



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MECINA – *CAMPUS* SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

BRUNO ROCHA DA SILVA

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO PEPTÍDEO SINTÉTICO LYS-A1
FRENTE A ESTREPTOCOCOS ORAIS

SOBRAL

2013

BRUNO ROCHA DA SILVA

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO PEPTÍDEO SINTÉTICO LYS-A1 FRENTE A
ESTREPTOCOCOS ORAIS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira.

Co-orientador: Prof. Dr. Victor Alves Carneiro.

SOBRAL

2013

BRUNO ROCHA DA SILVA

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO PEPTÍDEO SINTÉTICO LYS-A1 FRENTE A
ESTREPTOCOCOS ORAIS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira.

Co-orientador: Prof. Dr. Victor Alves Carneiro.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Victor Alves Carneiro (Co-Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli
Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Ao meu pai, Wanderley Paulo da Silva
(*in memoriam*), dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, pois tudo é por Ele e para Ele, agradeço infinitamente por proporcionar esse momento ímpar na minha vida, que é a apresentação deste projeto não somente acadêmico, mas de vida.

Aos meus pais, Wanderley Paulo da Silva (*in memoriam*) e Fernanda Mara Furtado Rocha, pelo amor e apoio incondicionais e por sempre se esforçarem ao máximo visando a minha formação.

À minha família por todo apoio, carinho e suporte oferecidos e sempre disponibilizando um ambiente alegre e acolhedor.

À minha companheira e eterna amiga, Nayane Cavalcante Ferreira, por todo apoio, paciência e amor. Sempre ao meu lado nos momentos de felicidade e de frustração inerentes da ciência.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira, por ter me dado uma oportunidade de ingressar em um grupo tão grandioso e consolidado como o LIBS. Além de sempre acreditar no meu potencial, confiou a mim árduas missões que espero ter cumprido com êxito. Sempre presente para elogiar, criticar e, acima de tudo, construir ciência de qualidade. Sou muito grato, além de tudo isso, por estar presente mesmo em momentos difíceis tanto de cunho profissional como pessoal.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Victor Alves Carneiro, por ter me guiado com suma excelência durante esses anos de convivência. Além de um verdadeiro mestre, um amigo incomparável e presente em todos os momentos. Sempre disposto a ensinar, educar e guiar com responsabilidade àqueles que se dedicam e estão determinados a prosseguir.

Aos Drs. Eduardo Maffud Cilli e Esteban Nicolás Lorenzón pelo apoio incondicional a este projeto o que possibilitou o mesmo ser concretizado. Espero que essa parceria perdure e dê origem a novos projetos.

À Universidade Federal do Ceará, em especial a Faculdade de Medicina *Campus* Sobral e ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, por terem me fornecido condições acadêmicas para a execução deste trabalho.

Aos professores do Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará por todo o conhecimento compartilhado. Em especial, ao Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha, pela

indiscutível amizade e por me proporcionar algumas das melhores aulas que já tive a oportunidade de presenciar.

Ao Professor Benildo Sousa Cavada pelo apoio e confiança. Sempre me estimulando com suas palavras e missões científicas grandiosas.

À Dra. Andréa Silvia Walter de Aguiar por ser sempre minha amiga e eterna orientadora. Tenho orgulho de ter sido seu (des)orientando durante a graduação e agradeço imensamente por todas as oportunidades concedidas. Tenha a certeza de que, um dia, repassarei tudo que me ensinou a outro aluno.

Ao Dr. Francisco Vassiliepe Sousa Arruda pela amizade inigualável e por sempre estar disposto a ajudar e ensinar. Esse é o espírito do verdadeiro mestre.

Aos amigos Luiz Gonzaga Nascimento Neto e Francisco Flávio Vasconcelos Evaristo pelo companheirismo e apoio incondicional. Devo grande parte dessa conquista a vocês.

Aos alunos de Iniciação Científica, Victor Aragão Abreu de Freitas e Humberlânia de Sousa Duarte, pela ajuda com todos os experimentos realizados. Vocês são alunos diferenciados e sou grato por fazer parte das suas formações.

Ao Núcleo de Biotecnologia de Sobral (NUBIS) por toda a estrutura e suporte disponibilizados, em particular ao Laboratório Integrado de Biomoléculas (LIBS) e todos os seus integrantes: Wanderleia, Marianne, Ariane, Simone, Ídia, Nairley e Jean.

Aos colegas de turma do Mestrado, em especial, Rafaela Mesquita Bastos e Érica de Menezes Rabelo, pelas incontáveis horas de estudo, conversas, aflições e alegrias.

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e FUNCAP pelo suporte financeiro a este projeto, tanto na forma de bolsa auxílio, como na aquisição de equipamentos e materiais necessários à sua conclusão.

“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original.”

(Albert Einstein)

RESUMO

A cárie dental é conceituada como uma doença infectocontagiosa, crônica e multifatorial na qual ocorre uma desmineralização progressiva das estruturas dentais com consequente dor e perda do elemento dental. É considerada um problema de saúde pública em todo mundo devido sua incidência e consequências orais e sistêmicas. Dessa forma, novos métodos de controle microbiano têm sido pesquisados com vista à redução do número de casos. Os peptídeos antimicrobianos são moléculas presentes em diversos seres vivos e possuem uma alta atividade biocida frente a diversos microrganismos patogênicos. O peptídeo Lys-[Trp6]-Hy-A1 (Lys-a1), derivado sintético do peptídeo Hy-A1, isolado inicialmente da espécie *Hypsiboas albopunctatus*, é uma molécula com atividade antimicrobiana descrita na literatura. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antibacteriano do peptídeo sintético Lys-a1 sobre crescimento planctônico e em biofilme de bactérias orais. As metodologias utilizadas para avaliação do potencial antimicrobiano foram: determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) em placas de poliestireno para o crescimento em suspensão; e quantificação de biomassa por cristal violeta e contagem de unidades formadoras para crescimento em biofilme. Os micro-organismos, *S. oralis*, *S. sanguinis*, *S. parasanguinis*, *S. salivarius*, *S. mutans* e *S. sobrinus*, foram cultivados em Brain Heart Infusion caldo suplementado com 1% de sacarose (BHIs) a 37 °C sob atmosfera com 10% de CO₂. O peptídeo foi solubilizado em ácido acético 0,1% (v/v) em diferentes concentrações (500 a 1,9 µg.mL⁻¹). Os grupos controle dos ensaios foram meio de cultura BHIs (controle negativo) e Gluconato de Clorexidina 0,12% (controle positivo). O peptídeo testado apresentou um destacado efeito antimicrobiano, sendo capaz de inibir o crescimento planctônico e em biofilme de todas as cepas testadas mesmo em baixas concentrações. Assim, o peptídeo Lys-a1 é uma importante fonte para possíveis agentes antimicrobianos, com ênfase no controle e prevenção de biofilmes microbianos, um dos fatores mais importantes para o desenvolvimento do processo cariogênico.

Palavras-chave: Peptídeo Antimicrobiano. Biofilmes. *Streptococcus mutans*. Cárie Dentária.

ABSTRACT

Dental caries is defined as an infectious, chronic and multifactorial disease, in which there is a progressive demineralization of tooth structure with consequent pain and dental loss. It is considered a major public health problem worldwide because its high incidence, besides its oral and systemic consequences. Thus, new methods of microbial control have been investigated to reduce the number of cases. Antimicrobial peptides are molecules present in many living beings and have a high biocidal activity against various pathogenic microorganisms. The peptide Lys-[Trp⁶]-Hy-A1 (Lys-a1) is a synthetic derivative of the peptide Hy-A1, initially isolated from the species *Hypsiboas albopunctatus*. According to previous research, it is a molecule with broad antimicrobial activity. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of the synthetic peptide Lys-a1 on the planktonic and biofilm growth of oral bacteria. The methods used to evaluate antimicrobial activity include the following: determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) in microtiter plates for growth in suspension and quantification of biomass by crystal violet staining and counting of colony forming units for biofilm growth. The microorganisms *S. oralis*, *S. sanguinis*, *S. parasanguinis*, *S. salivarius*, *S. mutans* and *S. sobrinus* were grown in Brain Heart Infusion broth supplemented with 1% sucrose (BHIs) at 37 °C under atmospheric pressure with 10% CO₂. The peptide was solubilized in 0.1% acetic acid (v/v) at various concentrations (500 to 1.9 µg.mL⁻¹). Chlorhexidine gluconate 0.12% was used as the positive control, and BHIs culture medium was used as the negative control. The tested peptide demonstrated a remarkable antimicrobial effect, inhibiting the planktonic and biofilm growth of all strains tested, even at low concentrations. Thus, the peptide Lys-a1 is an important source for potential antimicrobial agents, especially for the control and prevention of microbial biofilms, which is one of the most important factors in cariogenic processes.

Keywords: Antimicrobial peptide. Biofilms. *Streptococcus mutans*. Dental caries.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 -	Índices de CPO-D em indivíduos de 12 anos especificados por região do globo.....	25
Figura 1 -	Desenho esquemático do processo de desmineralização do esmalte dentário em decorrência de ambiente ácido.....	27
Figura 2 -	Desenho esquemático do processo de remineralização do esmalte dentário em decorrência do reajuste do pH ao índice fisiológico.....	27
Figura 3 -	Sinais clínicos decorrentes da desmineralização dentária prolongada.....	28
Figura 4 -	Lesões orais mais prevalentes com etiologia microbiana. A) Lesão de cárie extensa; B) Periodontite de alto grau; C) Candidíase eritematosa em paciente portador de imunodeficiência.....	32
Figura 5 -	Modelo espaço temporal de colonização bacteriana em cavidade oral, no qual se evidencia a interação entre os receptores moleculares presentes na superfície bacteriana e as diversas moléculas presentes na película adquirida do esmalte, além das interações específicas célula-célula presentes no biofilme.....	34
Figura 6 -	Modelo de relação entre a sucessão microbiana em biofilmes orais e a quantidade de AI2 secretada.....	38
Figura 7 -	Distribuição das publicações de acordo com a origem do AMP estudado, por biênio.....	42
Figura 8 -	Modelo “barrel-stave” para indução da morte bacteriana via AMP.....	45
Figura 9 -	Modelo estilo “carpet model” para indução da morte bacteriana via AMP.....	46
Figura 10 -	Modelo “Toroidal-pore” para indução da morte bacteriana via AMP.....	46
Figura 11 -	Modos de ação intracelular para atividade antimicrobiana mediada por AMPs.....	47

- Figura 12 - Atividade antibiofilme do peptídeo Lys-a1 frente às cepas bactérias analisadas (A-F). Substância teste (□), Controle negativo (■) e Gluconato de Clorexidina 0,12% (■). **p<0,01. ***p<0,001..... 57
- Figura 13 - Atividade antibiofilme do peptídeo Lys-a1 frente às cepas bactérias analisadas (A-F). Substância teste (□) e Controle negativo (■). ***p<0,001..... 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média do Índice CPO-D para o grupo etário de 12 anos e proporção dos componentes em relação ao CPO-D total, segundo regiões.....	26
Tabela 2 - Distribuição das publicações relacionadas a AMPs com micro-organismos orais de 2002 a 2011, por biênio.....	42
Tabela 3 - Susceptibilidade in vitro dos micro-organismos orais testados frente ao peptídeo Lys-a1.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg – Micrograma

µL – Microlitro

ABC - ATP-binding Cassete

AI2 - Molécula autoindutora tipo 2

AMP - Peptídeo Antimicrobiano

ATP - Adenosina Trifosfato

BHI - Brain Heart Infusion

CBM - Concentração Bactericida Mínima

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

CPO-D - Índice de Dentes Cariados, Perdidos e Obturados

CTRL – Controle

Des-re - Processo de desmineralização/remineralização

DNA - Ácido Desoxiribonucleico

DO - Densidade Óptica

EPS - Substância extracelular polimérica

Ftfs – Frutossiltransferases

Gtfs – Glicosiltransferases

Hy-a1 - Hilina-a1

Leu – Leucina

Lys-a1 - Lys-[Trp6]-Hy-a1

mL – Mililitro

MRSA - *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente

nm – Nanômetro

°C - Grau Celsius

OMS - Organização Mundial de Saúde

P.A. - Pró-análise

pH - Potencial Hidrogeniônico

PTS - Sistema fosfotransferase

RNA - Ácido Ribonucleico

Trp – Triptofano

UFC - Unidade Formadora de Colônias

VRE - Enterococos vancomicina-resistentes

LISTA DE SÍMBOLOS

% – Porcentagem

α – Alfa

β – Beta

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	
1	INTRODUÇÃO..... 18
CAPÍTULO 2 – REVISÃO DE LITERATURA – CÁRIE DENTAL	
2	CÁRIE DENTAL..... 21
2.1	Conceito e Fatores Etiológicos da Cárie Dental..... 21
2.1.1	Hospedeiro..... 21
2.1.2	Microbiota..... 22
2.1.3	Dieta..... 23
2.2	Epidemiologia..... 24
2.3	Processo Cariogênico..... 26
2.4	Prevenção..... 28
2.4.1	Fluoretos..... 29
2.4.2	Gluconato de Clorexidina..... 30
CAPÍTULO 3 – REVISÃO DE LITERATURA – BIOFILMES ORAIS	
3	BIOFILMES ORAIS..... 32
3.1	Aspectos gerais..... 32
3.2	Processo de Formação dos Biofilmes Orais..... 33
3.3	Metabolismo do Biofilme..... 35
3.4	Matriz Extracelular Polimérica..... 36
3.5	Comunicação Celular em Biofilmes..... 37
3.6	Aspectos Genéticos de Biofilmes..... 38
CAPÍTULO 4 – REVISÃO DE LITERATURA – PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS	
4	PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS..... 41
4.1	Aspectos Gerais..... 41
4.2	Peptídeo Hilina-A1..... 42
4.3	Peptídeos Sintéticos..... 43
4.4	Mecanismo de Ação..... 45
4.5	Vantagens e Limitações..... 49
CAPÍTULO 5 – OBJETIVOS	
5	OBJETIVOS..... 50
5.1	Objetivo geral..... 50

5.2 Objetivos específicos.....	50
CAPÍTULO 6 – MATERIAIS E MÉTODOS	
6 MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
6.1 Cepas Bacterianas e Condições de Cultivo.....	52
6.2 Síntese, Purificação e Preparação do Peptídeo.....	52
6.3 Ensaio de Atividade Antimicrobiana.....	52
6.4 Ensaio de Atividade Antibiofilme.....	53
6.4.1 Quantificação de Biomassa.....	53
6.4.2 Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC).....	54
6.5 Análise Estatística.....	54
CAPÍTULO 7 – RESULTADOS	
7 RESULTADOS.....	56
7.1 Atividade Antimicrobiana.....	56
7.2 Atividade Antibiofilme.....	56
7.2.1 Análise de Quantificação de Biomassa.....	56
7.2.2 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias.....	58
CAPÍTULO 8 – DISCUSSÃO	
8 DISCUSSÃO.....	61
CAPÍTULO 9 – CONCLUSÕES	
9 CONCLUSÕES.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
ANEXO I – ARTIGOS PUBLICADOS PERTINENTES AO TEMA ABORDADO	82

Capítulo 1 – Introdução

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é conceituada como a destruição localizada de tecidos duros dentários susceptíveis por produtos ácidos provenientes da fermentação bacteriana de carboidratos (SELWITZ; ISMAIL; PITTS, 2007). É considerada como uma das principais doenças infecciosas preveníveis em pacientes pediátricos; muito embora os indivíduos possam ser acometidos por tal doença ao longo de toda a vida (CHEN; WANG, 2010; HOUSHMAND *et al.*, 2012; SUNI *et al.*, 2013).

