infect. Immun., **71**: 7188– 7192.

SHU, M., MOROU-BERMÚDEZ, E., SUÁREZ-PÉREZ, E., RIVERA-MIRANDA, C., BROWNGARDT, C. M., CHEN, Y-Y. M., MAGNUSSON, I. & BURNE, R. A. 2007. The relationship between dental caries status and dental plaque urease activity. Oral Microbiol. Immunol., **22**: 61-66.

- SISSONS, C. H. & HANCOCK, E. M. 1993. Urease activity in *Streptococcus salivarius* at low pH. Arch. Oral Biol., **38** : 507 - 516.
- SISSONS, C. H., HANCOCK, E. M. PERINPANAYAGAM, H. E. R. & CUTRESS, T. W. 1988. The bacteria responsible for ureolysis in artificial dental plaque. Arch. Oral Biol., **33**: 727–733.
- SISSONS, C. H., PERINPANAYAGAM, H. E. R., HANCOCK, E. M. & CUTRESS, T. W. 1990. pH regulation of urease levels in *Streptococcus salivarius*. J. Dent. Res., **69** : 1131 - 1137.
- SMITH, D. J., ANDERSON, J. M., KING, W. F., van HOUTE, J. & TAUBMAN, M. A. 1993. Oral streptococcal colonization of infants. Oral Microbiol. Immunol., **8**: 1-4.
- SOCRANSKY, S. S. & HAFFAJEE, A. D. 2002. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. Periodontol. 2000, **28**: 12-55.
- SOCRANSKY, S. S., HAFFAJEE, A. D., CUGINI, M. A., SMITH, C. & KENT Jr., R. L. 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. J. Clin. Periodontol., **25**: 134-144.
- SOCRANSKY, S. S., HAFFAJEE, A. D., SMITH, C. & DIBART, S. 1991. Relation of counts of microbial species to clinical status at the sampled site. J. Clin. Periodontol., **18**: 766-775.

SOUZA, C. R. D., LIBÉRIO, S. A., GUERRA, R. N. M., MONTEIRO, S., SILVEIRA, E. J. D. & PEREIRA, A. L. A. 2005. Avaliação da condição periodontal de pacientes renais em hemodiálise. Rev. Assoc. Med. Bras., **51**: 42-48.

STEWART, P. S. 2003. Diffusion biofilms. J. Bacteriol., **185**: 1485–1491.

STORZ, G. & IMLAY, J. A. 1999. Oxidative stress. Cur. Opinion Microbiol., **2**: 188 - 194.

STRATFORD, M. & ANSLOW, P. A. 1998. Evidence that sorbic acid does not inhibit yeast as a classic 'weak acid preservative'. Lett. Appl. Microbiol., **27**: 203 - 206.

STURR, M. G. & MARQUIS, R. E. 1990. Inhibition of proton-translocating ATPases of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus casei* by fluoride and aluminum. Arch. Microbiol., **155** : 22 - 27.

TAKAHASHI, N. 2003. Acid-neutralizing activity during amino acid fermentation by *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Fusobacterium nucleatum*. Oral Microbiol. Immunol., **18**: 109-113.

TAKAHASHI, N., SAITO, K., SCHACHTELE, C. F. & YAMADA, T. 1997. Acid tolerance and neutralizing activity of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella*

*intermedia* and *Fusobacterium nucleatum*. Oral Microbiol. Immunol., **12**: 323-328.

TAKAHASHI, N. & SATO, T. 2001. Preferential utilization of dipeptides by *Porphyromonas gingivalis*. J. Dent. Res., **80**: 1425-1429.

TAKAHASHI, N., SATO, T. & YAMADA, T. 2000. Metabolic pathways for cytotoxic end products formation from glutamate- and aspartate-containing peptides by *Porphyromonas gingivalis*. J. Bacteriol., **182**: 4704-4710.

TAKAHASHI, N. & YAMADA, T. 2000. Pathways for amino acids metabolism by *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. Oral Microbiol. Immunol., **15**: 96-102.

ten CATE, J. M. 2001. What dental diseases are we facing in the new millenium: Some aspects of the research agenda. Caries Res., **35 (S1)** : 2 - 5.

ten CATE, J. M. & van LOVEREN, C. 1999. Fluoride mechanisms. Dent. Clin. N. Am., **43** : 713 - 742.

TERLECKYJ, B., WILLETT, N. P. & SHOCKMAN, G. D. 1975. Growth of several cariogenic strains of oral streptococci in a chemically defined medium. Infect. Immun., **11**: 649-655.

TODD, M. J. & HAUSINGER, R. P. 2000. Fluoride inhibition of *Klebsiella aerogenes* urease: mechanistic implications of a pseudo-uncompetitive, slow-binding inhibitor. *Biochemistry*, **39** : 5389 - 5396.

TORRES, S. R., PEIXOTO, B., CALDAS, D. M., SILVA, E. B., AKITI, T., NUCCI, M. & UZEDA, M. 2002. Relationship between salivary flow rates and *Candida* counts in subjects with xerostomia. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, **93**: 149-154.

UEMATSU, H. & HOSHINO, E. 1992. Predominant obligate anaerobes in human periodontal pockets. *J. Periodontol. Res.*, **27**: 15-19.

UEMATSU, H., SATO, N., HOSSAIN, M. Z., IKEDA, T. & HOSHINO, E.. 2003. Degradation of arginine and other amino acids by butyrate-producing asaccharolytic anaerobic Gram-positive rods in periodontal pockets. *Arch. Oral Biol.*, **48**: 423-429.

van der VELDEN, U., van WINKELHOFF, ABBAS, F. & de GRAAFF, J. 1986. The habitat of periodontopathic micro-organisms. *J. Clin. Periodontol.*, **13**: 243-248.

van HOUTE, J. 1994. Role of micro-organisms in caries etiology. *J. Dent. Res.*, **73**: 672 - 681.

van LOVEREN, C. 2001. Antimicrobial activity of fluoride and its in vivo importance: identification of research questions. *Caries Res.*, **35 (S1)** : 65 - 70.

van WUYCKHUYSE, B. C., PERINPANAYAGAM, H. E. R., BEVACQUA, D., RAUBERTAS, R. F., BILLINGS, R. J., BOWEN, W. H. & TABAK, L. A. 1995. Association of free arginine and lysine concentrations in humans parotid saliva with caries experience. *J. Dent. Res.*, **74** : 686 - 690.

VOGEL, G. L., MAO, Y. CHOW, L. C. & PROSKIN, H. M. 2000. Fluoride in plaque fluid, plaque and saliva measured for 2 hours after a sodium fluoride monofluorophosphate rinse. *Caries Res.*, **34** : 404 - 411.

WHITFORD, G. M., SHUSTER, G. S., PASHLEY, D. H. & VENKATESWARLU, P. 1977. Fluoride uptake by *Streptococcus mutans* 6715. *Infect. Immun.*, **18**: 680–687.

WIJEYEWEERA, R.L. & KLEINBERG, I. 1989. Arginolytic and ureolytic activities of pure cultures of human oral bacteria and their effects on the pH response of salivary sediment and dental plaque in vitro. *Arch. Oral Biol.*, **34**: 43–53.

WILSON, M. 1999. Use of constant depth fermentor on studies of biofilms of oral bacteria. *Meth. Enzymol.*, **310**: 264 - 278.

WINTELER, H. V., SCHNEIDINGER, B., JAEGER, K-E. & HAAS, D. 1996. Anaerobically controlled expression system derived from the *arcDABC* operon of *Pseudomonas aeruginosa*: application to lipase production. Appl. Environ. Microbiol., **62**: 3391–3398.

WONG, L., SISSONS, C. H. PEARCE, E. I. F. & CUTRESS, T. W. 2002. Calcium phosphate deposition in human dental plaque microcosm biofilms induced by a ureolytic pH-rise procedure. Arch. Oral Biol., **47**: 779 - 790.

XIMÉNEZ-FYVIE, L. A. HAFFAJEE, A. D. & SOCRANSKY, S. S. 2000. Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. J. Clin. Periodontol., **27**: 722-732.

YALING, L., TAO, H., JINGYI, Z. & XUEDONG, Z. 2006. Characterization of the *Actinomyces naeslundii* ureolysis and its role in bacterial aciduricity and capacity to modulate pH homeostasis. Microbiol. Res., **161**: 304-310.

YAMASHITA, Y., BOWEN, W. H., BURNE, R. A. & KURAMITSU, H. K. 1993. Role of the *Streptococcus mutans* *gtf* genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. Infect. Immun., **61**: 3811-3817.

[YAZDANKHAH, S. P.](#), [SCHEIE, A. A.](#), [HOIBY, E. A.](#), [LUNESTAD, B. T.](#), [HEIR, E.](#), [FOTLAND, T. O.](#), [NATERSTAD, K.](#) & [KRUSE, H.](#) 2006. Triclosan and antimicrobial resistance in bacteria: an overview. Microb. Drug Resist., **12**: 83-90.

## **ANEXOS**

## ANEXO I

### Artigo 1

Mechanisms of inhibition by fluoride of urease activities of cellsuspensions  
and biofilms of *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus salivarius*,  
*Actinomyces naeslundii* and of dental plaque

BARBOZA-SILVA, E., CASTRO, A. C. D. & MARQUIS, R. E.

Artigo publicado na *Oral Microbiology and Immunology* 20: 323-332, 2005





















## **ANEXO II**

### **Artigo 2**

Fluoride, triclosan and organic weak acids as modulators of the arginine deiminase system in biofilms and suspension cells of oral streptococci

BARBOZA-SILVA, E., CASTRO, A. C. D. & MARQUIS, R. E.

Artigo submetido à *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2007

**Fluoride, triclosan and organic weak acids as modulators of the arginine deiminase system in biofilms and suspension cells of oral streptococci**

E. Barboza-Silva<sup>1,2</sup>, A. C. D. Castro<sup>2</sup>, R. E. Marquis<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology & Immunology, University of Rochester Medical Center, Rochester, NY, USA; <sup>2</sup>Institute of Microbiology, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Running title: Inhibition of arginine deiminase

\*R. E. Marquis, Box 672, University of Rochester Medical Center, Rochester, NY 14642-8672, USA

Tel.: +1 585 275 1674

Fax: +1 585 473 8973

### **Abstract**

The arginine deiminase system (ADS) is a major ammonia producer in dental plaque. Our objective was to determine the sensitivity of the ADS to the commonly used antimicrobials, fluoride, triclosan and organic weak acids. *Streptococcus sanguis* NCTC 10904 and *S. rattus* FA-1 were grown in suspension cultures and fed-batch, mono-organism biofilms. ADS activity was assessed at pH values of 4, 5 and 6, and the actions of the agents determined in terms of reduced production of ammonia from arginine, inhibition of ADS enzymes in cell extracts and changes in uptake of labeled arginine. ADS activity was not greatly affected by pH changes between 4 and 6 and was greater per unit of biomass for cell suspensions than biofilms. NaF was only a poor inhibitor of the ADS, while triclosan was highly effective with ID<sub>50</sub> values for the two organisms in the range of 0.03 to 0.05 and 0.10 to 0.15 mM-h for suspension cells and biofilms, respectively. The weak acid indomethacin was nearly as potent at pH 4.0 as triclosan, while capric and lauric acids were somewhat less potent, especially for biofilms. The methyl-ester of lauric acid was somewhat stimulatory. Potency of triclosan was not much affected by pH change, while potencies of the organic weak acids were greater at lower pH values. The major targets for the inhibitors appeared to be transport systems

for arginine uptake, although carbamate kinase was a secondary target. The conclusion is that triclosan, indomethacin, caprate and laurate can limit ADS activity in dental plaque.