A cárie é a maior causa de perdas de unidades dentárias e dor orofacial, apesar de poder ser revertida em seus estágios iniciais. Contudo, tal patologia não é auto limitante, o que, sem os cuidados adequados, pode levar a sua progressão até a completa destruição do elemento dentário (BRETZ; ROSA, 2011).

O principal fator etiológico relacionado com o desenvolvimento da cárie dentária é a colonização de micro-organismos patogênicos sobre as superfícies orais (KOLENBRANDER *et al.*, 2006). Tais micro-organismos variam de acordo com o grau de desenvolvimento da lesão e fatores do hospedeiro. Contudo, a habilidade desses colonizadores em se desenvolverem em biofilmes é um dos fatores de virulência mais importantes e, conseqüentemente, um dos mais estudados (KOLENBRANDER *et al.*, 2010).

Biofilmes são comunidades microbianas complexas que se desenvolvem em uma grande variedade de superfícies. Estão geralmente associados a uma matriz extracelular composta por diversos tipos de biopolímeros derivados do próprio metabolismo bacteriano (ABEE *et al.*, 2010).

O crescimento em biofilmes provê proteção à atuação de antibióticos e fatores de estresse ambiental tanto devido à barreira física formada pela matriz extracelular o que dificulta a penetração dos agentes antimicrobianos dentro do biofilme (SOTO, 2013); como também devido aos mecanismos de comunicação bacteriana que estimulam as bactérias a produzir enzimas e proteínas importantes para a adaptação fisiológica do biofilme (CORBIN *et al.*, 2011).

Devido a sua importância no que se refere à saúde pública e por ser a principal causa de infecções orofaciais, diversos estudos têm sido realizados com vista o controle da microbiota oral e, conseqüentemente, ao combate contra o desenvolvimento de biofilmes orais (CARNEIRO *et al.*, 2010; SÁ *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2012).

Neste contexto, um grupo de moléculas com características peculiares tem sido foco de pesquisas no campo da Microbiologia, os peptídeos antimicrobianos (AMPs). Os AMPs são um grupo heterogêneo de moléculas encontrados em diversos organismos, de insetos e anfíbios a mamíferos, além de possuírem ampla atividade antibacteriana e antifúngica (SILVA *et al.*, 2012).

Tais moléculas têm recebido bastante atenção, pois elas agem na membrana celular do patógeno, estrutura essa que não é um alvo quiral específico. Dessa forma, bactérias e fungos têm dificuldade em superar os efeitos deletérios induzidos pelos AMPs (CRUSCA *et al.*, 2011).

Dentre as diversas fontes de AMPs, as glândulas granulares de anuros representam uma faz mais ricas reservas naturais de AMPs na natureza. Recentemente, Castro e colaboradores (2009) isolaram um peptídeo chamado Hilina-A1 (Hy-a1, IFGAILPLALGALKNLIK-NH₂), o primeiro peptídeo citolítico isolado da pele do sapo arbóreo comum na região da América do Sul *Hypsiboas albopunctatus*. Tal peptídeo exibia uma atividade citolítica significativa frente a eritrócitos humanos, bem como propriedades antibacterianas e antifúngicas (CASTRO *et al.*, 2009).

Contudo, tendo em vista que a atividade biológica dos AMPs está frequentemente associada com o número de cargas positivas em sua sequência, incluindo o grupo N-terminal, além da diminuição de sua citotoxicidade, Crusca Jr e colaboradores (2011) sintetizaram diversos análogos do peptídeo Hy-a1 com mudanças na região N-terminal original e obtiveram análogos que foram capazes de manter sua ação antimicrobiana com significativa diminuição da atividade citolítica (CRUSCA *et al.*, 2011). Dentre os peptídeos sintetizados, destaca-se o peptídeo Lys-[Trp6]-Hy-a1 (Lys-a1) devido sua marcante atividade antimicrobiana contra cepas Gram positivas e negativas. Entretanto, a atividade deste peptídeo contra bactérias cariogênicas, bem como seu papel no combate ao biofilme permanece obscuro.

Capítulo 2 – Revisão de literatura

Cárie Dental

2 CÁRIE DENTAL

2.1 Conceito e Fatores Etiológicos da Cárie Dental

A maneira como se conceitua a cárie dentária e seus fatores etiológicos determina a escolha para estabelecer a estratégia preventiva de diagnóstico e tratamento. É aceito e estabelecido universalmente que a cárie dentária é uma doença multifatorial, infecciosa, transmissível e dieta dependente, que produz uma desmineralização das estruturas dentárias de forma gradual (VIEIRA *et al.*, 2012).

Contudo, por essa definição, devido sua complexidade, torna-se muito difícil compreendê-la completamente. Tal conceito de cárie é embasado na interação de fatores como hospedeiro, microbiota e dieta, determinando a casuística do processo cariogênico, ilustrada inicialmente por Keyes (1962).

Entretanto, para Newbrun (1983), a cárie é resultado de um processo crônico, que aparece após algum tempo da presença e da interação desses três fatores previamente abordados (hospedeiro, microbiota e dieta), julgou-se conveniente incluir o tempo como outro fator etiológico (NEWBRUN, 1983).

Segundo Lima (2007), ao se aceitar a mudança proposta por Newbrun, deve-se procurar um conhecimento mais aprofundado dos diversos fatores etiológicos envolvidos no processo de formação da cárie que possibilite estabelecer estratégias preventivas mais eficientes, sem que se corra o risco de promover algum desequilíbrio com consequências piores do que a própria “doença”.

2.1.1 Hospedeiro

Quanto ao fator suscetibilidade à cárie, deve-se diferenciar a suscetibilidade do indivíduo como um todo e a do próprio dente. A suscetibilidade do indivíduo pode ser determinada por fatores extrínsecos e intrínsecos (LIMA, 2007). Os fatores extrínsecos estão relacionados à estrutura sociocultural na qual o indivíduo está inserido como, por exemplo, as diferenças que existem entre as pessoas que vivem em países do chamado “Primeiro Mundo” e aquelas que residem nos países do “Terceiro Mundo” (LARMAS, 2012). Sabe-se que a suscetibilidade está subjugada a essas diferenças culturais, interferindo no comportamento do indivíduo com influência no controle e na incidência de cárie dentária dessa população (FUKAI; OHNO; BLINKHORN, 2012).

Os fatores intrínsecos (como fluxo, composição e capacidade tampão da saliva, aspectos hereditários e imunológicos), apesar de importantes, são difíceis de serem controlados, não justificando maiores considerações no âmbito das estratégias a serem propostas (SUBRAMANIAM; BABU; RODRIGUEZ, 2010).

A suscetibilidade do dente à cárie é determinada pelo grau de mineralização do esmalte, proporcionando maior ou menor resistência à dissolução ácida, cuja mineralização também é regida por fatores intrínsecos que ocorrem durante a formação do dente e os extrínsecos, que são fatores ambientais e locais (LIMA, 2007). Por muito tempo pensou-se existir dentes resistentes à cárie e muitas tentativas foram feitas para identificar fatores de importância de ordem químico-estruturais que explicassem essa suposta resistência (GELLER-PALTI, 2007). Contudo, chegou-se à conclusão de que não existe um dente suficientemente resistente à cárie e, por mais que se procure aumentar essa resistência, através de métodos químicos e mecânicos, sempre fica na dependência do desafio cariogênico a que o indivíduo será submetido. Por esse motivo o fator suscetibilidade, no estabelecimento de estratégias preventivas, deve ser considerado como um fator de importância relativa (ZERO *et al.*, 2009).

2.1.2 Microbiota

A primeira proposição acerca da relação do aspecto microbiológico como fator etiológico do processo cariogênico é antiga (BLACK, 1898; WILLIAM, 1897). Contudo, a confirmação de que bactérias orais, quando em ambiente com excesso de açúcares e outros fatores, são capazes de desenvolver a lesão de cárie só foi confirmada alguns anos depois por Miller (MILLER, 1902).

Durante o século XX, dentre todos os organismos associados a aparição da cárie dental, os estreptococos do grupo mutans despertaram grande interesse por parte dos pesquisadores ao redor do mundo (AL-DAJANI; LIMEBACK, 2012; BOWEN; KOO, 2011; PARISOTTO *et al.*, 2011). Tal período de pesquisas chegou ao seu auge quando pesquisadores recolheram cepas de *Streptococcus mutans* isoladas inicialmente de lesões cariosas humanas e as utilizaram em modelos cariogênicos murinos, estabelecendo-se o papel crucial dessa espécie no processo de formação da cárie (FITZGERALD; KEYES, 1960; ORLAND *et al.*, 1954). Contudo, deve-se ressaltar que a cárie é uma doença de cunho microbiano, mas que só ocorre quando da alteração em

proporção da microbiota residente/patogênica associada a fatores ambientais (ZERO *et al.*, 2009).

Os principais traços virulentos inerentes a micro-organismos associados à cárie incluem acidogênese e aciduricidade, reservas intracelulares de polissacarídeos e formação de glicanos extracelulares que permitam a adesão celular de outros organismos (ZERO *et al.*, 2009).

Embora o *S. mutans* seja um dos micro-organismos cariogênicos mais amplamente pesquisados, estudos ressaltam que ele é apenas um dentre mais de 1000 outras espécies encontradas no biofilme oral (WADE, 2013). Em estudos realizados através de identificação molecular bacteriana, pesquisadores relatam que comunidades bacterianas distintas, inclusive algumas novas espécies, estão associadas com o processo cariogênico e que *S. mutans* não é detectável em 10 - 20% dos indivíduos com cáries extensas (AAS *et al.*, 2008; BEIER; QUIVEY; BERGER, 2012). Evidências recentes também elucidaram o papel de algumas leveduras, como a *Candida albicans*, como um membro da microbiota mista envolvida no aparecimento da cárie (KLINKE *et al.*, 2009).

2.1.3 Dieta

Sabe-se que no homem primitivo, através do consumo de alimentos naturais, desencadeava um processo de desmineralização/remineralização (des-re) dentária em uma situação de equilíbrio que não permitia o aparecimento da “doença” cárie (LIMA, 2007). Esses alimentos naturais, apesar de fornecerem uma fonte de carboidratos fermentáveis, também possuem substâncias com ação anti-metabólica, reduzindo esse efeito, além de conterem elementos que potencializam a remineralização, com uma ação anticariogênica, proporcionando este equilíbrio (CARVALHO, 2003). Além desse equilíbrio químico, os alimentos naturais têm uma ação mecânica durante a mastigação, realizando, naturalmente, um controle de placa e, por essas propriedades, eles não são considerados cariogênicos (CAVAZZOLA, 2003).

A manipulação dos alimentos naturais pelo ser humano fez com que muitas dessas propriedades ficassem prejudicadas, produzindo um desequilíbrio da biodiversidade da cavidade bucal, tornando-os cariogênicos (ZERO *et al.*, 2009). A cariogenicidade da dieta é determinada pela presença de carboidratos, principalmente a sacarose, que servem de substrato para que os micro-organismos da cavidade bucal

sintetizem polissacarídeos extracelulares com um importante papel na formação da placa e, também, na produção de ácidos orgânicos, que promovem a desmineralização do esmalte e podem desencadear o processo de cárie (AYELE *et al.*, 2013).

É importante considerar que a desmineralização, que ocorre após a ingestão de qualquer dieta cariogênica, acontece durante um determinado tempo, até que a capacidade tampão e ação remineralizadora da saliva paralise o processo. Tal fato não determina uma lesão de cárie e sim uma simples desmineralização reversível, mas, com a ingestão sistemática e cada vez mais freqüente de alimentos cariogênicos pelo ser humano, produzindo um desequilíbrio crescente da des-re, a cárie dentária estabelece-se na população mundial de uma forma endêmica, levando-se a concluir que a dieta seria um fator determinante da doença (AYELE *et al.*, 2013).

2.2 Epidemiologia

Durante as últimas décadas, houve um consenso mundial embasado em diversos relatos de que a cárie dental estava declinando de forma significativa em populações de todo o globo (HAN; KIM; PARK, 2010; LAURIS; BASTOS; BASTOS, 2012). A comunidade odontológica se motivou através dos recursos utilizados para tal redução como o uso sistêmico e tópico de fluoretos, cremes dentais, selantes oclusais, melhora na qualidade da dieta, educação em saúde bucal e cuidados em prevenção (BAGRAMIAN; GARCIA-GODOY; VOLPE, 2009).

Contudo, alguns estudos reportam um aumento alarmante no número de pacientes acometidos por lesões cariosas em determinadas partes do mundo. Esse aumento acomete tanto crianças como adultos, dentição decídua e permanente, e superfícies coronárias e radiculares (HALCROW *et al.*, 2013; ISAKSSON *et al.*, 2013; URZUA *et al.*, 2012). As questões emergentes no que se refere a cárie dentária são comumente relacionadas com as disparidades existentes nos diversos programas de saúde pública ao redor do mundo, o que converge em diferentes quadros epidemiológicos da doença (FRAZÃO, 2012; GREWAL; VERMA; KUMAR, 2011).

Um dos principais fatores que merece destaque é o impacto social no panorama da cárie dental para grupos específicos ao redor do mundo (URZUA *et al.*, 2012). Os aumentos do número de lesões de cárie ocorrem em grupos de menor poder socioeconômico, imigrantes e crianças. Muito embora as causas para tal aumento não

sejam precisas, é possível concluir que os benefícios da prevenção não estejam atingindo tais grupos (BAGRAMIAN; GARCIA-GODOY; VOLPE, 2009).

O último levantamento realizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (2011) através da Universidade de Malmö, evidenciou um aumento significativo do índice de Dentes Perdidos, Cariados ou Obturados (CPO-D) de 1,61, em 2004, para 1,67 (NATARAJAN, 2011). Apesar de aparentemente pequeno, esse aumento indica que possíveis problemas, no que se refere ao âmbito da prevenção, possam estar acontecendo (FRAZÃO, 2012).

Quando o mesmo levantamento é separado de acordo com os continentes avaliados, percebe-se que apenas os continentes da Europa e América do Norte apresentaram reduções nos seus índices CPO-D, enquanto que, nos outros continentes, é possível evidenciar que os índices de CPO-D aumentaram (QUADRO 1) (NATARAJAN, 2011).

Quadro 1: Índices de CPO-D em indivíduos de 12 anos especificados por região do globo.

CONTINENTES ANALISADOS	ÍNDICE CPO-D	
	2004	2011
África	1,15	1,19
América do Norte	2,76	2,35
América do Sul	1,58	1,63
Europa	2,57	1,95
Ásia	1,12	1,87
Oceania	1,39	1,48

Fonte: NATARAJAN, 2011.

No que se refere ao Brasil, o mesmo se enquadra, segundo classificação proposta pela OMS, com índices de prevalência moderados (TABELA 1) (BRASIL, 2011). Segundo alguns autores, essa melhora na qualidade da saúde bucal dos brasileiros se deve a implementação de diversas medidas de saúde pública no âmbito da prevenção (ALMEIDA *et al.*, 2012; TRAEBERT *et al.*, 2009).

Todavia, dentro do próprio país, tem-se que regiões se apresentam com índices moderados e outros com índices altos, segundo a OMS (TABELA 1) (BRASIL, 2011). Esse panorama retrata a própria desigualdade de acesso à atenção básica e prevenção entre as regiões do país, dentre elas, destacam-se as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste com os piores índices do país. Muito embora os índices referentes a essas regiões tenham declinado quando comparados com os de 2007, muito ainda precisa ser

feito para que o Brasil alcance título de “país com baixo índice de cárie” (BRASIL, 2011).

Tabela 1: Média do Índice CPO-D para o grupo etário de 12 anos e proporção dos componentes em relação ao CPO-D total, segundo regiões.

		Hígido	Cariado		Obt/Cariado		Obturado		Perdido		CPO-D	
Região	N	Média	Média	%	Média	%	Média	%	Média	%	Média	
12 anos de idade	Norte	1.703	22,69	2,13	67,4	0,14	4,4	0,65	20,6	0,24	7,6	3,16
	Nordeste	2.021	23,33	1,81	68,8	0,10	3,8	0,50	19,0	0,22	8,4	2,63
	Sudeste	1.339	23,30	0,78	45,3	0,07	4,1	0,77	44,8	0,11	6,4	1,72
	Sul	1.005	23,00	1,13	54,9	0,12	5,8	0,76	36,9	0,04	1,9	2,06
	Centro-Oeste	1.179	22,75	1,52	57,8	0,15	5,7	0,87	33,1	0,09	3,4	2,63
	Total	7.247	23,18	1,12	54,1	0,09	4,3	0,73	35,3	0,12	5,8	2,07

Fonte: BRASIL, 2011.

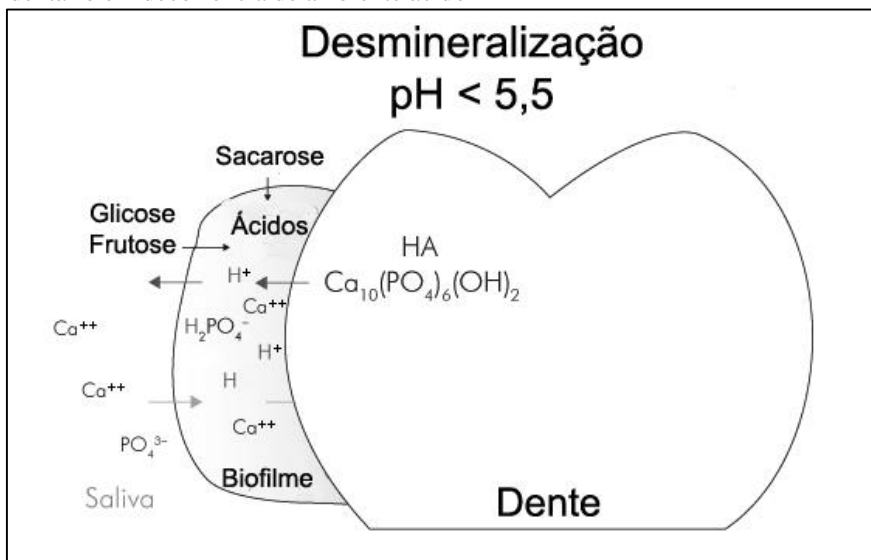
2.3 Processo Cariogênico

O processo de desenvolvimento das lesões cariosas é definido como dinâmico, complexo e, como já abordado, multifatorial. Para melhor se compreender o aparecimento de cavitações em estrutura dentária, deve-se ter em mente que o elemento dentário sofre constantes processos de desmineralização e remineralização, comumente denominado de processo des-re (CURY; TENUTA, 2009).

A cavidade oral, por ser um ambiente extremamente dinâmico, sofre constantemente variações de pH, sejam estas decorrentes do processo de alimentação ou refluxo do suco gástrico. As variações que induzem pHs ácidos acarretam alterações químicas e bioquímicas nas nanoestruturas que compõem tanto o esmalte quanto a dentina. Dessa forma, quando sítios susceptíveis são submetidos ao ataque de ácidos, os íons cálcio e fosfato responsáveis pela mineralização dos cristais de hidroxiapatita são solubilizados no meio bucal (FIGURA 1) (FEATHERSTONE, 2008).

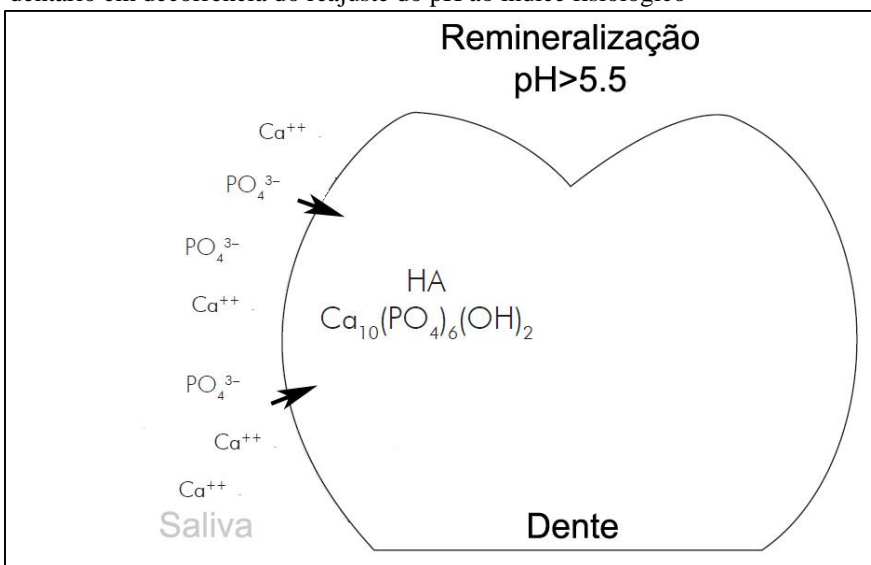
Contudo, tal processo ocorre rotineiramente e de forma rápida no meio oral, pois, devido à capacidade tampão da saliva, o pH rapidamente é restaurado ao seu índice fisiológico e a etapa de reparo (remineralização) se inicia. Nessa etapa, ocorre o caminho inverso, no qual os íons cálcio e fosfato solubilizados no meio oral são depositados na estrutura dentária (FEATHERSTONE, 2008) (FIGURA 2).

Figura 1: Desenho esquemático do processo de desmineralização do esmalte dentário em decorrência de ambiente ácido



Fonte: CURY; TENUTA, 2009.

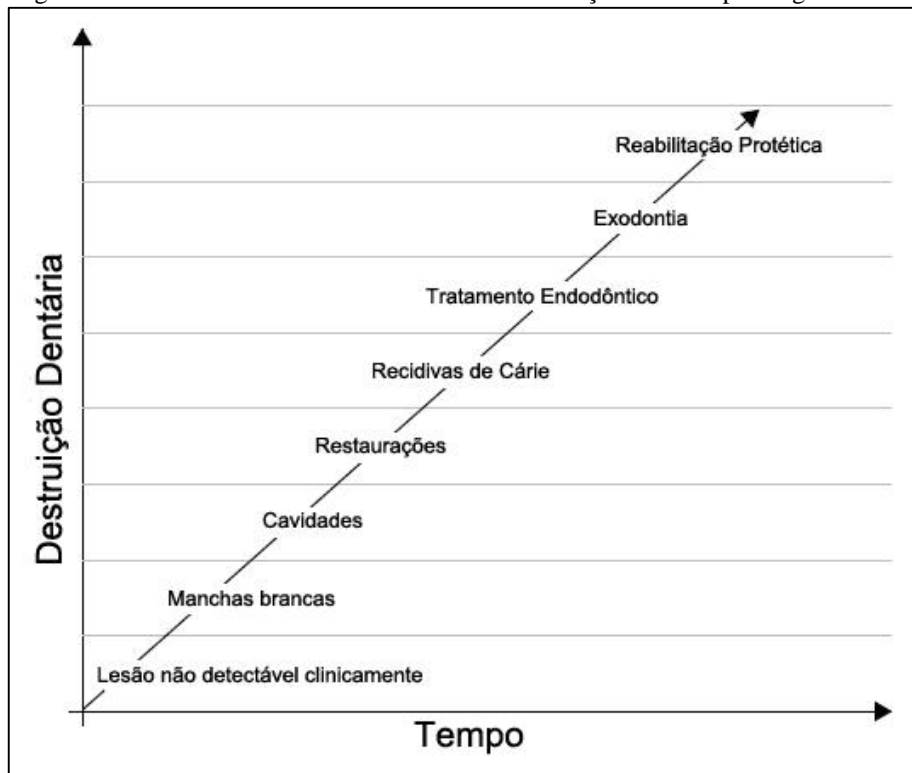
Figura 2: Desenho esquemático do processo de remineralização do esmalte dentário em decorrência do reajuste do pH ao índice fisiológico



Fonte: CURY; TENUTA, 2009.

No processo cariogênico, ocorre um desequilíbrio dessa equação formada entre as variáveis desmineralização e remineralização, em que, devido ao acúmulo bacteriano na superfície do dente e a liberação de produtos ácidos decorrentes da fermentação de açúcares, o processo de desmineralização é acentuado e acontece de forma contínua (CURY; TENUTA, 2009). Nessa etapa, além da solubilização da matriz composta por diversos minerais, ocorre a solubilização dos cristais de hidroxiapatita, principal componente do esmalte dentário. A sequência de sinais clínicos da cárie em função do tempo pode ser visualizada através da Figura 3 (FEATHERSTONE, 2008).

Figura 3: Sinais clínicos decorrentes da desmineralização dentária prolongada



Fonte: (CURY; TENUTA, 2009).

2.4 Prevenção

É sabido que a doença cárie é causada por uma inter-relação de diversos fatores que culminam na desmineralização dental (LIMA, 2007). Por ser considerada uma lesão de caráter crônico e irreversível, grande foco tem sido dado nos últimos anos para sua prevenção, haja visto que as técnicas intervencionistas convencionais não são capazes de devolver ao elemento acometido suas propriedades originais (PALOMBO, 2011).

Dessa forma, em virtude do caráter microbiológico associado à lesão, diversos autores enfatizam a importância da escovação e remoção mecânica dos biofilmes associados ao elemento dentário como modo mais eficaz para diminuição dos índices de cárie (CHOI *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2010). Entretanto, tal afirmativa ainda é motivo de discussão ao redor do mundo, devido ao fator “cooperação” intimamente atrelado ao indivíduo. Esse fator faz alusão aos déficits existentes na rotina de higiene oral dependentes de aspectos culturais, sociais e econômicos (LIU *et al.*, 2010; PENGPID; PELTZER, 2012).

Portanto, com o passar dos anos, outros métodos de controle de cárie foram desenvolvidos, de forma que os mesmos dependessem cada vez menos da cooperação do paciente, ou, ao menos, fossem mais eficazes quando das variações de utilização. Dentre esses, pode-se destacar os fluoretos e o gluconato de clorexidina.

2.4.1 Fluoretos

Os fluoretos são considerados como grandes auxiliares no combate à cárie dentária ao redor do mundo. Foram utilizados inicialmente de forma comercial no início da década de 1930, porém sem nenhum fator científico atrelado ao seu uso (DIEFENDERFER; STAHL, 2008).

Atualmente é utilizado em larga escala como adjuvante no processo de prevenção de lesões cariosas através de seu mecanismo de fortificação da matriz inorgânica do esmalte dentário (CURY; TENUTA, 2008). Esse mecanismo pode ser explicado através da reação química que ocorre durante o processo de remineralização dentária, no qual o flúor se liga à hidroxiapatita solubilizada no meio oral por meio da substituição de um dos radicais hidroxila, formando a fluorapatita, mais resistente ao processo de dissolução causado pelo pH ácido e, conseqüentemente, ao processo cariogênico (BUZALAF *et al.*, 2011).

Com a finalidade de se eliminar o fator “cooperação” por parte do indivíduo, adotou-se, em diversos países, a política pública de fluoretação das águas, na qual as águas de abastecimento domiciliar são previamente adicionadas de íons flúor (CURY; TENUTA, 2009). Esse método tem causado constantes discussões ao redor do mundo em virtude do risco de contaminação por excesso de flúor, o que pode gerar diversos quadros patológicos orais e/ou sistêmicos ao indivíduo (SAMPAIO; LEVY, 2011; WONG *et al.*, 2010). Além desse método, os fluoretos podem ser aplicados de forma tópica por profissional odontólogo, ou mesmo na forma de géis e cremes dentais para uso diário desde que em crianças maiores de 5 anos de idade (ELLWOOD *et al.*, 2008).

Entretanto, o uso do flúor por si só não se demonstra como um método suficientemente eficaz para o controle da cárie, haja visto que somente ele atua somente no fortalecimento da estrutura dentária. Vislumbrando esse aspecto, outros compostos quimicamente ativos começaram a ser utilizados como ferramenta sinérgica ao flúor, os antimicrobianos (PALOMBO, 2011).

2.4.2 *Gluconato de clorexidina*

O gluconato de clorexidina, ou somente clorexidina, é um agente antimicrobiano com ampla atividade sobre diversos micro-organismos, dentre os quais várias bactérias patogênicas de cavidade oral, e tem sido considerado como um potencial agente na prevenção da cárie dental (AUTIO-GOLD, 2008).

É considerado como agente padrão ouro contra diversas cepas microbianas orais ou de outros sítios tanto por possuir marcante atividade antimicrobiana, como também um efeito extremamente rápido, sendo capaz de gerar a morte bacteriana em apenas alguns minutos através tanto do comprometimento da membrana celular, como principalmente por interferência em vias metabólicas bacterianas essenciais (DOUGHTY-SHENTON *et al.*, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2011). Apesar de possuir diversas formulações e vias de administração, o seu uso em Odontologia é restrito atualmente aos colutórios orais na concentração de 0,12%, vindo a ser inicialmente utilizado de forma comercial na década de 1980, nos Estados Unidos (MIKKELSEN *et al.*, 1981).

Apesar de todas as suas vantagens, a clorexidina possui diversos efeitos adversos que limitam seu uso a médio/longo prazo. Dentre eles destacam-se a alteração de cor dos dentes, perda do paladar, ardência bucal, xerostomia e descamação da mucosa oral (AUTIO-GOLD, 2008). Dessa forma, o uso da clorexidina na cavidade oral tem sido direcionado para casos específicos em que o paciente apresenta quadros infecciosos mais graves ou apresenta dificuldades na higienização oral (VAN STRYDONCK *et al.*, 2012).