## Introduction

The ability of oral biofilms to produce alkali in the challenging environment of the mouth is thought to be important for neutralizing acids produced during sugar catabolism and for preventing the emergence of a highly cariogenic microbiota (5). Thus, alkali production may act to prevent caries directly and also through long-term effects on the microbial ecology of dental plaque. On the other hand, alkali production may also have adverse effects on the host by enhancing calculus formation or by allowing growth of pathogens for gingivitis and periodontal. Thus, there may be value in developing inhibitory agents that allow for control of alkali production depending on circumstances.

The major microbial systems in the mouth for alkali production through ammonia production are the arginine deiminase system (ADS) and urease. The agmatine deiminase system of *S. mutans* is also active but seems to function primarily for detoxifying a growth-inhibitory factor, agmatine (17). In addition, the results of recent studies (33) have shown that many oral, lactic-acid bacteria have the capacity to carry out malolactic fermentation, which results in net production of alkali through decarboxylation of L-malate, a common component of the human diet.

We previously studied the effects of fluoride and organic weak acids on urease activities of the oral bacteria *Actinomyces naeslundii* and *Streptococcus salivarius*, as well as *Staphylococcus epidermidis* (1). Fluoride was found to be a highly effective inhibitor with two actions - as a direct inhibitor of urease enzyme and also as a transmembrane proton conductor to diminish  $\Delta\text{pH}$  across the cell membrane with resultant inhibitory effects on urease due to cytoplasmic acidification. In the work described here, we extend this study to investigations of inhibition of ammonia production by the ADS of *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus rattus*. The three-enzyme, ADS pathway initially converts arginine to citrulline and ammonia catalyzed by arginine deiminase (AD). The citrulline thus generated is acted on by a catabolic ornithine carbamyltransferase (cOTC) in the presence of inorganic phosphate to produce ornithine and carbamylphosphate. Carbamate kinase (CK) then catalyzes cleavage of carbamylphosphate to ammonia and  $\text{CO}_2$ , with donation of the phosphate to ADP to produce ATP (5). The three enzymes are encoded, respectively, by *arcA*, *arcB* and *arcC* (7, 18) and are not inhibited directly by fluoride except at extremely high concentrations (8). Arginine can enter oral streptococcal cells through an arginine-ornithine antiporter (30). Ornithine, the end product of the system is the substrate for the antiporter, which catalyses arginine-ornithine exchange in a 1-to-1 ratio. The major driving forces for arginine uptake appear to be the ornithine and arginine concentration gradients formed during arginine catabolism (14).

NH<sub>3</sub> produced in the cytoplasm by the ADS reacts with a proton to form NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, which effectively neutralizes the proton and raises the pH of the cytoplasm. Decarboxylation also results in alkalization because a carboxyl group with a net negative charge and a pK<sub>a</sub> value of 1.82 is converted to CO<sub>2</sub>, which may react with water to form carbonic acid but may also diffuse away into the atmosphere in an open system. Alkalinization of the cytoplasm would act to increase Δ pH across the cell membrane, and the resultant influx of protons through the F-ATPase of cells in acidified environments could result in ATP synthesis, as recently shown (32). In addition, the carbamate-kinase reaction results in substrate-level synthesis of ATP, which can then be used to extrude protons from the cell.

The ADS has been identified in a wide variety of bacteria, both eubacteria and archaeobacteria, including *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus* spp., mycoplasmas, halobacteria, lactic-acid bacteria and oral bacteria (11). The prominent, ADS-positive, oral bacteria are *Streptococcus sanguis* (*sanguinis*), *Streptococcus rattus*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus parasanguis*, *Streptococcus anginosus*, as well as some lactobacilli and spirochetes. Also, organisms, such as *Porphyromonas gingivalis*, involved in periodontal diseases produce an arginine deiminase enzyme that catalyzes deimination of the guanidino group of carboxyl terminal arginine residues of intact peptides or proteins (25). In addition, Uematsu et al. (35) recently showed that some asaccharolytic anaerobic Gram-positive rods, specifically *Eubacterium minutum* and *E. nodatum*, involved in the pathology of periodontal diseases, are ADS-positive and that ornithine

produced by the ADS can be a substrate for butanol production, which may then induce tissue inflammation. Mutations affecting the arginine deiminase system of *S. gordonii* were found to be linked to penicillin tolerance (9), although the link is actually through CcpA, the carbon catabolite determinant (3). For *S. gordonii*, an Fnr-like protein (Flp) is required for optimal expression of the ADS operon and for anaerobic induction (13).

ADS-positive bacteria in the mouth can utilize free arginine in the host diet or that secreted in saliva at concentrations averaging about 50 $\mu$ M. In addition argininy residues in salivary peptides and proteins can be released through the actions of bacterial or host peptidases and proteases. van Wuyckhuysse et al. (36) found that levels of arginine and lysine or peptides containing these amino acids in parotid saliva of caries-resistant adults were significantly higher than those of adults with a history of dental caries. In other words, there appeared to be an inverse correlation between levels of these basic amino acids in parotid saliva and caries. Rogers et al. (31) have defined the factors important for peptide catabolism by oral streptococci and the potential for release of arginine from peptides.

The ADS also plays a role in the acid resistance of oral lactic-acid bacteria (10). The presence of this system, especially in less acid-resistant, oral streptococci, appears to enhance survival in highly acidified plaque containing aciduric, acidogenic, cariogenic bacteria (4). The ADS in lactic-acid bacteria is active at lower pH values than the minimum for glycolysis, and well below the minimum for growth. This acid tolerance allows ADS-positive organisms to

reverse lethal acidification through arginolysis, when arginine is present, and acid tolerance of the ADS was related, at least in part, to acid tolerance of individual enzymes of the system (10).

The ADS in bacteria, including oral streptococci, is very highly regulated (12, 16). It is induced by arginine and is subject to carbon catabolite repression by glucose. Also, the level to which this system can be induced reflects its importance. The activity of the system can be increased by arginine addition to some 1,467-fold in *S. sanguis*, 48-fold in *S. rattus* and over 300-fold in *S. gordonii*, compared with uninduced/repressed cells

In this study, we consider effects of antimicrobial agents used in oral care products on activity of the system in two ADS-positive oral streptococci, *S. sanguis* and *S. rattus*. These agents could potentially have important actions in vivo on alkali production from arginine and may be useful for controlling alkali production in the mouth. *S. sanguis* was chosen because it is one of the most common ADS-positive streptococci in the human mouth, and *S. rattus* was chosen because of its acid tolerance, its high capacity to catabolize arginine via the ADS and because it has been associated with dental caries in humans in some parts of the world. Biofilms as well as cells in suspensions were used for the study because the biofilm state of plaque may affect ADS activity and also modify the potencies of oral antimicrobials.

## Materials and Methods

**Bacteria.** *Streptococcus sanguis (sanguinis)* NCTC 10904 and *Streptococcus rattus* FA-1 are maintained routinely in our laboratory by weekly culture on tryptic-soy agar plates (Difco Laboratories, Detroit, MI) and stored as stock suspensions at -70°C in 50% (v/v) aqueous glycerol solution.

**Suspension Cells and Cell Extracts.** *The bacteria were grown in suspension cultures in TY medium containing 3% (w/v) tryptone (Difco) and 0.5% (w/v) yeast extract (Difco) supplemented with 1% arginine (w/v) and 0.1% glucose (w/v). They were harvested during the late exponential phase of growth by means of centrifugation in the cold for 15 min at 6,362 x g. The harvested cells were used intact for assays of titratable base production from arginine and substrate uptake, or for preparation of cells extracts used in assays of ADS enzymes. Cell extracts were obtained as described previously (1), by disrupting cells in a Mini-BeadBeater-8 homogenizer (BioSpec Products, Inc., Bartlesville, OK). Cells for preparation of extracts were harvested from cultures by centrifugation at 4°C were washed with and resuspended in 50 mM KCl and 1 mM MgCl<sub>2</sub> (salt solution), The cells were sonicated for 15 two-minute cycles and put in ice for 2 min during intervals.*

*Phase-contrast microscopy was used to check that disruption of cells was complete. The extracts were separated from debris by centrifugation of 10 min at 16,110 X g in a micrcentrifuge.*

**Biofilms.** Biofilms were grown on standard glass microscope slides in fed-batch cultures as described by Phan et al. (28) and Nguyen et al. (26). The biofilms were formed in multislide culture boxes containing TY medium supplemented with 1% (w/v) sucrose and harvested after 5 days of growth. The day before the biofilms were used, they were transferred to TY medium supplemented with 1% arginine (w/v) and 0.1% glucose (w/v) to allow for induction/derepression of the ADS.

Biofilms were dispersed to produce cell suspensions, as described by Burne and Marquis (6). Mature, intact biofilms were washed by immersion in standard salt solution (50 mM KCl plus 1 mM MgCl<sub>2</sub>) and the biofilm mass was then scraped from the slides with a sterile spatula into the same solution. The biofilms were homogenized using a IKA Labortechnik T25 basic homogenizer (Janke & Kunkel GmbH and Co., Staufen, Germany) for 5 seconds and then sonicated using a Branson Sonifier Cell Disruptor 200 (Branson Sonic Power, Danbury, CT) for 20 s on ice. The suspensions were observed with phase-contrast microscopy to check for disruption and separation of individual cells. There was no indication of damage to individual cells evidenced by changes in phase darkness.

**Dental plaque.** Supragingival plaque was collected from all available tooth surfaces in the mouths of two volunteers (authors) as described previously (1). The subjects did not brush their teeth after breakfast on the collection morning, and collection was undertaken some three hours after breakfast. Harvested plaque was pooled into standard salt solution to give sufficient material for multiple samples in a single experiment and was vortexed to break up clumps.

**Measurement of titratable base production.** ADS activity was determined by measurement of base production by cells in response to added of excess (47mM) arginine. For assays with intact cells, centrifuged pellets were washed and resuspended in salt solution to yield a suspension with a cell density of 3 mg of cells dry weight/ml. For biofilm assays, each slide with intact biofilm was washed rapidly by immersion in salt solution and then kept moist until use for assay. Base production by dispersed biofilms was assayed in the same way as cell suspensions. For dental plaque samples, freshly harvested plaque was dispersed by vortexing in salt solution to yield suspensions with 0.3 mg plaque dry weight per ml.

Production of titratable base was determined by maintaining the suspensions or biofilms at near constant pH values (measured with a pH meter and glass electrode) of 4.0, 5.0 and 6.0 by addition of measured volumes of 0.1, 0.5, 1.0 or 5.0 M HCl. The titratable base was then considered to be equal to the equivalent amounts of HCl added to maintain constant pH.

Prior to the addition of arginine, test suspensions or biofilms were incubated for 5 min with the agents to be tested (sodium fluoride, triclosan, indomethacin, capric acid, lauric acid and lauric acid methyl ester) at the desired concentrations. Control suspensions or biofilms, except for those exposed to fluoride, contained 1% (v/v) ethanol because stock solutions of the other test agents had to be prepared with ethanol. This level of ethanol is not inhibitory for the ADS.

Cell and biofilm dry weights were assessed following procedures described by Belli and Marquis (2).

**Arginine uptake assay.** Uptake of uniformly labeled [<sup>14</sup>C]arginine (Amersham, Piscataway, NJ) was assessed by means of a standard procedure that involves centrifugation of samples taken from suspensions through silicon oil in a microcentrifuge, as described initially by Hurwitz et al. (19). Thus, cells were separated rapidly from their suspending medium by passage through the silicon oil, which is not miscible with the extracellular, suspending fluid. Pellets were then resuspended in Ecoscint A fluid (National Diagnostics, Atlanta, GA) for  $\beta$ -counting.

For the uptake assays, pellets of intact suspension cells were washed in salt solution and then resuspended in 50 mM sodium citrate buffer pH 4, 5 or 6 to yield a concentration of 3 mg of cell dry weight/ml. Uptake assays were carried out with an initial arginine concentration of 47 mM so that the uptake systems were substrate saturated.

**Enzyme assays.** AD and OTC activities were assessed in terms of ammonia production from arginine or carbamyl arsenate, respectively. For AD assay, the reaction involves catabolism of arginine to yield citrulline and ammonia. Cell extracts were suspended in 50 mM Tris-maleate buffer pH 6.0 (30% v/v) and 47 mM arginine was added as substrate. The assay was carried out at 37°C, and samples were taken at intervals. The reaction was stopped by addition of 10% trichloroacetic acid (TCA). Ammonia production was measured with the Roche/R-Biopharm Ammonia Kit (Darmstadt, Germany) based on reductive amination of 2-ketoglutarate to glutamate catalyzed by glutamate dehydrogenase in the presence of NADPH. The decrease in absorbance of light associated with the oxidation of NADPH was measured at 340 nm.

For OTC assay, ammonia produced by cell extracts was again measured with the Roche/R-Biopharm Ammonia Kit. The method involves reaction of citrulline plus arsenate, an analog of inorganic phosphate, in the presence of ornithine carbamyltransferase to yield ornithine and carbamylarsenate. The carbamylarsenate then degrades spontaneously to arsenate, CO<sub>2</sub> and ammonia, as described by Ferro et al. (16). Cell extracts were suspended in 0.5 M sodium arsenate buffer pH 7.0 (5% v/v), and 0.1 M citrulline was added as substrate. The assay was carried out at 37°C and the reaction was stopped by addition of 10% TCA to the samples.

CK activity was assessed in terms of ATP production as described by Koo et al. (20). The ATP formed was measured using the Enliten®

rLuciferase/Luciferin Reagent (Promega Corporation, Madison, WI). Cell extracts were suspended in 70 mM sodium citrate buffer pH 6.0 in a reaction mixture containing 40 mM ADP, 40 mM MgCl<sub>2</sub> and 60 mM carbamylphosphate as substrate. The assay was carried out at 37°C and the reaction was stopped by adding samples to boiling buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.75 containing 2 mM EDTA) for 1.5 min. Then, the buffered samples were chilled immediately in ice for at least 20 min before measuring the ATP formed.

Protein assays were performed as described by Lowry et al. (21).

## Results

### **Effects of acidification on the ADS of suspension cells and biofilms.**

Arginine deiminase activity of intact cells of *S. sanguis* NCTC 10904 and *S. rattus* FA-1 was affected only moderately by acidification in a range normal for dental plaque from pH 4 to 6 (Table 1). ADS activity of *S. rattus* was greater than that of *S. sanguis* cells, even at pH 5.0, the optimal pH for ammonia production by *S. sanguis* in our experiments. ADS activity of both organisms was significantly lower in biofilms than in cell suspensions, possibly because of diffusion limitations of biofilms. However, dispersal of the biofilms with homogenization and sonication (6) enhanced arginolysis at higher pH values, a result suggestive of diffusion limitation, but not at lower pH values, a result

suggestive of increased acid sensitization due to dispersal. The biofilm cells could possibly have been damaged in processing, but the dispersed cells did appear phase-dark when viewed with a phase microscope, so any damage that may have occurred was not gross damage. Overall, the data do indicate that arginolysis by biofilms occurs over the pH range studied, and that production of ammonia, CO<sub>2</sub> and ATP from arginolysis should occur in cariogenic plaque biofilms, at least in the absence of antimicrobials.

**Effects of anti-plaque/anti-caries agents on the ADS.** Antimicrobials are used extensively to control oral diseases. Among the agents most commonly in oral care products are weak acids, especially fluoride, and triclosan or zinc. Also, humans regularly ingest organic weak acids used as food preservatives or those such as indomethacin, used as anti-inflammatory agents. Previously, we found that zinc is inhibitory for ammonia production from arginine by *S. rattus* or from urea by *S. salivarius* and is a potent inhibitor of the enzymes arginine deiminase and urease (29). Butyl paraben, often used as a preservative in cosmetics and some oral care products, also was found (22) to be a potent inhibitor of arginolysis by *S. rattus* and was inhibitory for arginine uptake as well as for the arginine deiminase enzyme. The data presented in Fig. 1 show that triclosan also was an effective inhibitor of ammonia production from arginine at pH 4.0 by induced/derepressed, suspension cells of *S. sanguis* (Fig. 1A) or *S. rattus* (Fig. 1D) or for biofilms of the organisms (Fig. 1B, 1E) or dispersed biofilms (Fig. 1C, 1F). Control values for the individual agents varied because separate cultures had to be used for each testing of each agent because of the amount of analytical work for each

testing. However, it seemed better here to present the primary data rather than data for ammonia production in terms of % of control activity. Triclosan was about six times more effective at pH 4.0 against *S. sanguis* cells in suspensions than against intact biofilms (Fig. 1A, 1B) with estimated ID<sub>50</sub> (50% inhibitory dose) values of ca. 0.05 mM-h and 0.30 mM-h, respectively with exposure to the agent for 1.5 h for suspensions and 3.0 h for biofilms. Dose here is defined as mM concentration multiplied by time of exposure in hours. Dispersal of the biofilms led to greater sensitivity to the agents (Fig. 1C, 1F) indicating that the resistance of biofilm cells was due mainly to the biofilms state and not to physiological resistance of the cells. Similar ID<sub>50</sub> values were estimated for triclosan inhibition of the ADS of *S. rattus* (Fig. 1D, 1E, 1F). These values for triclosan inhibition of the ADS can be compared to ID<sub>50</sub> values of 0.06 mM-h and 0.10 mM-h for inhibition of glycolysis by cells in suspensions and biofilms, respectively (data not shown). They are close to bactericidal levels of triclosan for *S. sanguis* in suspensions with D values (time to kill 90% of the initial population) of 13 min for 0.5 mM triclosan or 30 min for 0.05 mM triclosan. For biofilms, D values were 45 min with 1.0 mM, and no killing occurred during an hour exposure to 0.1 mM triclosan (data not shown).

The organic weak acid indomethacin was only slightly less effective than triclosan as an inhibitor of arginolysis at pH 4.0 with ID<sub>50</sub> values of ca. 0.08 and 0.60 mM-h against suspension cells and biofilms, respectively, for both the organisms. Again, the increased resistance of the biofilms compared with suspension cells was reduced when the films were dispersed. Capric and

lauric acids were less effective, especially against biofilms, with ID<sub>50</sub> values of ca. 0.23 mM-h for both acids against suspension cells of *S. sanguis* and 0.11 mM-h against *S. rattus*. ID<sub>50</sub> values were somewhat greater than 3.0 mM-h against biofilms of either organism for caprate or laurate. The methyl ester of lauric acid was not inhibitory, and in fact, was actually stimulatory for the ADS at pH 4.0 for suspensions or biofilms of *S. sanguis*. The inorganic weak acid fluoride had relatively low potency for inhibiting the ADS of intact suspension cells (ID<sub>50</sub> = ca. 0.8 mM-h) of either organism, especially in relation to plaque concentrations of the agent of ca. 0.1 to 0.5 mM (15, 37). Fluoride was much less effective against biofilms (Fig. 1B, 1E). Again, dispersing the biofilms led to increased sensitivity. This low activity of fluoride against the ADS is in contrast to our findings with oral streptococci of major fluoride inhibition of glycolysis at pH 4.0 for suspension cells exposed to micromolar levels of the agent (23) and for biofilms (unpublished data).

Triclosan inhibition was relatively insensitive to changes in pH, and 1.5 mM-h triclosan was more than 95% inhibitory for arginolysis by suspension cells of either organism at pH values of 4, 5, or 6 (Table 2 and Fig. 1). In contrast, 1.5 mM-h indomethacin, for example, was not inhibitory at pH 6, but ca. 85% inhibitory at pH 5 and 92% inhibitory at pH 4.0 for arginolysis by suspension cells of *S. rattus*. A similar pattern of inhibition was found for *S. sanguis* and also for capric capric against the two bacteria. Thus, the actions of the weak acids appeared to be dependent primarily on their weak-acid properties. Any increase in other actions of the acids, e. g., inhibition of cytoplasmic enzymes,

would be affected by enhanced uptake of the protonated forms of the weak acids into cells at lower pH values, close to  $pK_a$  values (24).

**Inhibition of ADS enzymes.** The results of previous studies (8) indicated that the enzymes of the ADS are not inhibited by fluoride except at extremely high concentrations, higher than 1.0 to 10 mM. Data obtained in this study indicate that the arginine deiminase enzyme in cell extracts of *S. sanguis* or *S. rattus* was not affected by triclosan, indomethacin, capric acid, lauric acid or the methyl ester of lauric acid at 1.0 mM levels (data not shown). In addition, the inhibitors were without significant effect on ornithine carbamyl transferase in cell extracts of either bacterium (data not shown). However, as shown by the data in Fig. 2 carbamate kinase in cell extracts of *S. sanguis* was inhibited by triclosan and indomethacin. Triclosan was the more potent with an  $ID_{50}$  value of about 0.6 mM-h. Similar data were obtained for *S. rattus* with an estimated  $ID_{50}$  of ca. 0.3 mM-h (data not shown). Indomethacin was less potent with an  $ID_{50}$  value somewhat greater than 1.5 mM-h, while capric acid and lauric acid were not effective inhibitors of the enzyme, at least not at a dose of 1.5 mM-h. The methyl ester of lauric acid was somewhat stimulatory. Inhibition of carbamate kinase in intact cells would result in only partial inhibition of  $NH_3$  production because ammonia is produced initially in the irreversible reaction catalyzed by arginine deiminase. However, the enzyme inhibition data for carbamate kinase do indicate a cytoplasmic target for ADS inhibition but offer only a partial explanation at best for the actions of triclosan and indomethacin on intact cells.

Other possible targets for the agents are the systems for uptake of arginine. A major ADS mode for arginine uptake is via the arginine/ornithine antiporter or ArcD (14, 18), although oral streptococci also have energy-coupled permeases for uptake of arginine, which is an essential amino acid for mutants streptococci (34). The sample data for *S. rattus* presented in Fig. 3 show that arginine uptake was highly sensitive to inhibition at pH 4.0 by triclosan and lauric or capric acids, but not by fluoride or the methyl ester of lauric acid. The pattern of inhibition of intact suspension cells at pH 4.0 was characterized by an initial rapid uptake of arginine from the saturating 47 mM solution containing uniformly labeled [<sup>14</sup>C] L-arginine. Then subsequent uptake was stopped almost completely by triclosan, capric acid or lauric acid, at a level of 0.2 or 1.0 mM, but not by fluoride or the methyl ester of lauric acid. Indomethacin had approximately the same potency as triclosan (data not shown). The initial uptake insensitive to the agents may have involved exchange through the arginine/ornithine antiporter, and there may also have been passive binding of cationic arginine. Presumably, the inhibitor-sensitive component of uptake depends on membrane energization by action of the F-ATPase and development of  $\Delta p$ , the transmembrane proton motive force and production of ATP.

For suspension cells at a higher pH value of 6.0 in the same type of experiment (Fig. 4), triclosan remained highly potent as an inhibitor, while capric acid was no longer effective. Lauric acid retained some potency but only at the 1.0 mM level. Fluoride (data not shown) and the methyl ester of lauric acid remained without effect. Similar data were obtained for *S. sanguis*

(data not shown). The indication is clear that arginine uptake at pH 4 above the base level was inhibited by the same agents that inhibit ammonia production from arginine via the ADS and that the organic weak acids had diminished potency when the pH value was increased to 6.0.