Nos últimos anos estudo apontam a importância da descoberta de outras moléculas tão ativas quanto a clorexidina, haja visto que determinadas cepas bacterianas já apresentam elevada resistência a essa substância (PALOMBO, 2011). Além disso, o elevado número de efeitos adversos associados ao uso contínuo da clorexidina inviabilizam esse agente como forma de prevenção da cárie dentária (JAMES; PARNELL; WHELTON, 2010).

Capítulo 3 – Revisão de literatura

Biofilmes Orais

3 BIOFILMES ORAIS

3.1 Aspectos Gerais

Os biofilmes são comunidades microbianas complexas estabelecidas em uma ampla variedade de superfícies que são geralmente associadas a uma matriz extracelular composta por vários tipos de biopolímeros (ABEE *et al.*, 2010). Esse tipo de associação microbiana pode se desenvolver em diversas superfícies, sejam essas bióticas ou abióticas. Locais como tecidos vivos, dispositivos médicos e/ou indústrias, sistemas de tubulação de água ou até mesmo ambientes marinhos podem se tornar propícios para o desenvolvimento de biofilmes. Na medicina, as superfícies, tais como dentes, catéteres, válvulas cardíacas e lentes de contato podem ser fortemente colonizadas (AKCALI *et al.*, 2013; ONURDAĞ, *et al.*, 2010; WILLCOX, 2013).

O crescimento e a proliferação do micro-organismo dentro de um biofilme fornece proteção contra a ação de antibióticos, proporcionando um mecanismo de defesa, diminuindo ou impedindo a penetração de diferentes agentes antimicrobianos através do biofilme (EPSTEIN *et al.*, 2011; SOTO, 2013), e assim, tornam-se extremamente difíceis ou impossíveis de erradicar (ALHEDE *et al.*, 2009; VAN GENNIP *et al.*, 2009).

No caso dos biofilmes patogênicos orais, diversos grupos de pesquisa têm direcionado esforços para a melhor compreensão tanto dos seus aspectos de formação e desenvolvimento, quanto no seu metabolismo e composição (APATZIDOU, 2012; ZIJNGE *et al.*, 2012). Tais estudos possuem, em geral, o objetivo final de desenvolver ferramentas eficazes no controle da microbiota responsável por diversas doenças orais (cáries, periodontite, candidíase, doenças cardíacas e pulmonares) (FIGURA 4).

Figura 4: Lesões orais mais prevalentes com etiologia microbiana. A) Lesão de cárie extensa; B) Periodontite de alto grau; C) Candidíase eritematosa em paciente portador de imunodeficiência.



Fonte: Arquivo do autor.

3.2 Processo de Formação dos Biofilmes Orais

O processo de desenvolvimento dos biofilmes orais é complexo e segue uma cronologia bastante criteriosa. Em geral, todas as bactérias orais possuem mecanismos de aderência à superfícies sólidas recobertas por películas salivares, como os dentes, ou superfícies descamativas, como o tecido epitelial, ou, até mesmo, a bactérias que já estão previamente aderidas à superfície (DANNE; DRAMSI, 2012; KOLENBRANDER, 2011).

A aderência de células microbianas a outras bactérias imobilizadas sobre uma superfície é chamada de coadesão, enquanto que a ligação de bactérias ou micro-organismos em suspensão é chamada de coagregação (KOLENBRANDER *et al.*, 2010). Dessa forma, a construção do biofilme oral é realizada inicialmente por determinadas estirpes bacterianas que possuem a capacidade de se aderir à película adquirida no esmalte dentário. Tais bactérias são chamadas de colonizadores iniciais e seus principais representantes são os *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus parasanguinis* e *Streptococcus gordonii* para os biofilmes predominantemente cariogênicos e outras bactérias do gênero Actinomicetes para os biofilmes periodontopatogênicos. Tal relação dos colonizadores iniciais com o processo patológico é advinda da própria seletividade bacteriana no sistema de coadesão, contudo, tal estratégia não impede a participação cruzada desses colonizadores iniciais nos processos patológicos (BEIER; QUIVEY; BERGER, 2012; KOLENBRANDER *et al.*, 2010).

Após a adesão inicial por parte dos colonizadores primários, o processo segue com a proliferação dessas células e o início da adesão de outras células com receptores de afinidade (adesinas e selectinas) que possuem a capacidade de se aderir seletivamente a outros micro-organismos (BADIHI-HAUSLICH, 2011). No processo cariogênico, o *Streptococcus mutans* e o *Streptococcus sobrinus* merecem uma atenção especial, enquanto que no processo periodontopatogênico se destacam o *Fusobacterium nucleatum* e a *Porphyromonas gingivalis* (KOLENBRANDER, 2011; KOLENBRANDER *et al.*, 2010). Devido a importância crucial desses microorganismos na sua sustentabilidade patogênica, vários estudos são voltados para a descoberta de novos métodos de se controlá-los.

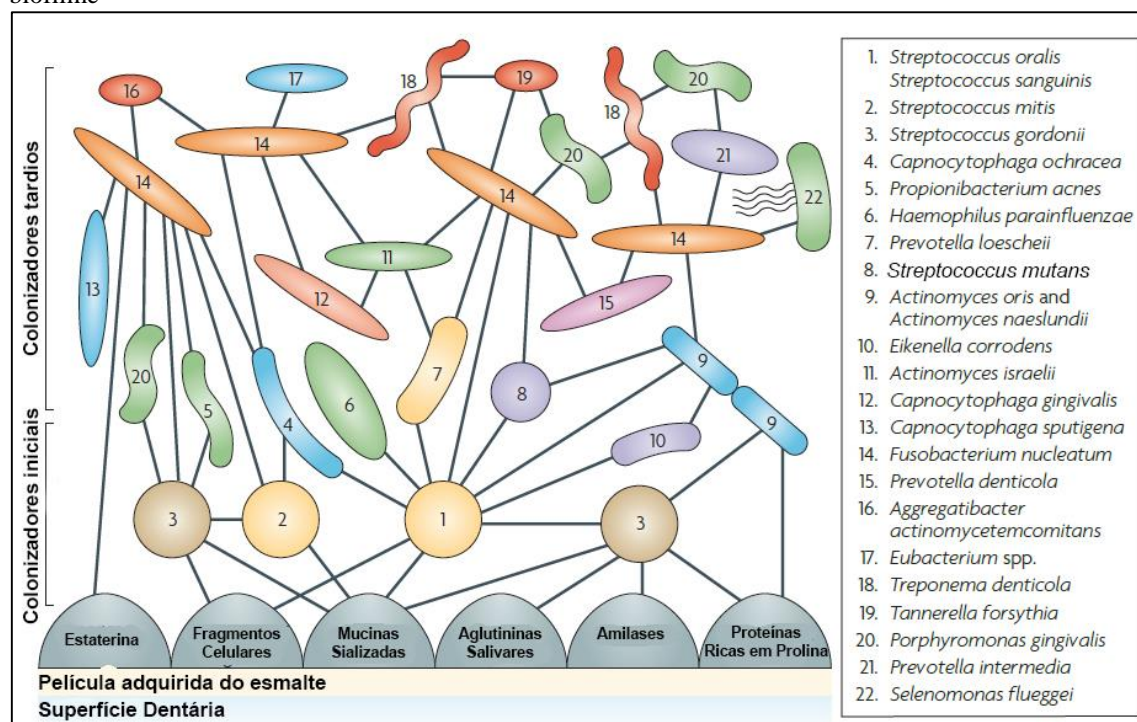
Apesar de não serem colonizadores iniciais do biofilme cariogênico, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* são os principais componentes

responsáveis pelo processo de formação da cavidade de cárie. Este fato se deve a capacidade tanto de produzir ácido que promove o processo de desmineralização dentária, como em sobreviver nos ambientes com pH ácido (BOWEN; KOO, 2011).

Já as bactérias periodontopatogênicas não possuem o potencial acidogênico, mas são capazes de formar biofilmes mais resistentes e secretar enzimas líticas que degradam o tecido periodontal (DEO; BHONGADE, 2010; TAKEUCHI *et al.*, 2011). Além disso, a característica mais predominante das bactérias periodontopatogênicas é a sua capacidade de sobrevivência em anaerobiose ou aerobiose facultativa (TENORIO *et al.*, 2011).

A medida que colonizadores secundários são gradativamente acumulados sobre o biofilme, unidades especializadas denominadas microcolônias começam a ser plenamente estabelecidas (KOLENBRANDER *et al.*, 2010). Essas microcolônias são estruturas fundamentais para o funcionamento metabólico e organizacional do biofilme, como será abordado a seguir. Na figura abaixo, pode-se evidenciar um esquema organizacional didático referente à estruturação em biofilmes das bactérias que residem em ambiente oral (FIGURA 5).

Figura 5: Modelo espaço temporal de colonização bacteriana em cavidade oral, no qual se evidencia a interação entre os receptores moleculares presentes na superfície bacteriana e as diversas moléculas presentes na película adquirida do esmalte, além das interações específicas célula-célula presentes no biofilme



Fonte: KOLENBRANDER *et al.*, 2010.

3.3 Metabolismo do Biofilme

Para um completo desenvolvimento e maturação dos biofilmes tanto presentes em cavidade oral como na grande maioria dos ambientes, os substratos metabólicos precisam estar disponíveis para as células do biofilme, para assim possibilitar seu crescimento. Tais compostos encontram-se geralmente solubilizados em saliva pois são frequentemente frutos do processo digestivo do próprio hospedeiro (CCAHUANA-VÁSQUEZ; CURY, 2010; FIELD *et al.*, 2010).

Grande parte da diversidade metabólica de um biofilme pode ser explicada pelos diferentes solutos químicos presentes no ambiente. Biofilmes maduros possuem um gradiente de concentração de substratos e de produtos metabólicos (BABAUTA *et al.*, 2012; KOLEY *et al.*, 2011). Dessa forma, podem haver regiões no interior do biofilme em que o crescimento bacteriano e a atividade metabólica são inibidos ou retardados devido à limitação de substrato. Além disso, o acúmulo de resíduos ácidos no interior do biofilme poderiam reduzir o pH local e afetar diretamente as respostas fisiológicas e metabólicas de algumas bactérias (BABAUTA *et al.*, 2012).

Quando as bactérias utilizam glicoproteínas como fonte de açúcar, estas lançam mão de exoglicosidases em combinação com um sistema de transporte de açúcar, além de enzimas glicolíticas específicas para cada carboidrato. Açúcares podem ser translocados para o citoplasma por vários sistemas de transporte (LIU *et al.*, 2012). Um dos mais importantes é o sistema fosfotransferase (PTS), o qual possui um papel regulador fundamental no controle do metabolismo de carbono em bactérias, gram-positivas e negativas. PTS também controla outros sistemas de transporte, metabolismo e armazenagem de fontes de carbono e de nitrogênio. O sistema de transporte de açúcar regulado pela PTS é do tipo simporte prótons-açúcar e Na⁺-açúcar (AJDIC; CHEN, 2012; LIU *et al.*, 2012). O objetivo final é uma utilização eficiente da oferta limitada de carbono e recursos energéticos.

A presença de sacarose permite a aderência de estreptococos do grupo mutans e conseqüentemente a colonização da superfície lisa do esmalte dental, favorecendo seu posterior acúmulo (AIRES *et al.*, 2008). Esses micro-organismos não só fermentam a sacarose como, a partir desta, sintetizam polissacarídeos extracelulares (KLEIN *et al.*, 2012). Na polimerização desses açúcares participam as enzimas denominadas glicosiltransferases (Gtfs), para as glicanas, e frutossiltransferases (Ftfs), para as frutanas, que são essenciais para expressão da virulência (FELDMAN *et al.*,

2009; YOUSEFI *et al.*, 2012). Essas enzimas atuam na produção de glicanos solúveis e insolúveis em água que servem de reserva energética intracelular, fonte de carbono, e também como um aderente para facilitar a formação do biofilme (BANAS; BISWAS; ZHU, 2011).

3.4 Matriz Extracelular Polimérica

Biofilmes são formados principalmente por células microbianas e substâncias extracelulares poliméricas, mais conhecidas como exopolissacarídeos ou simplesmente EPS. Essas substâncias podem ser responsáveis por 50% a 90% do carbono orgânico total do biofilme (KUBONIWA *et al.*, 2012) e podem ser consideradas o principal componente da matriz do biofilme. O EPS, formado principalmente de polissacarídeos, pode variar segundo as propriedades químicas e físicas, como a solubilidade em água. Alguns desses carboidratos são neutros ou polianiónicos, como é o caso do EPS de bactérias gram-negativas, por conta da presença de ácidos urônicos, D-glucurônico, D-galacturônico, e outros (XIAO *et al.*, 2012). No caso de algumas bactérias gram-positivas, tais como os estafilococos, a composição química do EPS pode ser bastante diferente, mas com características catiónicas. Muitas vezes, a composição e a quantidade de EPS variarão dependendo do tipo de microorganismos, da idade do biofilme e das diferentes condições ambientais em que os biofilmes são formados (KUBONIWA *et al.*, 2012). Estes incluem diferentes níveis de oxigênio e de nitrogênio, de pH, de temperatura e de disponibilidade de nutrientes (AHIMOU *et al.*, 2007).

Segundo Xiao e colaboradores (2012) o EPS pode ter um efeito significativo sobre a organização do biofilme. A composição dos polissacarídeos determina sua conformação primária. Por exemplo, muitos EPS possuem estruturas com o esqueleto principal formado por resíduos de hexoses com ligações β -1,3 ou β -1,4, com isso tendem a possuir uma estrutura mais rígida e resistente, com pouca ou nenhuma solubilidade em água (XIAO *et al.*, 2012).

O crescimento de um biofilme é o resultado de um processo complexo que envolve o transporte de compostos orgânicos, moléculas inorgânicas e células microbianas, uma posterior adesão em uma superfície e finalmente, a formação de um consórcio bacteriano auxiliado pela produção de polímeros extracelulares (IRIE *et al.*, 2012). Assim como a hidrofobicidade celular e a presença de fímbrias e de flagelos, o

grau de produção de EPS é um dos principais fatores que influencia a taxa e o grau de adesão de células microbianas em diferentes superfícies, além de proteger contra o estresse ambiental e desidratação (VU *et al.*, 2009). Devido à sua importância na formação do biofilme, a produção EPS tem sido alvo de diversas pesquisas para impossibilitar o processo de formação e de maturação dessas comunidades microbianas (MURRAY *et al.*, 2009; NAGORSKA *et al.*, 2010; VU *et al.*, 2009).

3.5 Comunicação Celular em Biofilmes

A comunicação entre micro-organismos imersos no biofilme, sejam esses da mesma espécie ou de espécies distintas, é mediada por diferentes sinais químicos que são sintetizados e secretados por tais micro-organismos (LI; TIAN, 2012). Esses sinais podem estar relacionados a densidade celular ou populacional (*Quorum-sensing*) ou simplesmente por sinais produzidos por bactérias em diferentes estágios de crescimento, como alguns ácidos graxos secretados por alguns colonizadores iniciais quando estão em sua fase estacionária (LEE; JAYARAMAN; WOOD, 2007; WATERS; BASSLER, 2005). Uma importante diferença entre esses dois tipos de sinais é que os tipo *quorum-sensing*, amplamente conhecidos como autoindutores, são utilizadas por bactérias como modo de comunicação célula-célula de uma dependente de sua concentração. Enquanto outros sinais bacterianos não são restritos por tais requisitos (WATERS; BASSLER, 2005).