**Inhibition of ammonia production from arginine by dental plaque of humans.** As shown by the data of Fig. 5, 1.0 mM added fluoride was nearly 50% inhibitory for arginolysis at pH 4.0 but essentially without effect at pH 6.0 and very marginally inhibitory at pH 5.0. Triclosan was inhibitory at all three pH values but somewhat more at pH 4.0. The organic weak acids indomethacin, caprate and laurate, like fluoride, were inhibitory in a pH-dependent manner suggesting that the protonated forms of the acids were the effective species for inhibition. Again, the methyl ester of lauric acid was, especially at pH 4.0, somewhat stimulatory for arginolysis.

## Discussion

For the inhibitors tested in this study, the cell membrane appears to be a major site for inhibition of the arginine deiminase system with the cytoplasmic enzyme carbamate kinase as a secondary site for triclosan and indomethacin. Approximately half of total arginine uptake by cells of both organisms was insensitive to the inhibitors during initial exposure, while the other part was highly sensitive. A major, well-characterized uptake system for bringing arginine across the cell membrane of streptococci during arginine catabolism is the arginine/ornithine antiporter, which is energized by the concentration

gradients across the membrane of arginine and ornithine (14). Antiport uptake of arginine requires that ornithine be produced in the cytoplasm so that a concentration gradient builds up with the cytoplasmic level higher than that in the environment. Inhibitors of the ADS of intact cells were found not to affect the enzymes, AD and OTC, involved in cytoplasmic production of ornithine. Therefore the agents would not be expected to inhibit initial antiport if the cells had pools of cytoplasmic ornithine from previous arginine metabolism. However, antiport requiring new synthesis of ornithine would be inhibited. A major physiological effect of organic weak acids is to discharge  $\Delta\text{pH}$  across the cell membrane (24), and the finding that organic weak acids inhibit arginine uptake in a pH-dependent manner indicates that  $\Delta\text{pH}$  across the cell membrane is connected to the inhibitor-sensitive uptake of arginine. It seems then that arginine uptake above a base level is connected to  $\Delta\text{pH}$  and  $\Delta\mu$ , across the cell membrane, and it is this  $\Delta\text{pH}$ -associated uptake that appears to be a main target for the inhibitors.

It is somewhat surprising that fluoride is not a very potent inhibitor of the ADS in suspension cells or biofilms especially since it is a highly effective agent for dissipating  $\Delta\text{pH}$  across the cell membrane and readily penetrates biofilms because of its small size (24). Fluoride could be an effective inhibitor but just not at levels normally found in dental plaque. Certainly, fluoride is highly effective for inhibiting glycolysis of suspension cells or biofilms in a pH-dependent manner (23). The finding that fluoride is not a major inhibitor of the arginine deiminase system in intact cells or biofilms may be of value in terms of possible uses of arginine or arginine peptides as anti-caries agents in oral

care products containing fluoride. The finding that fluoride was more effective in inhibiting NH<sub>3</sub> production from arginine by freshly harvested dental plaque than in laboratory cultures is likely due to residual fluoride in the freshly harvested plaque, especially since the volunteers were in an area with fluoridated water and both use fluoride toothpastes.

Triclosan was clearly inhibitory for the ADS in plaque, and this inhibitory action suggests that formulations with both triclosan and arginine or arginine peptides may not be more effective for reducing caries than formulations with only triclosan. The inhibitory actions of triclosan were not greatly affected by changes in pH. Triclosan has a variety of inhibitory actions on oral streptococci (27), including inhibition of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system (PTS) and of cytoplasmic enzymes for glycolysis, notably pyruvate kinase and lactic dehydrogenase. We found in this study that it is also a potent inhibitor of carbamate kinase. In oral streptococci, triclosan does not inhibit the enoyl-ACP reductase involved in synthesis of unsaturated fatty acids, as it does for organisms such as *Escherichia coli* or *Pseudomonas aeruginosa*, because the streptococcal enzyme has inherent resistance to triclosan. The biofilms we used had enhanced resistance to triclosan, compared with suspension cells, probably because of the greater biomass density of biofilms. Similar resistance of biofilms to triclosan has been found (27) previously for glycolysis by *S. mutans*.

The organic weak acids tested showed significant potency as ADS inhibitors against cells in suspensions but were less effective against biofilms. The pH

dependence of ADS inhibition by the acids indicated that inhibition was related main to their weak-acid actions, although there was some indication that there may have been other actions specific for the particular acids used. The finding that the methyl ester of lauric acid was not inhibitory supports the view that an ionizable carboxyl group is needed for the inhibitory actions described here.

The results of preliminary studies with plaque from human volunteers suggests that the inhibitory effects assessed with cells of oral streptococci in vitro may occur also in situ in the mouth. The agents are likely to be more effective against bacteria in saliva than those in plaque, but with repeated exposures to oral care agents would become more effective in plaque. Most of our orientation in studying inhibitor actions of antimicrobial agents has been to dental caries. However, if the objective were to reduce calculus formation, ADS inhibitors would possibly have useful actions in terms of oral health. In addition, there may be value in inhibiting ADS activities of bacteria involved in periodontal diseases. Inhibition of citrulline synthesis might also reduce production of biogenic amines or carcinogens derived of catabolism of the amino acid. There are also other systemic pathogenic effects due to the ADS, especially the variant active on peptides with deimination of terminal arginyl residues, which could possibly be reduced by the inhibitors tested in our work. Organic weak acids (in acidified plaque), triclosan or other inhibitors of the ADS may then be desirable agents for reducing alkalinization rather than enhancing it. This topic clearly needs more research to obtain a fuller picture of how ADS of oral bacteria can be controlled to affect it actions on the host.

## Acknowledgments

This study was supported by award R01 DE06127 from the National Institute of Dental and Craniofacial Research of the U. S. Public Health Service.

## References

1. **Barboza-Silva, E., A. C. D. Castro, and R. E. Marquis.** 2005. Mechanisms of inhibition by fluoride of urease activities of cell suspensions and biofilms of *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus salivarius*, *Actinomyces naeslundii* and of dental plaque. *Oral Microbiol. Immunol.* **20**: 323-332.
2. **Belli, W. A., and R. E. Marquis.** 1991. Adaptation of *Streptococcus mutans* and *Enterococcus hirae* to acid stress in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1134-1138.
3. **Bizzini, A., J. M. Entenza, and P. Moreillon.** 2007. Loss of penicillin tolerance by inactivating the carbon catabolite repression determinant CcpA in *Streptococcus gordonii*. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**:607-615.

4. **Burne, R. A.** 1998. Oral streptococci... products of their environment. *J. Dent. Res.* **77**:445-52.
5. **Burne, R. A., and R. E. Marquis.** 2000. Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. *FEMS Microbiol. Lett.* **193**: 1-6.
6. **Burne, R. A., and R. E. Marquis.** 2001. Biofilm acid/base physiology and gene expression in oral bacteria. *Methods Enzymol.* **337**: 403-415.
7. **Burne, R. A., D. T. Parsons, and R. E. Marquis.** 1989. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the genes of the arginine deiminase system of *Streptococcus sanguis*. *Infect. Immun.* **57**: 3540-3548.
8. **Burne, R. A., D. T. Parsons, and R. E. Marquis.** 1991. Environmental variables affecting arginine deiminase expression in oral streptococci, p. 276-280. *In* G. M. Dunny, P. P. Cleary, and L. L. McKay (ed.), *Genetics and molecular biology of streptococci, lactococci, and enterococci*. ASM Press, Washington, DC.
9. **Caldelari, I., B. Loeliger, H. Langen, M. P. Glauser, and P. Moreillon.** 2000. Deregulation of the arginine deiminase (*arc*) operon in penicillin-tolerant mutants of *Streptococcus gordonii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 2802-2810.

10. **Casiano-Colón, A., and R. E. Marquis.** 1988. Role of the arginine deiminase system in protecting oral bacteria and an enzymatic basis for acid tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1318-1324.
11. **Cunin, R., N. Glansdorff, A. Pierard, and V. Stalon.** 1986. Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiol. Rev.* **50**: 314-352.
12. **Curran, T. M., Y. Ma, G. C. Rutherford, and R. E. Marquis.** 1998. Turning on and turning off the arginine deiminase system in oral streptococci. *Can. J. Microbiol.* **44**: 1078-1085.
13. **Dong, Y., Y-YM. Chen, and R. A. Burne.** 2004. Control of expression of the arginine deiminase operon of *S. gordonii* by CcpA and Flp. *J. Bacteriol.* **186**: 2511-2514.
14. **Driessen, A. J., D. Molenaar, and W. N. Konings.** 1989. Kinetic mechanism and specificity of the arginine-ornithine antiporter of *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* **264**:10361-70.
15. **Duckworth, R. M., S. N. Morgan, and A. M. Murray.** 1987. Fluoride in saliva and plaque following use of fluoride-containing mouthwashes. *J. Dent. Res.* **66**: 1730-1734.
16. **Ferro, K. J., G. R. Bender, and R. E. Marquis.** 1983. Coordinately repressible arginine deiminase system in *Streptococcus sanguis*. *Curr. Microbiol.* **9**: 145-150.

17. **Griswold, A. R., M. Jameson-Lee, and R. A. Burne.** 2006. Regulation and physiologic significance of the agmatine deiminase system of *Streptococcus mutans* UA159. *J. Bacteriol.* **188**: 834-841.
  
18. **Griswold A., Y-YM. Chen, J. A. Snyder, and R. A. Burne.** 2004. Characterization of the arginine deiminase operon of *Streptococcus rattus* FA-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 1321-1327.
  
19. **Hurwitz, C., C. B. Braun, and R. A. Peabody.** 1965. Washing bacteria by centrifugation through a water-immiscible layer of silicone. *J. Bacteriol.* **90**: 1692-1695.
  
20. **Koo, H., J. Sheng, P. T. M. Nguyen, and R. E. Marquis.** 2006. Co-operative inhibition by fluoride and zinc of glucosyl transferase production and polysaccharide synthesis by mutans streptococci in suspension cultures and biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* **254**: 134-140.
  
21. **Lowry, O.H., N. J. Rosebrough, A. J. Farr, and R. J. Randall.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
  
22. **Ma, Y., G. C. Rutherford, T. M. Curran, J. S. Reidmiller, and R. E. Marquis.** 1999. Membrane locus and pH sensitivity of paraben inhibition of alkali production by oral streptococci. *Oral Microbiol. Immunol.* **14**: 244-249.

23. **Marquis, R. E.** 1990. Diminished acid tolerance of plaque bacteria caused by fluoride. *J. Dent. Res.* 1990: **69** (special issue): 672-675.
24. **Marquis, R. E, S. A. Clock, and M. Mota-Meira.** 2003. Fluoride and organic weak acids as modulators of microbial physiology. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**: 493-510.
25. **McGraw, W, T., J. Potempa, D. Farley, and J. Travis.** 1999. Purification, characterization, and sequence analysis of a potential virulence factor from *Porphyromonas gingivalis*, peptidylarginine deiminase. *Infect. Immun.* **67**: 3248-56.
26. **Nguyen, P. T. M., J. Abranches, T-N. Phan, and R. E. Marquis.** 2002. Repressed respiration of oral streptococci grown in biofilms. *Curr. Microbiol.* **44**: 262-266.
27. **Phan, T-N., and R. E. Marquis.** 2006. Triclosan inhibition of membrane enzymes and glycolysis of *Streptococcus mutans* in suspensions and biofilms. *Can. J. Microbiol.* **52**:977-983.
28. **Phan, T-N., J. S. Reidmiller, and R. E. Marquis.** 2000. Sensitization of *Actinomyces naeslundii* and *Streptococcus sanguis* in biofilms and suspensions to acid damage by fluoride and other weak acids. *Arch. Microbiol.* **174**: 248-255.

29. **Phan, T-N., T. Buchner, J. Sheng, J. D. Baldeck, and R. E. Marquis.** 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.
30. **Poolman, B., A. J. M. Driessen, and W. N. Konings.** 1987. Regulation of arginine-ornithine exchange and the arginine deiminase pathway in *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **169**: 5597-5604.
31. **Rogers, A. H., A. L. Pfenning, N. J. Gully, and P. S. Zilm.** 1991. Factors affecting peptide catabolism by oral streptococci. *Oral Microbiol. Immunol.* **6**:72-75.
32. **Sheng, J., and R. E. Marquis.** 2006. Enhanced acid resistance of oral streptococci at lethal pH values associated with acid-tolerant catabolism and with ATP synthase activity. *FEMS Microbiol. Lett.* **262**: 93-98.
33. **Sheng, J., and R. E. Marquis.** 2007. Malolactic fermentation by *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **272**: 196-201.
34. **Terleckyj, B., N. P. Willett, and G. D. Shockman.** 1975. Growth of several cariogenic strains of oral streptococci in a chemically defined medium. *Infect. Immun.* **11**: 649-655.

35. **Uematsu, H., N. Sato, M. Z. Hossain, T. Ikeda, and E. Hoshino.** 2003. Degradation of arginine and other amino acids by butyrate-producing asaccharolytic anaerobic Gram-positive rods in periodontal pockets. *Arch. Oral Biol.* **48**: 423-429.
36. **Van Wuyckhuysse, B. C., H. E. R. Perinpanayagam, D. Bevacqua, R. F. Raubertas, R. J. Billings, W. H. Bowen, and L. A. Tabak.** 1995. Association of free arginine and lysine concentrations in humans parotid saliva with caries experience. *J. Dent. Res.* **74**: 686-690.
37. **Vogel, G. L., Y. Mao, L. C. Chow, and H. M. Proskin.** 2000. Fluoride in plaque fluid, plaque, and saliva measured for 2 hours after a sodium fluoride monofluorophosphate rinse. *Caries Res.* **34**: 404-411.

### Figure legends

FIG. 1. Actions of weak acids and triclosan on arginolysis of suspensions cells (A) or biofilms (B) or dispersed biofilms (C) of *S. sanguis* and suspension cells (D), biofilms (E) or dispersed biofilms (F) of *S. rattus* at a constant pH value of 4.0. . NaF, sodium fluoride. Indometh, indomethacin. Capric Ac, capric acid. Lauric Ac, lauric acid. LAcME, lauric acid methyl ester. The concentrations of the agents used are mM. Error bars indicate standard deviations calculated with n of at least 3.

FIG. 2. Inhibition at pH 6.0 by triclosan and organic weak acids of carbamate kinase in cell extracts of *S. sanguis*. Data indicate averages of two experiments.

FIG. 3. Inhibition of uptake of arginine by cells of *S. rattus* in suspensions at pH values of 4.0. A – inhibition by triclosan, B – by NaF, C- by lauric acid, D – by lauric acid methyl ester, E – by capric acid.

FIG. 4. Inhibition of uptake of arginine by cells of *S. rattus* in suspensions at pH 6.0. A – inhibition by triclosan, B – by lauric acid, C – by lauric acid methyl ester, D - by capric acid.

FIG. 5. Effects of pH and the indicated inhibitors, at a concentration of 1.0 mM, on ammonia production from 47 mM arginine by freshly harvested dental plaque. Data indicate averages of two experiments.



**Table 1.** Ammonia production by intact cells and biofilms of *S. sanguis* 10904 and *S. rattus* FA-1 at different constant pH values.

	<b>pH 6</b>		<b>pH 5</b>		<b>pH 4</b>	
<b><i>S. sanguis</i> 10904</b>	Ammonia	SD ( $\pm$ ) <sup>(4)</sup>	Ammonia	SD ( $\pm$ )	Ammonia	SD ( $\pm$ )
Intact Cells (1.5h) <sup>(1)</sup>	<b>2.16<sup>(2)</sup></b>	0.63	<b>2.83</b>	0.50	<b>1.77</b>	0.39
Intact Biofilms (3h)	<b>0.57<sup>(3)</sup></b>	0.02	<b>0.65</b>	0.09	<b>0.41</b>	0.23
Dispersed Biofilms (3h)	<b>1.55</b>	0.45	<b>1.06</b>	0.43	<b>0.39</b>	0.03
	<b>pH 6</b>		<b>pH 5</b>		<b>pH 4</b>	
<b><i>S. rattus</i> FA-1</b>	Ammonia	SD ( $\pm$ )	Ammonia	SD ( $\pm$ )	Ammonia	SD ( $\pm$ )
Intact Cells (1.5h)	<b>4.08</b>	0.47	<b>3.12</b>	0.47	<b>2.71</b>	0.41
Intact Biofilms (3h)	<b>0.86</b>	0.18	<b>0.87</b>	0.40	<b>0.78</b>	0.37
Dispersed Biofilms (3h)	<b>1.15</b>	0.23	<b>0.59</b>	0.32	<b>0.18</b>	0.09

(1) In parenthesis, total time for ammonia production

(2)  $\mu\text{mol}$  of ammonia per mg cell dry weight per h

(3)  $\mu\text{mol}$  of ammonia per mg biofilm dry weight per h

(4) Standard deviation of at least three different assays.

**Table 2.** Percentage of controls for ammonia production by intact cells of *S. sanguis* and *S. rattus* in the presence of different compounds at constant pH values. <sup>(1)</sup>

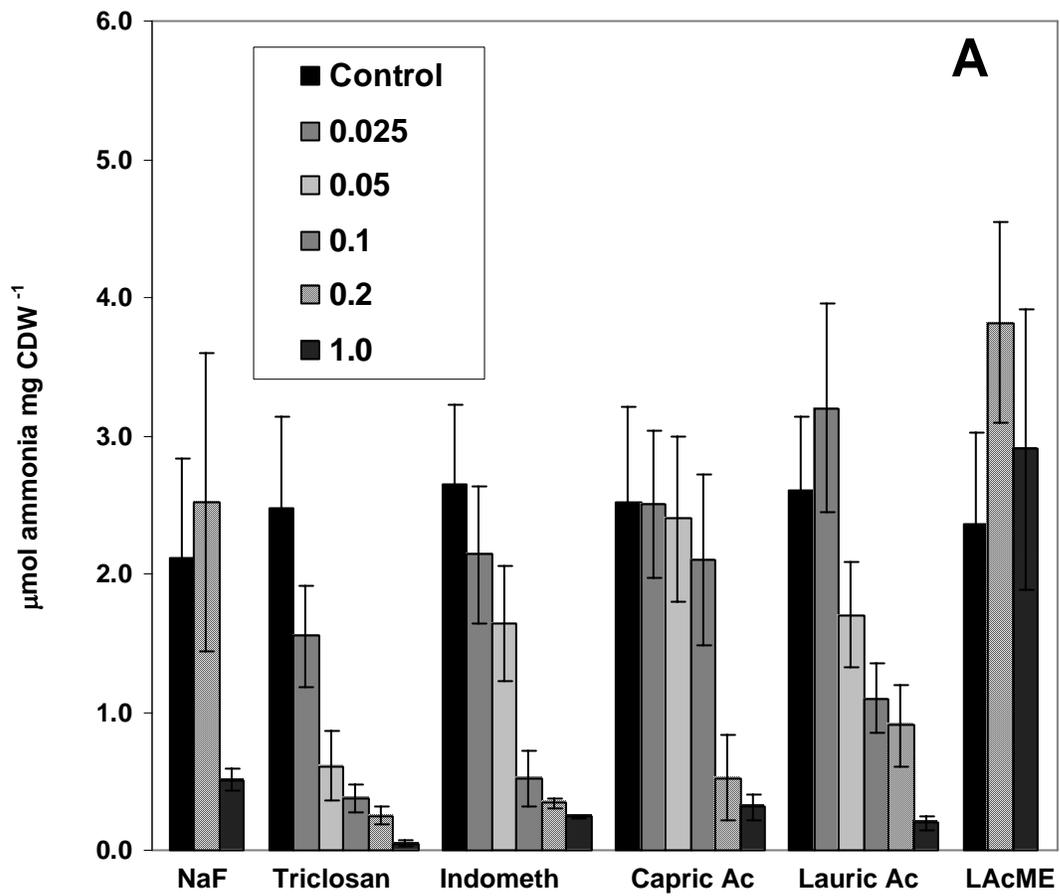
	NaF		Triclosan						Indomethacin			Capric Acid		
	0.2 <sup>(2)</sup>	1.0	0.025	0.05	0.1	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0
<b><i>S. sanguis</i></b>														
<b>pH6</b>	107.5	104.1	NA <sup>(3)</sup>	NA	41.3	15.6	NA	4.1	108.0	NA	77.2	100.0	NA	66.7
<b>pH5</b>	106.5	124.1	93.1	84.4	29.8	5.9	4.1	3.4	98.6	18.6	2.8	107.1	25.0	7.1
<b><i>S. rattus</i></b>														
<b>pH6</b>	100.8	105.7	NA	NA	32.4	20.7	NA	3.9	114.0	NA	104.9	123.9	NA	56.1
<b>pH5</b>	101.9	95.1	75.2	57.5	18.1	14.3	9.5	2.7	103.9	72.7	14.7	107.8	6.5	2.1