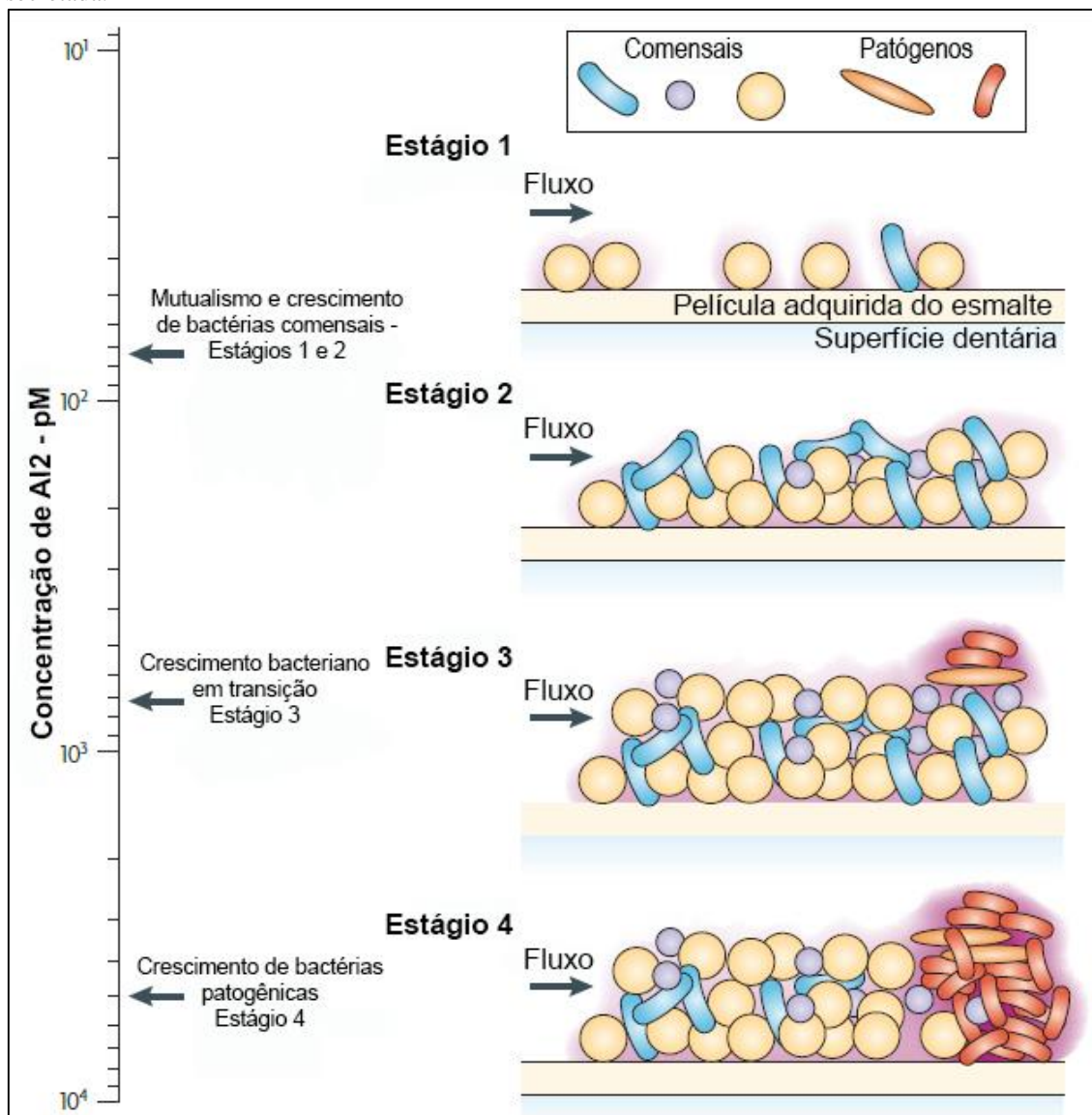
Os sistemas de comunicação celular tipo *quorum-sensing* foram originalmente descobertos na bactéria marinha *Vibrio fischeri* como um método envolvido no controle de produção de luz (NEALSON, 1977). Contudo, esse sistema tem sido identificado amplamente em diferentes gêneros bacterianos, como as *Pseudomonas*, *Escherichia*, e *Streptococcus* (LEE; JAYARAMAN; WOOD, 2007). Com relação a este último gênero, diversos pesquisadores relacionam o processo de desenvolvimento de biofilmes patogênicos à secreção de moléculas autoindutoras, dentre elas, a AI2 (CUADRA-SAENZ *et al.*, 2012; HARDIE; HEURLIER, 2008).

A molécula sinalizadora AI2 tem sido proposta como uma das principais atuantes no processo de formação de biofilmes orais (KOLENBRANDER *et al.*, 2010). Em estudo produzido por Rickard e colaboradores (2006) foi verificado que em cepas de *S. oralis* que não possuíam os genes responsáveis pela produção de AI2, o crescimento em conjunto com outras bactérias patogênicas era irrisório. Entretanto,

quanto da secreção da mesma molécula, tanto um aumento no processo de coagregação era visualizado, como também um aumento na produção de matriz extracelular polimérica (RICKARD *et al.*, 2006).

Em modelo proposto por Kolenbrander e colaboradores (2010) é possível visualizar como o processo de indução por concentração afeta o crescimento de biofilmes patogênicos orais (FIGURA 6).

Figura 6: Modelo de relação entre a sucessão microbiana em biofilmes orais e a quantidade de AI2 secretada.



Fonte: KOLENBRANDER *et al.*, 2010.

3.6 Aspectos Genéticos de Biofilmes

Os biofilmes orais são compostos por uma gama de micro-organismos com relativa diferença entre as espécies (ABEE *et al.*, 2010). A transição de um biofilme não-patológico para um biofilme patológico envolve várias alterações ambientais, como a adição de sacarose na dieta do hospedeiro, que influenciam de forma dramática a composição microbiana e bioquímica do biofilme (KOLENBRANDER *et al.*, 2010). Além disso, a própria alteração do modo de vida bacteriano de planctônico para em biofilmes é um fator que afeta de forma direta a expressão gênica dos micro-organismos envolvidos. Essa alteração de expressão gênica, associada com as espécies bacterianas envolvidas na colonização, influenciam tanto no tipo de patologia associada à cavidade oral (cárie ou doença periodontal), bem como na virulência do biofilme formado (SHEMESH; TAM; STEINBERG, 2007).

Dentre as bactérias de biofilmes cariogênicos, a espécie *Streptococcus mutans* tem sido ressaltada como uma das cepas mais importantes no processo de desmineralização dental em virtude do seu potencial acidúrico e acidogênico. Além disso, o perfil de expressão gênica dessa espécie, quando associadas a biofilmes, muda significativamente, principalmente no que se refere a produção de enzimas e/ou proteínas de membrana (SHEMESH; TAM; STEINBERG, 2007).

Em estudo realizado por Shemesh, Tam e Steinberg (2007), foi verificado que quando a cepa de *S. mutans* UA159 está associada em biofilmes, uma variação na expressão de 243 genes é notada, dentre os quais 139 são up-regulados e 104 são down-regulados. Neste mesmo artigo foi evidenciado que grande parte dos genes up-regulados estão diretamente relacionados com o transporte transmembranar de moléculas (Transportadores ABC, Proteínas ligantes a ATP e Proteínas ligantes ao Ferricromo); com o metabolismo energético ou produção de bacteriocinas; e ainda com a produção de matriz extracelular polimérica (Glicosiltransferases) (SHEMESH; TAM; STEINBERG, 2007).

Todas as mudanças de cunho genético expressas pelas bactérias patogênicas de cavidade oral evidenciam uma associação entre as mesmas, culminando no aumento da resistência à agentes antimicrobianos, bem como de fatores ambientais, além de propiciar mecanismos de equilíbrio populacional dentro do próprio biofilme (KOLENBRANDER *et al.*, 2010).

Capítulo 4 – Revisão de literatura

Peptídeos Antimicrobianos

4 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

4.1 Aspectos Gerais

Entre os anos de 1920 e 1950, diversos compostos com propriedades antimicrobianas foram isolados de secreções de vários seres vivos como aracnídeos, anfíbios, vegetais e humanos (FLEMING, 1922; STUART; HARRIS, 1942). Tais compostos apresentavam atividade biológica em pequenas concentrações, além de exibir uma peculiar seletividade por bactérias Gram positivas e Gram negativas. Estes foram denominados de peptídeos antimicrobianos (AMPs) e descritos como moléculas capazes de inibir ou retardar o crescimento de micro-organismos invasores, a fim de contribuir com os mecanismos naturais de imunidade adaptativa do hospedeiro (NAKATSUJI; GALLO, 2012).

Ao longo dos últimos anos, o estudo dos AMPs como uma nova classe de agentes terapêuticos antimicrobianos tem atraído interesse considerável de diversos centros de pesquisa (SILVA *et al.*, 2012). Tal interesse é amplamente justificado pelo rápido aumento da incidência de micro-organismos patogênicos resistentes às drogas convencionais, o que representa um importante problema de saúde pública ao redor do mundo (SOTO, 2013).

Devido à complexidade e interesse no tema, nosso grupo de pesquisa revisou recentemente a literatura científica com o intuito de melhor definir o uso de peptídeos antimicrobianos como ferramenta de controle de micro-organismos patogênicos em cavidade oral. Neste estudo, foram avaliados artigos publicados e indexados nas bases de dados Pubmed durante o período de janeiro de 2002 a dezembro de 2011, publicando-se alguns resultados importantes e elucidativos para construção do pensamento científico e elaboração da presente proposta (SILVA *et al.*, 2012). Alguns resultados evidenciados em tal levantamento são abordados a seguir.

Na Tabela 2, evidencia-se o significativo crescimento no número de estudos que envolvem AMPs, os quais, quando relacionados a micro-organismos orais, eram pouco avaliados nos oito anos iniciais do período aqui estudado. Entretanto, no último biênio, um grande salto na quantidade de publicações é constatado. Pode-se sugerir que o avanço nas técnicas de obtenção e purificação, além das constantes pesquisas sobre tais moléculas, são os principais fatores que ocasionaram este aumento quantitativo.

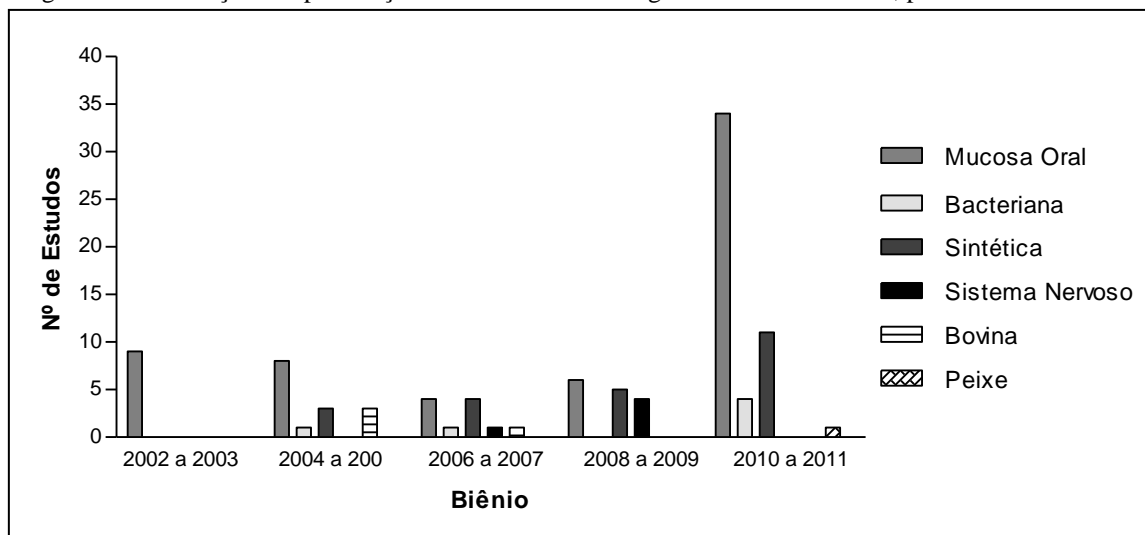
Tabela 2: Distribuição das publicações relacionadas a AMPs contra micro-organismos orais de 2002 a 2011, por biênio.

	Valor absoluto (n)	Valor relativo (%)	Valor relativo acumulativo (%)
2002 a 2003	9	12.4	12.4
2004 a 2005	9	12.4	24.8
2006 a 2007	11	15	39.8
2008 a 2009	12	16.4	56.2
2010 a 2011	32	43.8	100
Total	108	100	

Fonte: SILVA *et al.*, 2012.

Associado aos fatores previamente citados, a direta relação dos AMPs com o sistema imunológico das mucosas orais pode ser o responsável pelos resultados mostrados na Figura 7, a qual destaca a grande influência dos peptídeos antimicrobianos oriundos da cavidade oral sobre os estudos mais recentemente publicados. Além desse grupo de peptídeos, os AMPs de origem sintética ocupam um lugar de crescente importância nos estudos microbiológicos, sendo a classe de peptídeos mais estudada logo depois dos peptídeos de cavidade oral.

Figura 7: Distribuição das publicações de acordo com a origem do AMP estudado, por biênio.



Fonte: SILVA *et al.*, 2012.

4.2 Peptídeo Hilina-a1

O peptídeo antimicrobiano Hilina-a1 (Hy-a1) foi primeiramente isolado por Castro e colaboradores (2009) através da secreção da pele do sapo arbóreo *Hypsiboas*

albopunctatus. No mesmo estudo, diversas análises referentes à sua estrutura primária e secundária, além de seu potencial efeito antimicrobiano.

Esse novo peptídeo, teve sua estrutura primária determinada sem ambiguidade por degradação de Edman automatizada e consiste de uma cadeia polipeptídica linear de 18 resíduos de aminoácidos: IFGAILPLALGALKNLIK. Análise por espectrometria de massa evidenciou a presença de um peptídeo altamente puro e sugeriu a presença de um resíduo de aminoácido α -amidado em região C-terminal, devido a uma diferença de massa de 1 amu entre a massa molecular monoisotópica teórica determinada de sua sequência e os resultados experimentais determinados por análise de espectrometria de massa. Modificações pós-traducionais ocorrem comumente nos peptídeos antimicrobianos de anuros e, entre eles, a amidação do C-terminal é um processo comum e necessário para prover a atividade biológica de diversos peptídeos bioativos. Dessa forma, a presença dessa amidação contribui para a carga positiva geral da molécula e, provavelmente, possui influência direta na atividade biológica da mesma (SHALEV; MOR; KUSTANOVICH, 2002).

Quanto a sua estrutura secundária, segundo as metodologias empregadas pelos autores, evidenciou-se uma conformação em alfa-hélice de caráter anfipático com os resíduos hidrofílico e hidrofóbico em sítios opostos da hélice (CASTRO *et al.*, 2009).

No que se refere a sua atividade antimicrobiana, o peptídeo Hy-a1 se mostrou efetivo contra diversas cepas Gram-positivas e Gram-negativas. Contudo, a sua atividade se mostrou mais acentuada em bactérias Gram-positivas (*S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212 e *B. subtilis* ATCC 19659), além de uma ação bastante significativa em cepas fúngicas, fato este que evidencia seu amplo espectro de ação (CASTRO *et al.*, 2009).

4.3 Peptídeos Sintéticos

Muito embora os peptídeos antimicrobianos de origem nativa tenham se mostrado significativamente superior à diversas drogas comerciais no que se refere à resistência microbiana à múltiplas drogas, o desenvolvimento de AMPs naturais carece de princípios químicos referentes aos seus desenhos e, geralmente, não ocorrem de forma sistemática (WIRADHARMA *et al.*, 2011). É bastante comum a descoberta de novos peptídeos de forma randômica e através de métodos de tentativa e erro. Além disso, indícios provenientes de pesquisa recente aponta que peptídeos com sequências

muito similares aos produzidos pelo organismo humano podem prejudicar o funcionamento correto do mesmo (SOM *et al.*, 2008).

Dessa forma, os peptídeos de origem não-natural (sintéticos) foram desenvolvidos para ampliar o arsenal de AMPs viáveis para utilização tanto em ensaios *in situ* como *in vivo*. Em geral são obtidos por modificação e/ou “otimização” das sequências do peptídeo nativo com a finalidade de se melhorar seus efeitos antimicrobianos, enquanto, em paralelo, procura-se reduzir seu potencial efeito citotóxico contra células humanas (WIRADHARMA *et al.*, 2011).

Uma das primeiras tentativas de se obter uma classe sintética de AMPs de forma sistematizada foi demonstrada por Jorge, Lourenço e Pereira (2012) em estudo no qual foram descritas regras para síntese peptídica análogas às “regras gramaticais” para se descrever certas semelhanças observadas das diversas bases de dados acerca de AMPs. Tais regras foram utilizadas como algoritmos para produzir permutações de diferentes sequências primárias de peptídeos não-naturais (JORGE; LOURENÇO; PEREIRA, 2012).

Dentre as diversas fontes de AMPs, as glândulas granulares de anuros representam uma das mais ricas reservas naturais de AMP na natureza. Recentemente, Castro e colaboradores (2009) isolaram um peptídeo chamado Hilina-A1 (Hy-a1, IFGAILPLALGALKNLIK-NH₂), o primeiro peptídeo citolítico isolado da pele do sapo arbóreo comum na região da América do Sul *Hypsiboas albopunctatus*. Tal peptídeo exibiu uma atividade citolítica significativa frente a eritrócitos humanos, bem como propriedades antibacterianas e antifúngicas (CASTRO *et al.*, 2009).

Contudo, tendo em vista que a atividade biológica dos AMPs está frequentemente associada com o número de cargas positivas em sua sequência, incluindo o grupo N-terminal, além da diminuição de sua citotoxicidade, Crusca Jr e colaboradores (2011) sintetizaram diversos análogos do peptídeo Hy-a1 que foram capazes de manter sua ação antimicrobiana, dentre eles, o peptídeo Lys-[Trp6]-Hy-A1 (Lys-a1). Para a obtenção deste peptídeo análogo, foram realizadas duas modificações no peptídeo original (Hilina-a1), uma substituição simples foi realizada na posição 6, Leu por Trp, devido ao Triptofano ser considerado um fluoróforo natural, o que possibilitou a realização de ensaios de permeabilidade de membrana; e uma substituição no N-terminal, adicionando-se uma Lisina, o que confere uma carga positiva nessa extremidade. Como esperado, o aumento do número de cargas positivas no peptídeo melhorou sua atividade antimicrobiana em comparação ao peptídeo nativo, além de um

espectro de ação amplo contra cepas Gram-positivas e Gram-negativas (CRUSCA *et al.*, 2011).

4.4 Mecanismo de Ação

Os mecanismos de ação dos AMPs ainda não estão completamente esclarecidos. Todavia, algumas teorias sobre as formas de atuação dessas moléculas sobre a membrana celular e o metabolismo bacteriano têm sido sugeridas através de métodos como microscopia associada à fluoróforos, difração circular, espectrometria de massa e estudos com modelos de membrana (BOLINTINEANU; VIVCHARUK; KAZNESSIS, 2012; BROGDEN, 2005; PAULSEN *et al.*, 2013). Dentre os principais mecanismos de atividade biocida sugeridos, têm-se os modelos de morte celular por via extracelular e os modelos por via intracelular (BROGDEN, 2005).

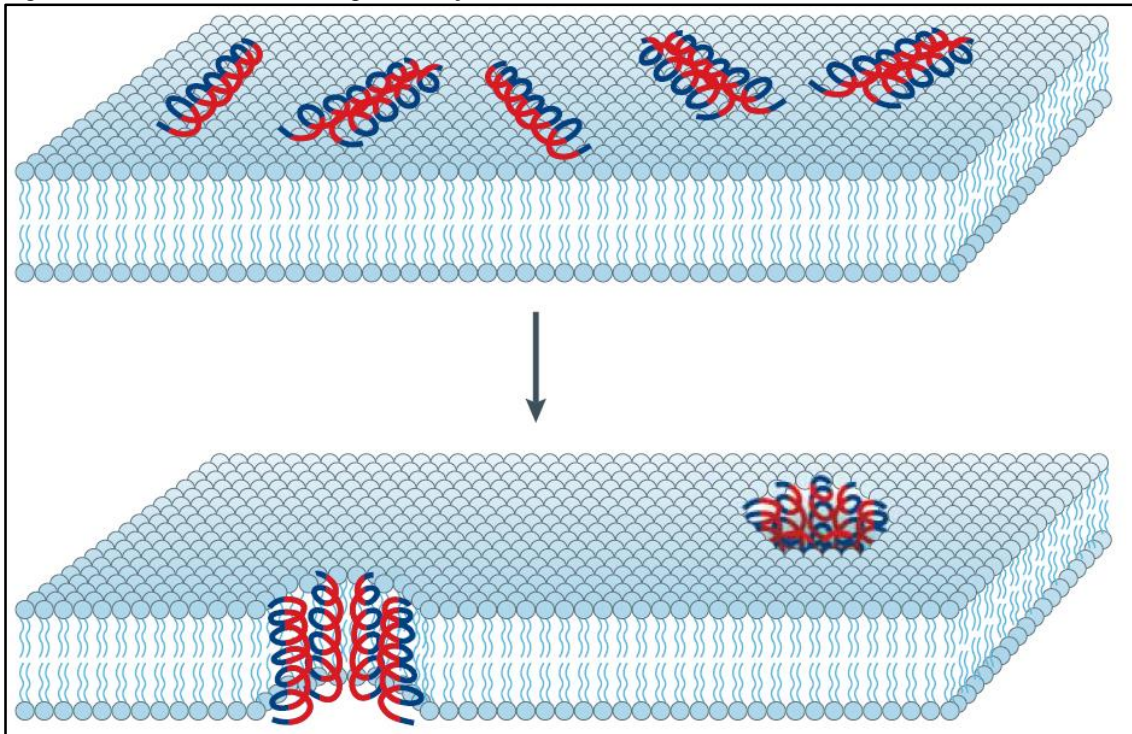
No que concerne aos modelos por via extracelular, os AMPs são inicialmente atraídos à superfície do micro-organismo por interações eletrostáticas entre o peptídeo aniônico ou catiônico e estruturas na superfície celular. No caso de bactérias Gram-negativas, as principais interações ocorrem entre peptídeos catiônicos e a rede de cargas negativas presente no envelope bacteriano – fosfolipídios aniônicos e grupo fosfato nos lipopolisacarídeos. Enquanto que, em bactérias Gram-positivas, a principal relação é estabelecida pelos ácidos teicóicos da superfície celular (BOLINTINEANU; VIVCHARUK; KAZNESSIS, 2012).

Após a atração inicial, os AMPs se ligam à superfície celular e iniciam a fase de ligação, fase esta responsável por realizar a travessia dos AMPs através da membrana externa (lipopolisacarídeos nas bactérias Gram-negativas e ácidos teicóicos e lipoteicóicos nas Gram-positivas) e permitir que os AMPs interajam diretamente com a membrana citoplasmática bacteriana (BOLINTINEANU; VIVCHARUK; KAZNESSIS, 2012).

Em baixas proporções peptídeo/lipídio, os AMPs são ligados de forma paralela à bicamada lipídica. A medida que tal proporção aumenta, os peptídeos iniciam a sua orientação de forma perpendicular à membrana. Quando as proporções de peptídeo/lipídios estão elevadas, os AMPs iniciam sua penetração na membrana celular, o que gera a formação de poros transmembrana que, posteriormente, acarretam na morte celular por perda de líquido citoplasmático e rompimento membranar por micelização (PAULSEN *et al.*, 2013).

Apesar de aparentemente simples, alguns modelos explicativos têm sido propostos para melhor entender a dinâmica da morte gerada por dano membranar. O modelo de barril ou “barrel-stave” sugere o arranjo de peptídeos em sentido transmembranar organizados em um formato de “barril”, o que permite o fluxo de conteúdo intracelular para o meio externo (GKEKA; SARKISOV, 2010) (FIGURA 8).

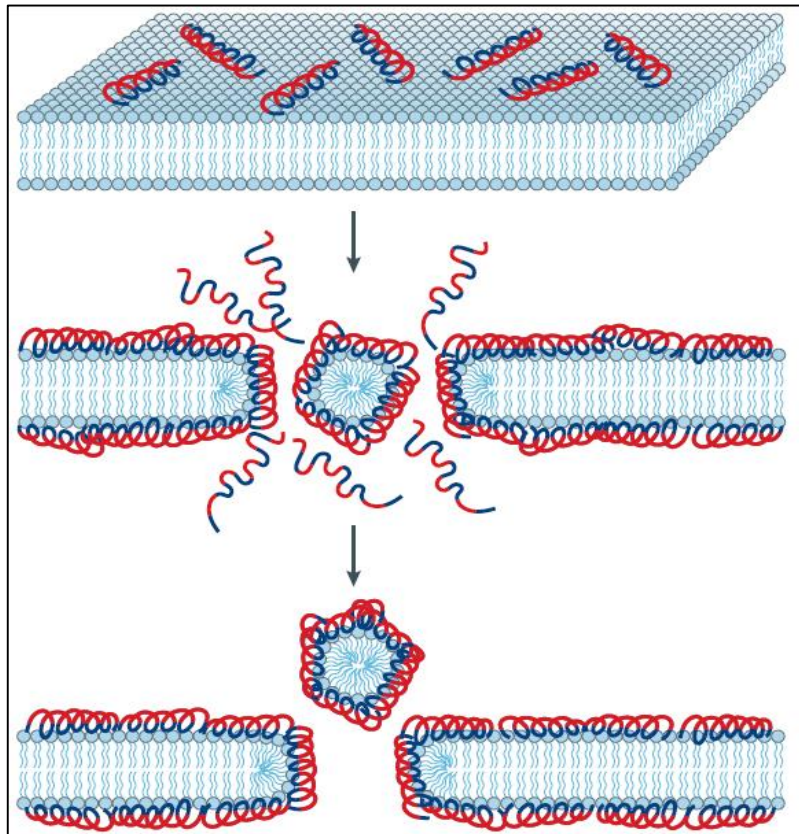
Figura 8: Modelo “barrel-stave” para indução da morte bacteriana via AMP.



Fonte: BROGDEN, 2005.

Já o modelo de tapete ou “carpet model” ocorre um acúmulo de peptídeos na superfície da bicamada lipídica. Os peptídeos são atraídos de forma eletrostática pelas extremidades aniônicas fosfolipídicas em diversos sítios recobrendo a membrana celular de uma maneira semelhante a um tapete. Em altas concentrações, os peptídeos são induzidos a penetrar na membrana celular e romper a integridade da mesma de uma forma semelhante aos detergentes, levando eventualmente a formação de micelas. Em concentrações críticas, os peptídeos formam cavidades toroidais transientes na membrana, o que permite o acesso de mais peptídeos à membrana. Por fim, a membrana se desintegra e forma micelas após o rompimento da curvatura da bicamada (LEE *et al.*, 2011) (FIGURA 9).

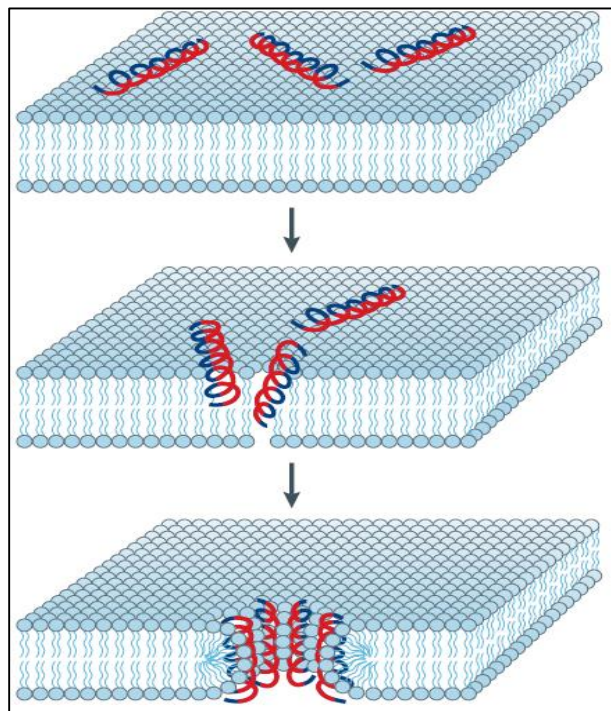
Figura 9: Modelo estilo “carpet model” para indução da morte bacteriana via AMP.



Fonte: BROGDEN, 2005.