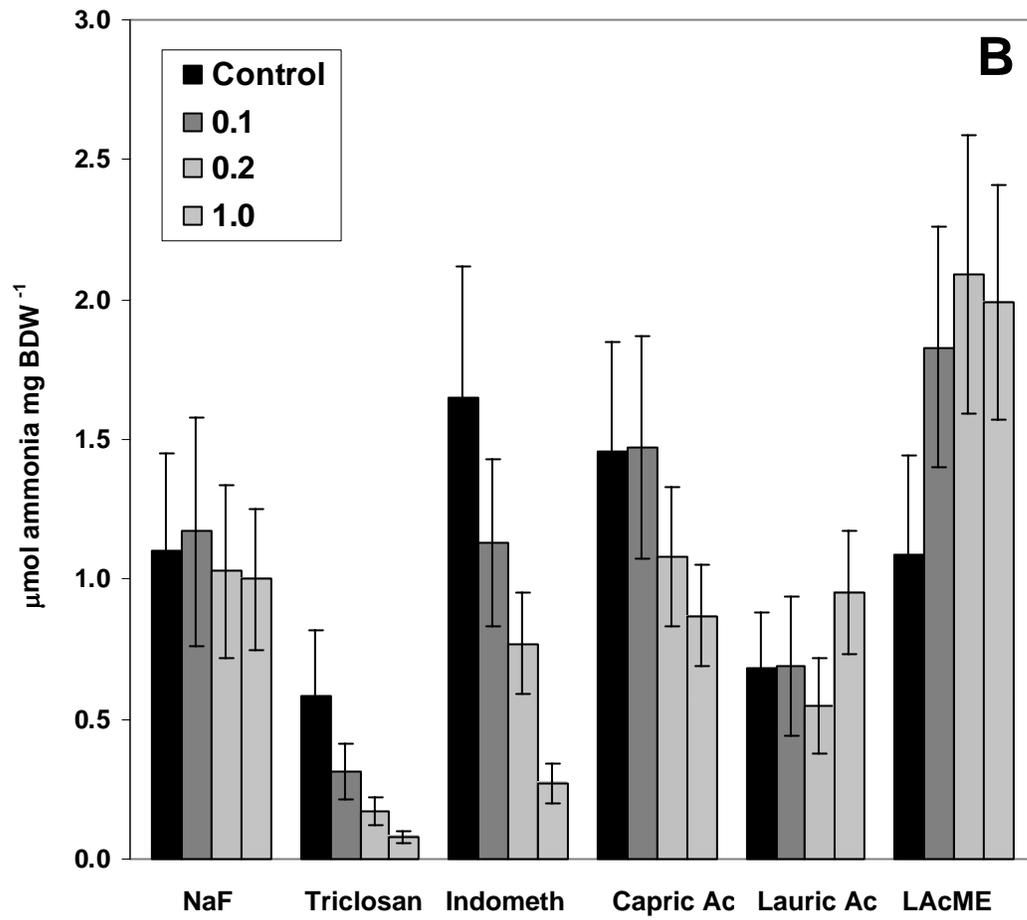
(1) Assay performed during 1.5 hour

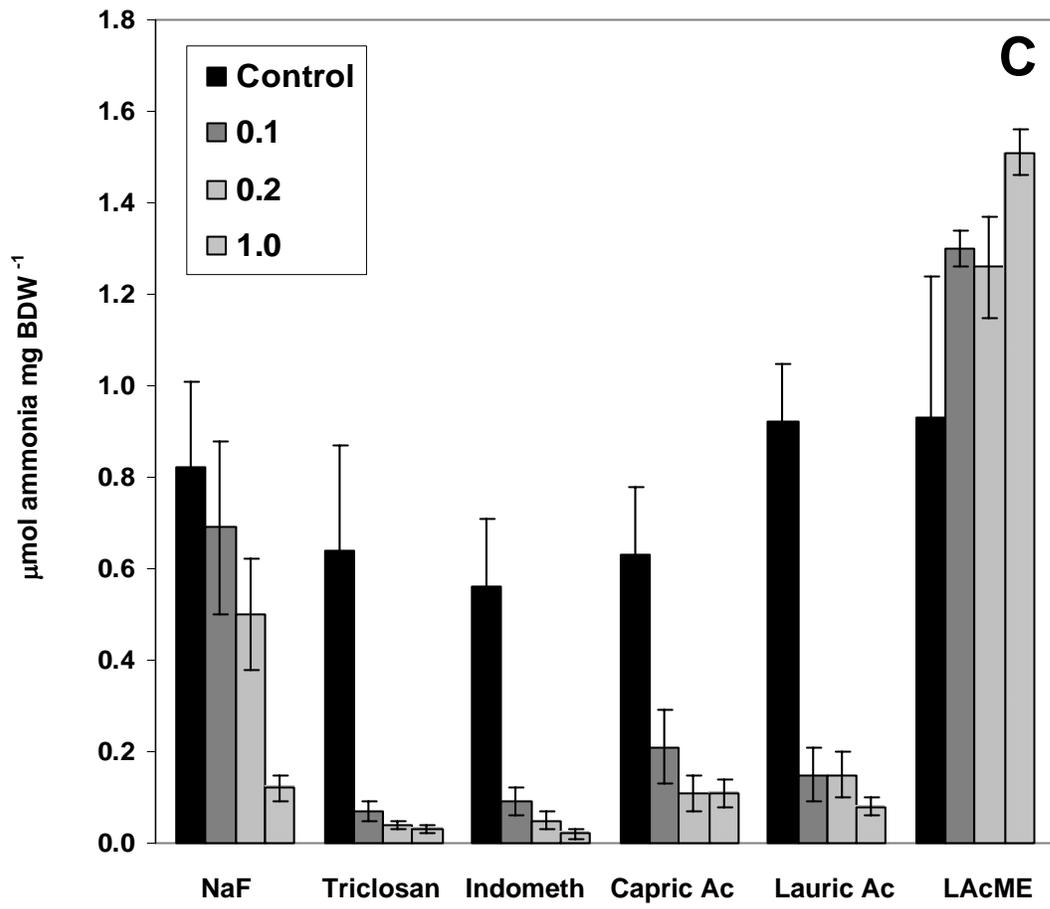
(2) Concentrations of compounds expressed in mM

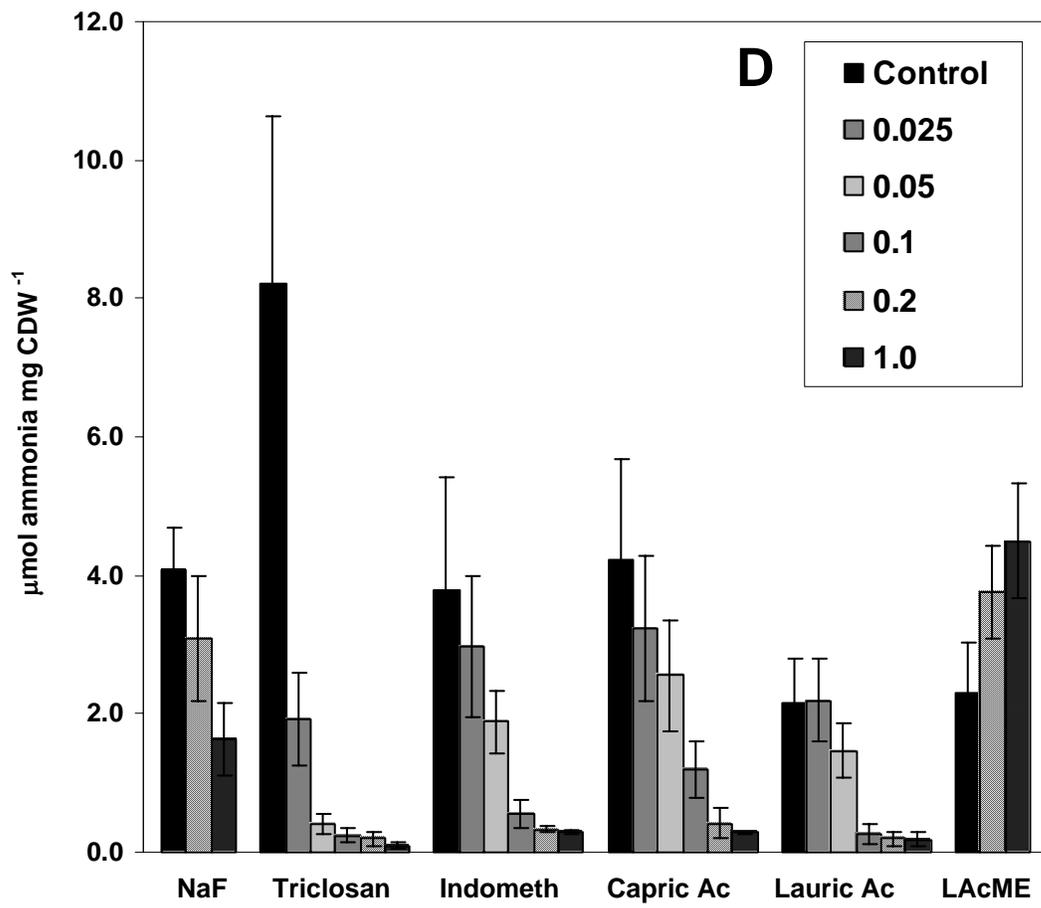
(3) NA, not assayed.