Por fim, o modelo de poro toroidal ou “toroidal-pore model” indica que a inserção das hélices dos AMPs na membrana induz a ligação de uma das monocamadas lipídicas à outra contraposta de forma contínua e bilateral, em que o núcleo aquoso é estabelecido por ambos, peptídeo inserido e extremidade lipídica. Na formação de poros toroidais, a face polar do peptídeo se associa com a superfície polar estabelecida pelas extremidades fosfolipídicas da membrana celular. Esse modelo se diferencia do modelo “barrel-stave” já que os peptídeos estão sempre associados às extremidades polares da monocamada, até

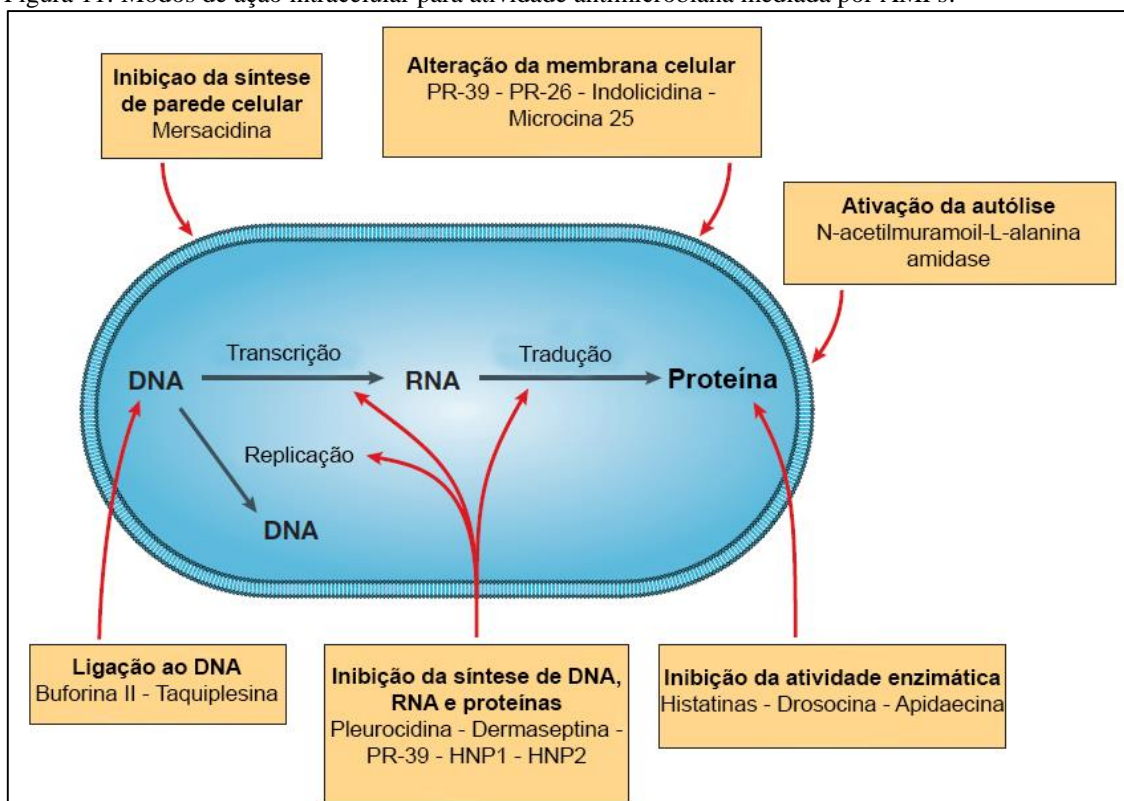
Figura 10: Modelo “Toroidal-pore” para indução da morte bacteriana via AMP.



mesmo quando organizadas perpendicularmente na bicamada celular (BOZELLI *et al.*, 2011) (FIGURA 10).

Muito embora a lise da membrana celular leve à morte bacteriana, um aumento no número de estudos que relatam a existência de outros métodos de morte celular, é notável. Pesquisas recentes revelaram a presença de alvos intracelulares importantes para a morte celular. Como exemplos de tais atividades têm-se a inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas, geralmente relacionada com a pleurocidina, α -defensina-1 e α -defensina-2, e a inibição da atividade enzimática, associada com as histatinas (HALE; HANCOCK, 2007; MARR; MCGUIRE; MCMASTER, 2012; TEIXEIRA; FEIO; BASTOS, 2012) (FIGURA 11).

Figura 11: Modos de ação intracelular para atividade antimicrobiana mediada por AMPs.



Fonte: BROGDEN, 2005.

Não obstante às descrições de dano à membrana serem variáveis, elas estão, muito provavelmente, interrelacionadas. Brogden (2005) apontou que tais mecanismos não se apresentam de forma independente, mas sim correlacionadas e graduais. Porém, diversos fatores podem estar intimamente associados à efetividade e especificidade do peptídeo, tais como o seu tamanho, sequência de aminoácidos, carga, estrutura e conformação, hidrofobicidade e anfipaticidade (BROGDEN, 2005).

4.4 Vantagens e Limitações

Apesar de todas as vantagens dos AMPs aqui evidenciadas, como a sua atividade em baixas concentrações e amplitude de espectro de ação, algumas limitações acerca do seu uso terapêutico ainda são foco de pesquisas na atualidade (SILVA *et al.*, 2012). Uma dessas limitações é que, muito embora a maioria dos AMPs catiônicos tenha alta atividade em condições não-fisiológicas, na presença de fluidos biológicos como plasma, soro ou saliva, a atividade antimicrobiana é significativamente reduzida por vários mecanismos. Essa característica, associada às inadequadas margens de segurança devido à alta toxicidade de alguns AMPs e a rápida excreção renal, dificultam ou impossibilitam o uso de algumas dessas moléculas por via parenteral (BATONI *et al.*, 2011).

Alguns métodos têm sido empregados com o intuito de se minimizar tais limitações, como o desenho de peptídeos modificados que possuam as mesmas características antimicrobianas do AMP original, mas com seus domínios citotóxicos alterados, o que confere maior biocompatibilidade com os tecidos humanos (BATONI *et al.*, 2011). Além disso, peptídeos com alvo específico têm sido empregados em pesquisas recentes. Tais moléculas se constituem de peptídeos modificados com domínios de reconhecimento específico para um determinado grupo de microorganismos. Essa característica possibilita a atuação do AMP em um determinado sítio sem alterar a microbiota natural de outro local (HE *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2010).

Capítulo 5 – Objetivos

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

- Avaliar o potencial do peptídeo Lys-[Trp6]-Hy-a1 (Lys-a1), análogo do peptídeo antimicrobiano Hy-a1, no controle de crescimento microbiano e formação de biofilmes monoespécie de bactérias cariogênicas de cavidade oral.

5.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer a atividade antimicrobiana do peptídeo Lys-a1 contra o crescimento planctônico de cepas de *Streptococcus oralis* ATCC 10557; *Streptococcus salivarius* ATCC 7073; *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556; *Streptococcus parasanguinis* ATCC 903; *Streptococcus mutans* ATCC 25175; *Streptococcus sobrinus* ATCC 6715;
- Avaliar o potencial antimicrobiano do peptídeo Lys-a1 sobre a formação inicial de biofilmes monoespécie das estirpes supracitadas;
- Analisar a atividade do peptídeo Lys-a1 sobre o biofilme inicial formado pelas cepas bacterianas supracitadas.

Capítulo 6 – Materiais e Métodos

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Cepas bacterianas e condições de cultivo

As cepas bacterianas *Streptococcus mutans* ATCC, *Streptococcus sobrinus* ATCC, *Streptococcus oralis* ATCC, *Streptococcus sanguis* ATCC, *Streptococcus parasanguinis* ATCC e *Streptococcus salivarius* ATCC foram cultivados em meio Brain Heart Infusion (BHI; Difco, Detroit, MI) caldo suplementado com 1% de sacarose. Todas as cepas foram cultivadas de forma individual após inóculo inicial em 5 mL de meio BHI suplementado estéril por 24h, a 37 °C e 10% CO₂. Após esse período inicial, uma nova alíquota foi removida e inoculada em 5 mL de meio BHI suplementado estéril sob as mesmas condições. Contudo, nessa segunda etapa, as células bacterianas em fase de crescimento exponencial de acordo com curva de crescimento previamente realizada foram diluídas às concentrações de 1×10^6 UFC.mL⁻¹ em BHI suplementado para os experimentos referentes a atividade antimicrobiana; e de 2×10^7 UFC.mL⁻¹ para os experimentos referentes a atividade antibiofilme.

6.2 Síntese, purificação e preparação do peptídeo

O peptídeo Lys-a1 foi devidamente sintetizado e purificado segundo metodologia publicada pelos autores em artigo publicado recentemente (CRUSCA *et al.*, 2011). O peptídeo foi devidamente solubilizado em água estéril deionizada com 0,1% de C₂H₄O₂ à concentração de 1000 µg.mL⁻¹ previamente ao uso e armazenado em freezer -20 °C.

6.3 Ensaio de atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana de Lys-a1 foi feito segundo o teste de microdiluição em placas de poliestireno de 96 poços de fundo em “U” padronizada segundo a norma de aplicação global desenvolvida mediante o processo consensual do CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2010).

Cada poço da placa foi inicialmente preenchido com 0,1mL de meio BHI estéril suplementado com 1% de sacarose com exceção da primeira coluna, a qual, foi preenchida com 0,2 mL do peptídeo teste na concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Em seguida realizou-se diluições seriadas na base dois para obtenção de diferentes concentrações (1.95 a 1.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) em um volume final de 0,1 mL. Depois deste processo, 0,1 mL de células (1×10^6 UFC.mL⁻¹) ajustadas segundo item anterior foi adicionado a cada poço, obtendo-se um volume final de 0,2 mL. Gluconato de Clorexidina 0,12% e meio de cultura BHI suplementado estéril foram adicionados a poços separados como controles positivo e negativo, respectivamente.

As placas foram incubadas a 37 °C com 10% CO₂ por 24 horas. Após incubação foi feito a medida de turbidez de cada poço com o auxílio do espectrofotômetro (Sunrise - Tecam) à 620 nm. Foi considerado CIM (Concentração Mínima Inibitória) a menor concentração de Lys-a1 capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano.

Para determinação da CBM (Concentração Microbicida Mínima) foi inoculado 10 μL dos poços que não houve um crescimento microbiano visível em placas de petri com meio BHI ágar. Foi considerado CBM a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento microbiano nas placas.

6.4 Ensaio de atividade antibiofilme

O ensaio de formação de biofilme microbiano foi realizado segundo a metodologia descrita por O'toole e Kolter (1998), em placas de poliestireno de fundo “chato” com algumas modificações. As placas foram preparadas da mesma forma do ensaio de atividade antimicrobiana. Contudo, para cada ensaio, duas placas eram utilizadas, uma para quantificação da biomassa e outra para contagem de UFC's (Unidades Formadoras de Colônias) aderidas a placa.

6.4.1 *Quantificação de biomassa*

Após as 24 horas de incubação à 37 °C, as placas foram lavadas três vezes com água destilada estéril e em seguida adicionado 200 μL de álcool metílico P.A para fixação das células aderidas. Após a retirada do metanol, 200 μL de cristal violeta 0,1%

foram adicionados por 15 minutos. Esse processo foi realizado para permitir uma quantificação indireta da formação de biofilme através da coloração com cristal violeta. Em seguida, o processo de lavagem foi repetido e a placa colocada, sob temperatura ambiente, por 1 hora para secagem. Para a dissolução do corante preso ao biofilme, foram adicionados 200 μL de ácido acético 33% por 15 minutos. A suspensão obtida foi transferida para outra placa de 96 poços estéril e a medida da absorbância de cada poço foi realizada com o auxílio do espectrofotômetro (Sunrise - Tecam) à 590nm.

6.4.2 Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

Após as 24 horas de incubação à 37 °C, as placas foram lavadas três vezes com água destilada estéril para remoção das células fracamente aderidas. Em seguida, em cada poço da placa foram adicionados 200 μL de solução de NaCl 0,9% estéril e levado para o banho de ultrassônico (Sonicor/SC-52) por 6 minutos para a liberação das células formadoras do biofilme. O volume de cinco poços foram removidos, com movimento up-down, e reunidos em um eppendorf estéril perfazendo um volume final de 1 mL. Em uma nova placa de 96 poços foi realizada a diluição na base dez da suspensão de células para posterior plaqueamento. Em seguida as placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas. Após a contagem do número de colônias crescidas em cada placa, foi feita a correção do número de células, multiplicado o número de CFU na placa pela diluição, expressando o valor em número de UFC.mL⁻¹.

6.5 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata com os respectivos resultados categorizados em Microsoft Excel (Versão 2012 para Windows) e posterior análise estatística no software GraphPad Prism (Versão 5.0 para Windows). Para a análise de diferenças inter-grupos foi realizado teste de ANOVA com pós-teste de Bonferroni e nível de significância de $p < 0,001$.

Capítulo 7 – Resultados

7 RESULTADOS

7.1 Atividade antimicrobiana

O peptídeo Lys-a1 exerceu atividades antimicrobianas diferentes para as diversas cepas orais (TABELA 3). Os valores de CIM variaram de 3,9 a 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ enquanto os valores de CBM variaram de 3,9 a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. *S. salivarius* e *S. parasanguinis* foram claramente mais susceptíveis a atividade antimicrobiana do peptídeo Lys-a1. Contudo, *S. mutans* evidenciou uma resistência marcante a atuação da mesma molécula, muito embora o padrão no qual os valores de CBM foram de 1 a 2 vezes maiores que os valores de CIM ter sido evidenciado para todas as estirpes.

Tabela 3: Susceptibilidade *in vitro* dos micro-organismos orais testados frente ao peptídeo Lys-a1.

Micro-organismo	Fonte	Intervalo de CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Intervalo de CBM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
<i>Streptococcus oralis</i>	ATCC 10557	15,6	31,25 - 500
<i>Streptococcus salivarius</i>	ATCC 7073	7,8	15,6 - 500
<i>Streptococcus sanguinis</i>	ATCC 10556	15,6	31,25 - 500
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	ATCC 903	3,9	3,9 - 500
<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 25175	125	250 - 500
<i>Streptococcus sobrinus</i>	ATCC 6715	15,6	31,25 - 500

Fonte: Arquivo do próprio autor.

7.2 Atividade antibiofilme

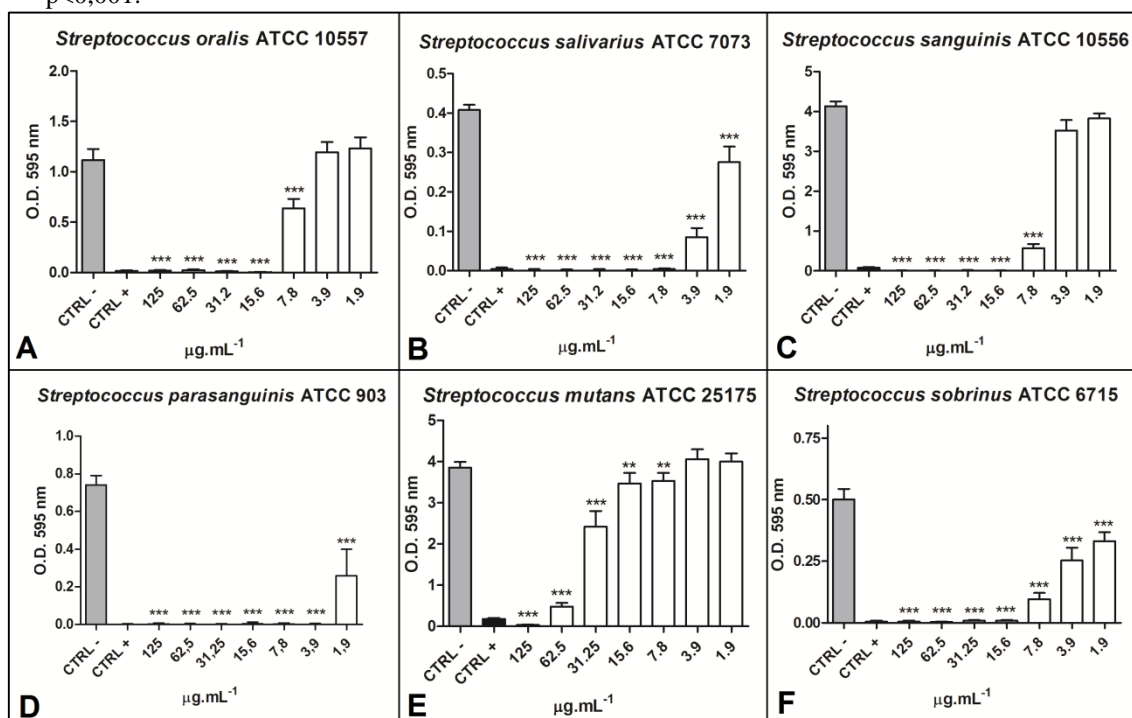
Os resultados acerca da atividade antibiofilme do peptídeo Lys-a1, assim como no tópico sobre metodologia, foram divididos em “*Quantificação de biomassa*”, ensaio com a finalidade de avaliar de forma indireta a quantidade de biofilme formado; e em “*Contagem de Unidades Formadoras de Colônias*”, teste que permite uma análise mais criteriosa dos efeitos da substância teste sobre o biofilme formado.