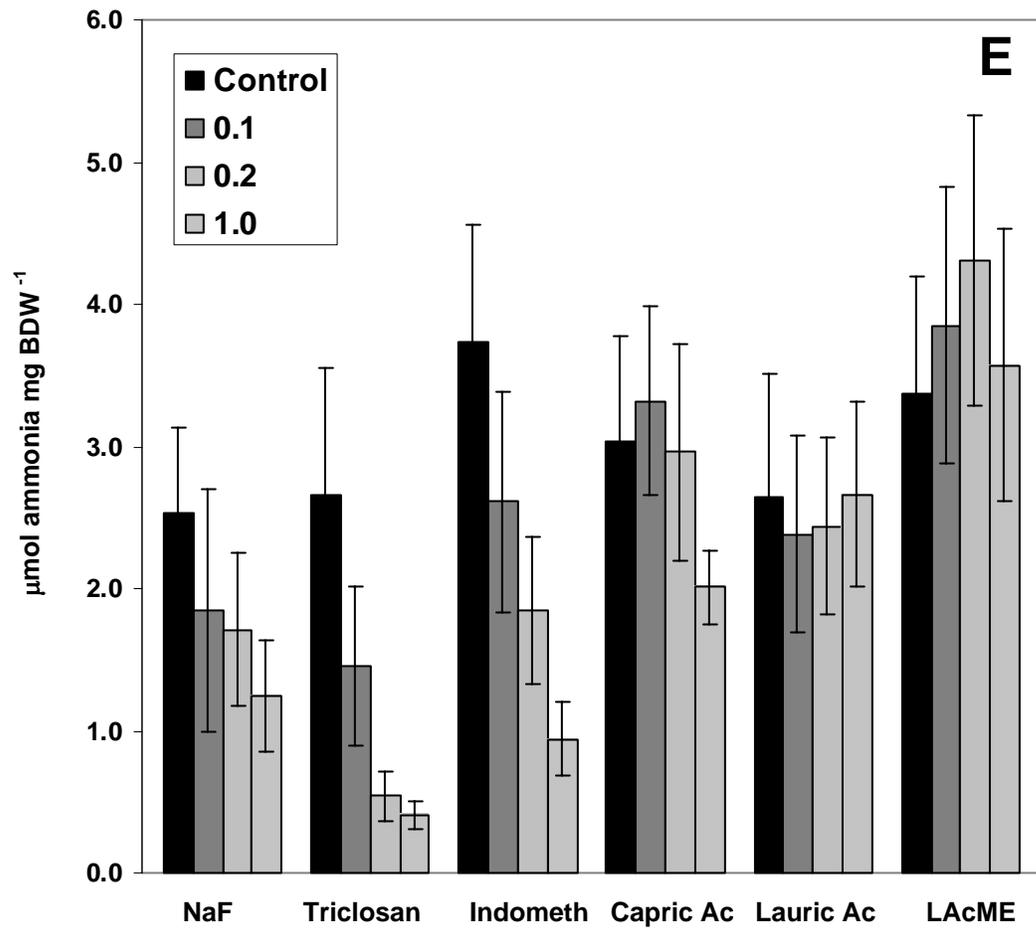
Figure 1











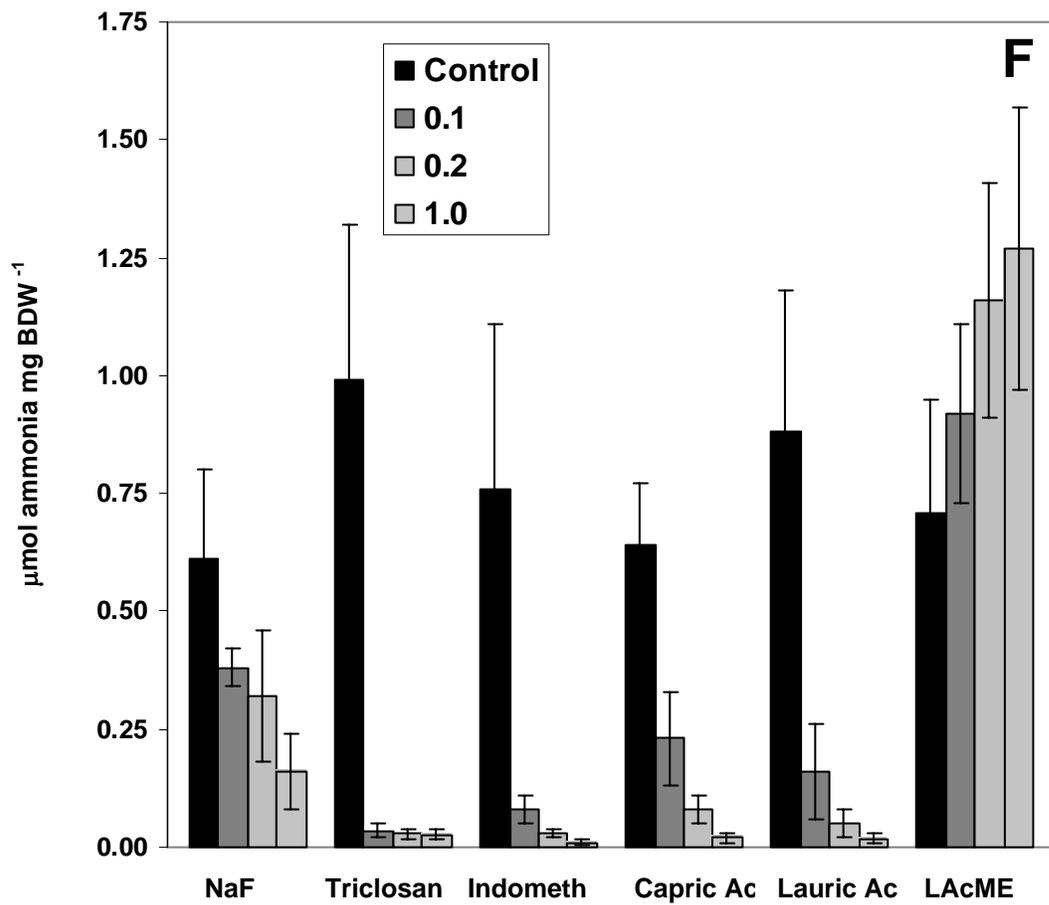


Figure 2

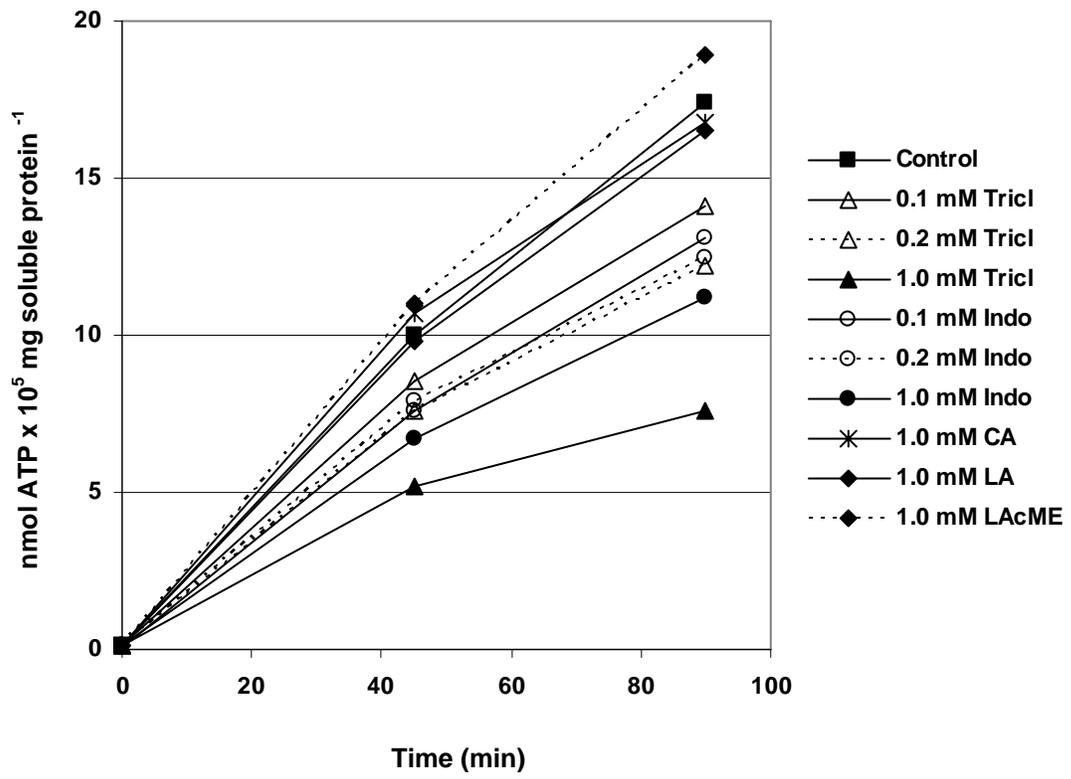
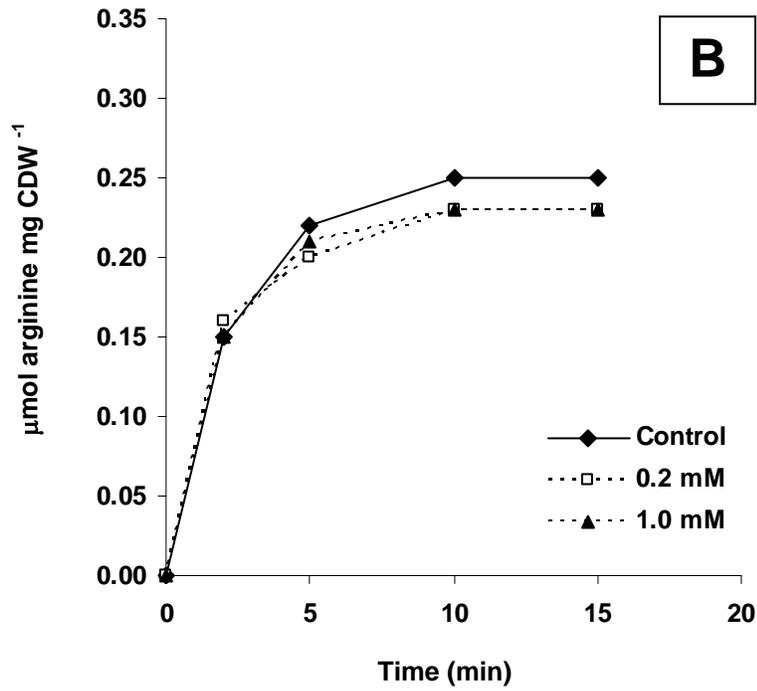
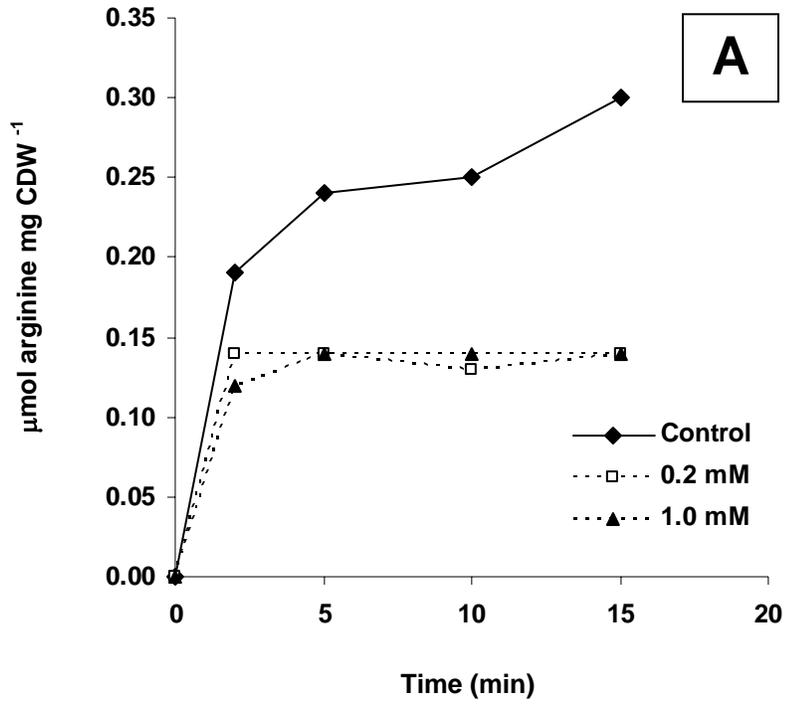
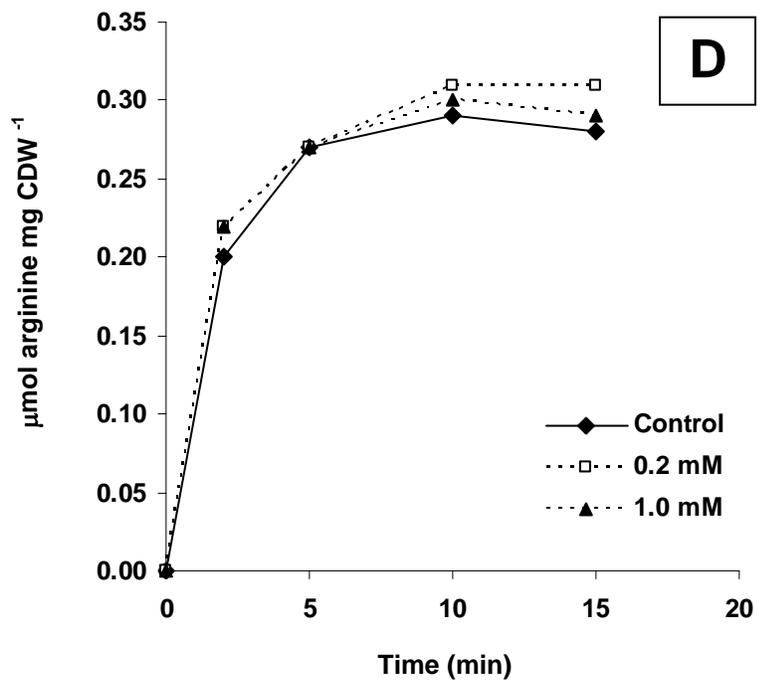
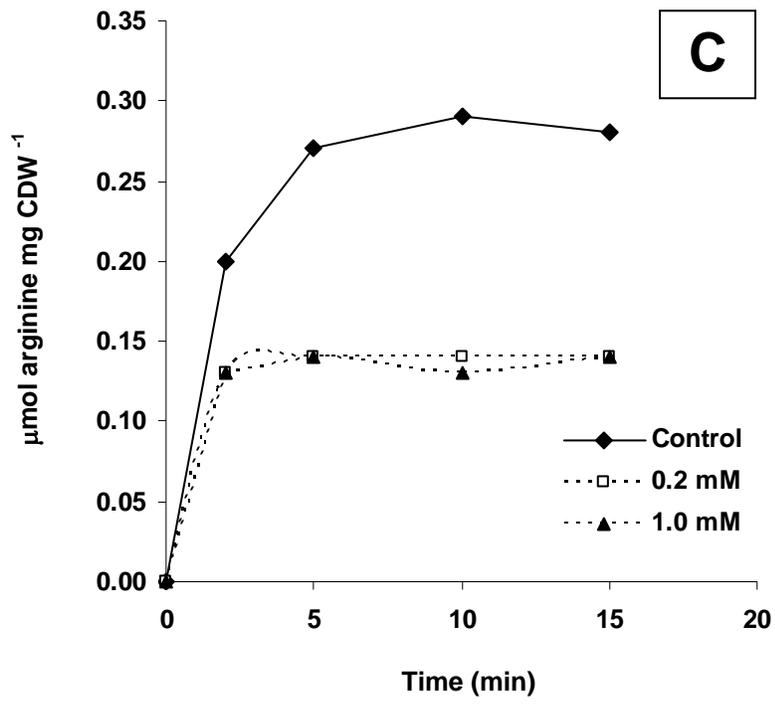


Figure 3





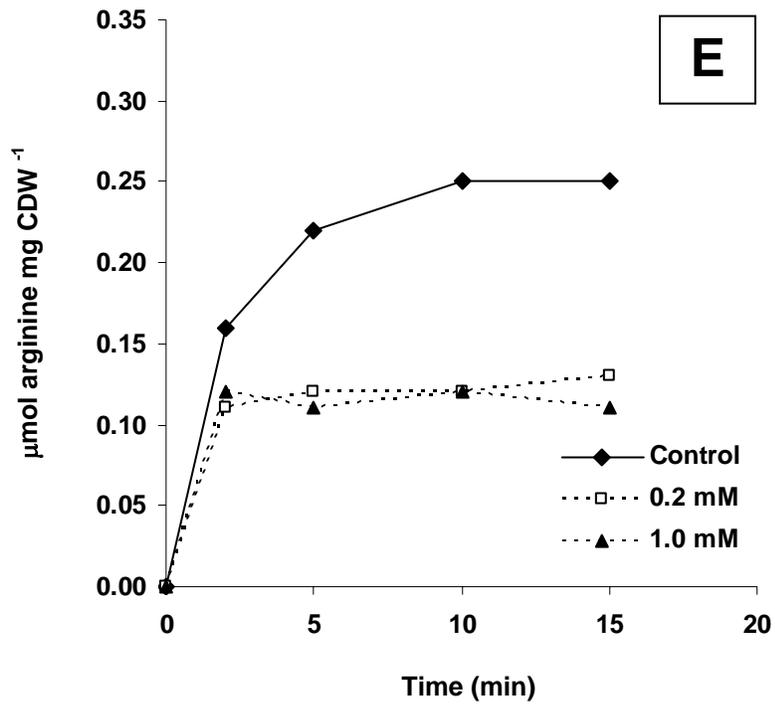
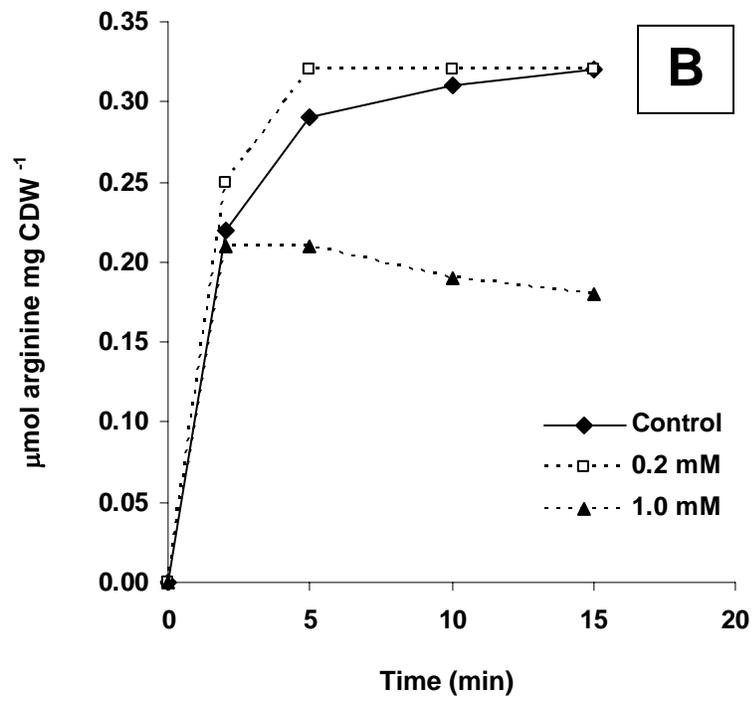
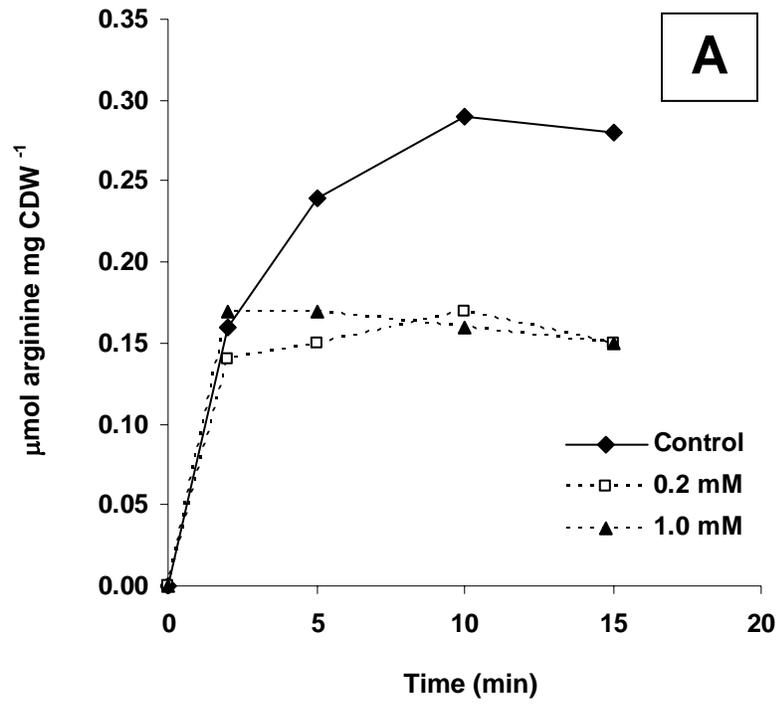


Figure 4



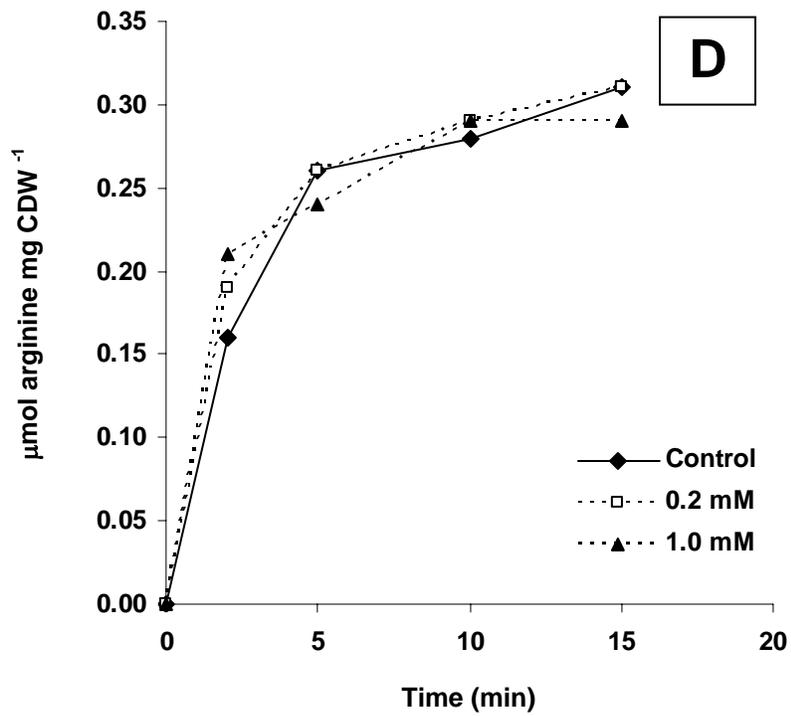
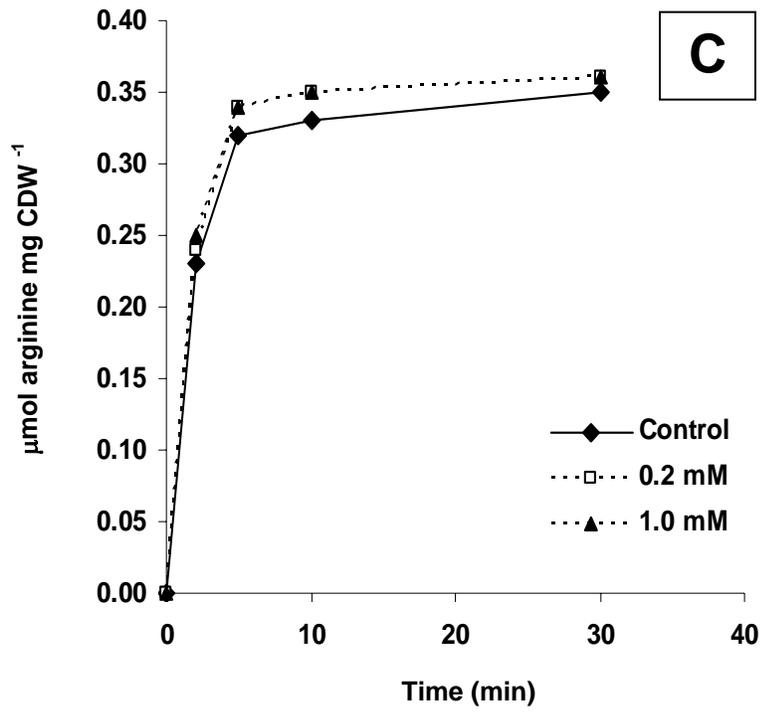
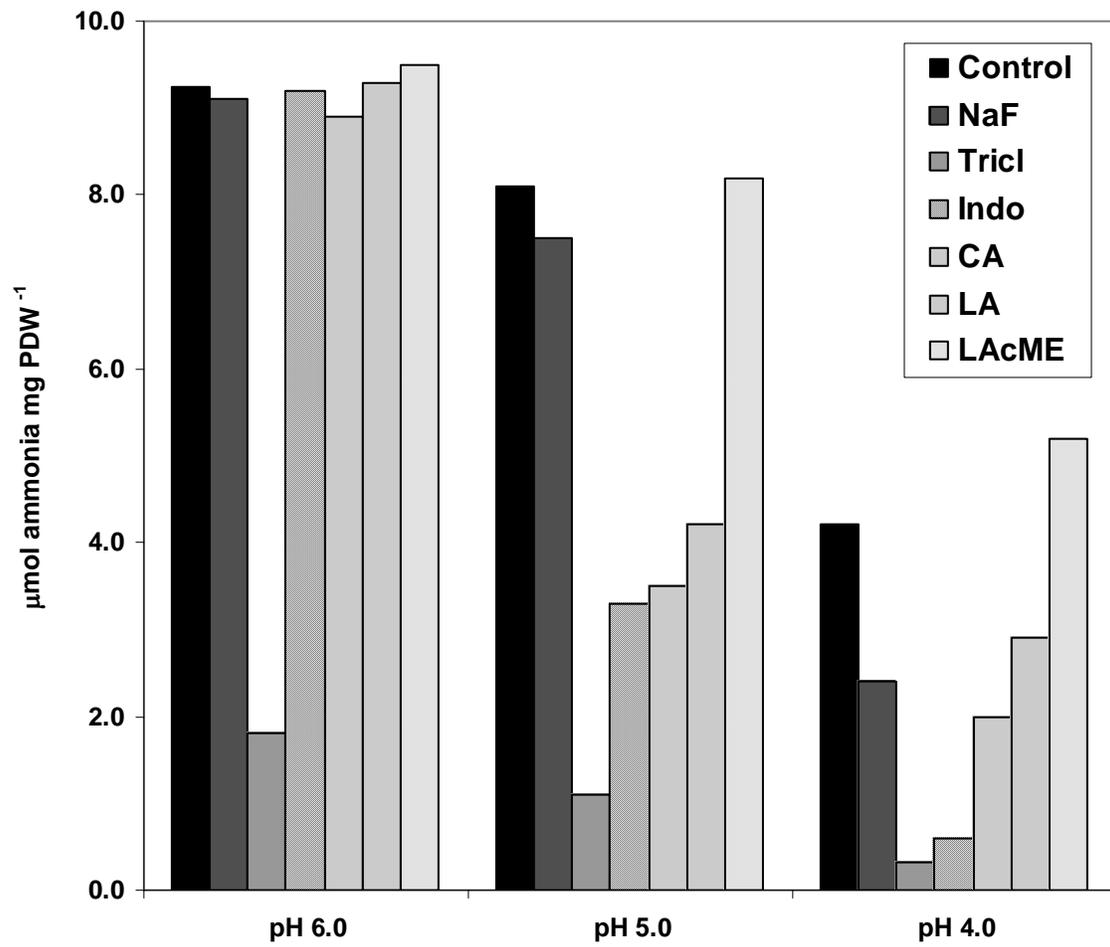


Figure 5





# 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](#)