7.2.1 Análise de quantificação de biomassa

Nos ensaios de atividade biológica sobre a formação de biofilmes de bactérias orais, a amostra testada demonstrou interferência sobre o crescimento do

biofilme durante 24 horas. As análises dos dados mostram diferença estatística $p < 0,001$ em relação ao controle negativo (FIGURA 12).

Figura 12: Atividade antibiofilme do peptídeo Lys-a1 frente às cepas bacterianas analisadas (A-F). Substância teste (□), Controle negativo (■) e Gluconato de Clorexidina 0.12% (■). ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$.



Fonte: Arquivo do próprio autor.

O peptídeo antimicrobiano Lys-a1 evidenciou potencial de inibição na formação de biofilmes em todas as espécies bacterianas testadas. Contudo, variações nas concentrações ativas foram encontradas. Para as bactérias *S. oralis*, *S. sanguinis* e *S. sobrinus* as concentrações a partir de $15,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram eficazes na redução de 98-100% de biofilme microbiano, não evidenciando diferença estatística do controle positivo (FIGURA 12A, 12C e 12F).

No que concerne à espécie *S. parasanguinis*, a mesma se mostrou mais susceptível à atividade da molécula teste, achado semelhante ao encontrado nos ensaios de atividade antimicrobiana (FIGURA 12D). Contudo, a concentração de $1,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi capaz de reduzir em mais de 70% a formação de biofilme. Tal achado também foi evidenciado frente a *S. salivarius*, porém na concentração de $3,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (FIGURA 12B).

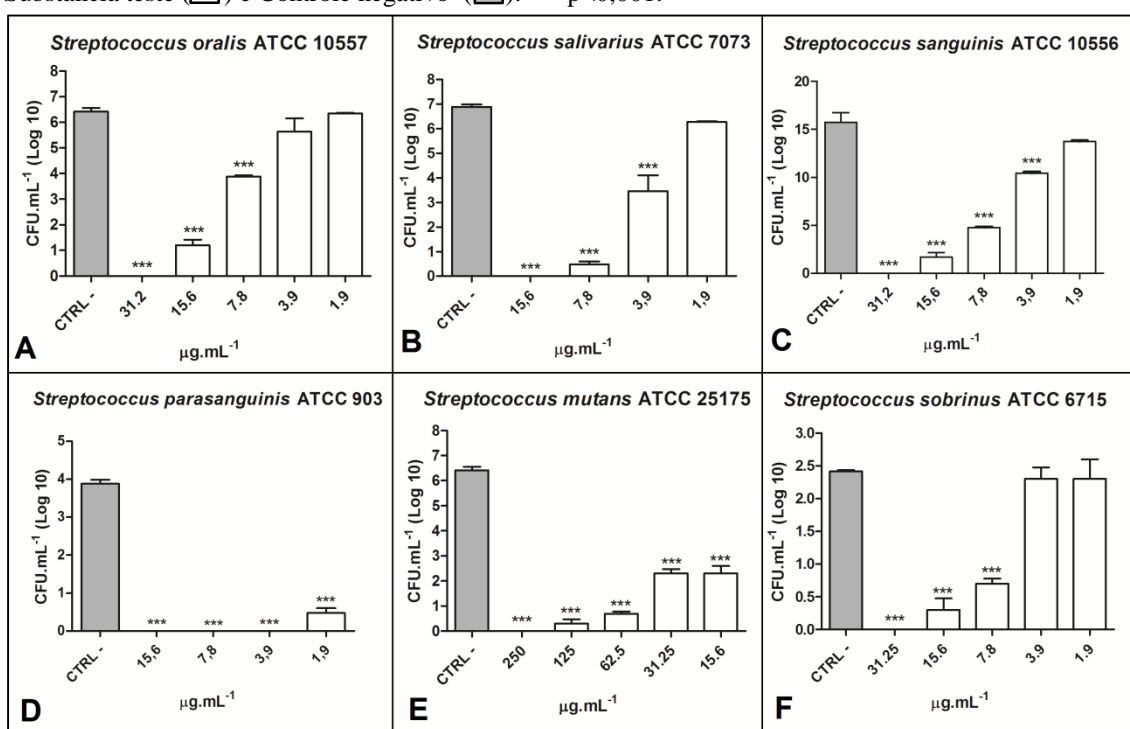
Por fim, *S. mutans*, assim como nos resultados pertinentes à atividade antimicrobiana, se mostrou mais resistente à atividade do peptídeo testado. Nas

concentrações 7,8 a 62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, Lys-a1 interferiu de forma significativa a formação de biofilme com diminuição da biomassa variando entre 10 – 88%, respectivamente. As concentrações a partir de 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram as mais eficazes frente a esta bactéria, gerando redução de biomassa em 99%, não apresentando diferença estatística do controle positivo.

7.2.2 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias

A contagem das unidades formadoras de colônias foi realizada somente nas concentrações abaixo do CBM já que, nas concentrações maiores, não haveria colônias viáveis para contagem devido à atividade bactericida do peptídeo. Os resultados encontrados no que tange a este ensaio são mostrados na Figura 13.

Figura 13: Atividade antibiofilme do peptídeo Lys-a1 frente às cepas bacterianas analisadas (A-F). Substância teste (□) e Controle negativo (■). *** $p < 0,001$.



Fonte: Arquivo do próprio autor.

De forma semelhante aos ensaios anteriores, o peptídeo Lys-a1 exerceu atividade em modelo dose-resposta frente a todas as espécies microbianas testadas. *S. parasanguinis* mostrou alta susceptibilidade ao agente teste, o qual, em concentração de

1,9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi capaz de reduzir de forma significativa a quantidade de células bacterianas viáveis.

S. mutans, muito embora tenha evidenciado potencial resistência frente a Lys-a1, teve a sua quantidade de células viáveis diminuída pelo mesmo. Em concentrações menores (15,6 e 31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), o peptídeo antimicrobiano reduziu em aproximadamente 60% o número de células. Quantidade essa que reduziu ainda mais a medida que as concentrações aumentaram (apenas 9,6% e 4,3% de células para as concentrações de 62,5 e 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente).

Capítulo 8 – Discussão

8 DISCUSSÃO

A resistência a antibióticos por parte de micro-organismos em infecções crônicas é um fenômeno bem definido e de crescente preocupação por parte de clínicos e pesquisadores ao redor do mundo (SIBLEY *et al.*, 2009). O aparecimento emergente e em ampla escala de estirpes bacterianas resistentes, como *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (MRSA) e enterococos vancomicina-resistentes (VRE), tem proporcionado um dilema terapêutico, especialmente em pacientes com déficits imunológicos (CALFEE, 2012).

No caso das bactérias orais, um fator agravante no que tange a resistência a agentes antimicrobianos pode ser elencado. Tal fator é a capacidade dessas bactérias se desenvolverem em biofilmes (KOLENBRANDER *et al.*, 2006). Estudos ressaltam que bactérias hábeis no desenvolvimento de biofilmes possuem uma taxa de resistência a antibióticos de até 10 vezes maior (KOLENBRANDER *et al.*, 2006, 2010). Tal propriedade se dá devido a mecanismos específicos como a comunicação intra- e inter-espécies (*Quorum sensing*) efetivando a produção de enzimas inativadoras dos agentes antimicrobianos, assim como a própria barreira física formada pela matriz polimérica extra-celular que diminui o contato direto entre molécula ativa e micro-organismo (SOTO, 2013; KOLENBRANDER *et al.*, 2010).

Nesse foco, os AMPs aparecem como uma classe de moléculas com grande potencial de aplicação como agentes antimicrobianos por sua alta atividade em baixas concentrações e baixo índice de resistência bacteriana (CORBIN *et al.*, 2011).

Estudo recente ressalta o crescimento no número de estudos acerca do uso de peptídeos antimicrobianos no controle de micro-organismos patogênicos de cavidade oral (SILVA *et al.*, 2012). Além disso, os mesmos autores ressaltaram o crescente número de pesquisas com peptídeos antimicrobianos sintéticos, devido sua atuação mais específica e, em geral, menos tóxicos ao ser humano.

O peptídeo antimicrobiano Lys-a1, utilizado neste estudo, foi previamente descrito por Crusca Jr e colaboradores (2011). Neste peptídeo, foram realizadas duas modificações no peptídeo original (Hilina-a1), uma substituição simples foi realizada na posição 6, Leu por Trp, e uma substituição no N-terminal, adicionando-se uma Lisina, o que confere uma carga positiva nessa extremidade. Como esperado, o aumento do número de cargas positivas no peptídeo melhorou sua atividade antimicrobiana em

comparação ao peptídeo nativo, além de um espectro de ação amplo contra cepas Gram-positivas e Gram-negativas (CRUSCA *et al.*, 2011).

Em nosso estudo, os resultados encontrados com o peptídeo teste corroboraram com os dados previamente publicados por Crusca Jr. e colaboradores (2011). Lys-a1 apresentou atividade antimicrobiana em baixas concentrações na maioria das cepas bacterianas analisadas. Destaque deve ser dado à atividade contra as bactérias *S. sanguis*, *S. salivarius*, *S. oralis* e, de uma forma mais acentuada, *S. parasanguinis*, todas colonizadoras iniciais do biofilme oral.

As bactérias denominadas como colonizadoras iniciais do biofilme oral são de extrema importância para o desenvolvimento dos processos patológicos atrelados aos biofilmes (KOLENBRANDER *et al.*, 2006). Tais micro-organismos desempenham papel de ancoragem bacteriana, pois, ao se ligarem de forma específica à superfície dental, possibilitam a interação de outras bactérias com potencial acidogênico ou de destruição de fibras colágenas que desencadeiam o processo de carie e periodontite, respectivamente (KOLENBRANDER *et al.*, 2010).

Dentre os colonizadores iniciais, o *Streptococcus parasanguinis* desempenha papel fundamental para o processo de desenvolvimento do biofilme cariogênico. Tal papel é desempenhado por uma série de genes relacionados à produção de proteínas de ligação, como o gene Fap1, responsável pela produção de fímbrias encarregadas da adesão do próprio micro-organismo à superfície dentária (GARNETT *et al.*, 2012; GENG *et al.*, 2012); e o gene BapA1, responsável pela ligação direta entre colonizador inicial e colonizador secundário, contribuindo para o desenvolvimento do biofilme (LIANG *et al.*, 2011). Dessa forma, destaca-se a notável atividade antimicrobiana e antibiofilme de Lys-a1 sobre tal espécie, o que confere ampla aplicabilidade no controle de biofilmes orais em estágio inicial de formação.

Outra cepa bacteriana que apresentou susceptibilidade significativa ao peptídeo testado foi o *Streptococcus sobrinus*. Tal resultado merece atenção devido ao papel indiscutível dessa espécie no processo de desmineralização do tecido dentário (OKADA *et al.*, 2005). Embora muita atenção seja dada ao *S. mutans* devido suas habilidades acidúricas e acidogênicas, estudos atuais reforçam que outras bactérias, dentre elas o *S. sobrinus*, atuam em mutualismo potencializando e acelerando o processo de desmineralização dental (GROSS *et al.*, 2012). Além disso, *S. sobrinus* têm a capacidade de resistir a ambientes com baixo pH e produzir enzimas que auxiliam de

forma direta a resistência do biofilme microbiano à agentes antimicrobianos e fatores agressores do ambiente (OKADA *et al.*, 2011).

Lys-a1 apresentou atividade antimicrobiana contra a cepa cariogênica *S. mutans* em concentrações mais elevadas ($>250 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Tal resultado, apesar de contrastante com o de outros peptídeos sintéticos (ECKERT; SULLIVAN; SHI, 2012; HE *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2012), pode ser explicado por diversos mecanismos inerentes dessa espécie que podem influenciar em sua maior tolerância ao peptídeo. Mecanismos esses como a up-regulação de genes ligados a transportadores ABC (MbrA, B, C e D) (MIKAMI *et al.*, 2011); e a resistência a antimicrobianos como o CiaRH, responsável por produção de mutacina, desenvolvimento de competência, tolerância ácida e a estresse e formação de biofilmes (MAZDA *et al.*, 2012).

Em estudo realizado por Napimoga e colaboradores (2004) foram recolhidas diferentes amostras microbiológicas de sítios cariados de indivíduos com diferentes riscos para o desenvolvimento da cárie dental. Após análises dessas amostras, pode-se verificar que, as principais cepas encontradas eram da espécie *S. mutans* UA159 e ATCC 25175. Entretanto, quando da inter-relação da espécie presente com o fator de risco de cárie, evidenciou-se uma relação direta da cepa ATCC 25175 com as lesões mais agressivas e aos pacientes com alto índice de cárie. Além disso, após comparação genotípica de três cepas da mesma espécie (ATCC 25175, UA159 e T8), notou-se, na cepa ATCC 25175, uma ampla gama de mecanismos ligados à resistência microbiana não presente na cepa menos agressiva (NAPIMOGA *et al.*, 2004). Esses achados corroboram com os resultados encontrados no presente estudo, no que se refere à atividade antimicrobiana somente em maiores concentrações.

Quanto à atividade antibiofilme, o peptídeo teste se mostrou altamente eficaz. O mesmo apresentou atividade de inibição na formação de biofilme em concentrações semelhantes às do CIM. Contudo, mesmo em concentrações sub-inibitórias, Lys-a1 foi capaz de interferir de forma significativa na formação de biofilme em todas as cepas testadas. Diversos outros peptídeos sintéticos e naturais já evidenciaram potencial de atividade antibiofilme, em geral, sob baixas concentrações (HE *et al.*, 2009; HUA; SCOTT; DIAMOND, 2010; LIU *et al.*, 2011). Tal fato pode estar relacionado à atividade intrínseca dos peptídeos catiônicos de atuação sobre a membrana plasmática, o que interfere diretamente no metabolismo celular e processo de agregação bacteriana para formação de biofilmes (BATONI *et al.*, 2011).

A provável up-regulação, mencionada anteriormente, de genes relacionados à produção de biofilme em *S. mutans* pode ser sugerida ao se observar o resultado referente à “Contagem de Unidades Formadoras de Colônias”. Neste gráfico, percebe-se que houve uma diminuição da quantidade de células viáveis nas concentrações menores ($15,6 - 31,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) enquanto que, nessas mesmas concentrações, uma quantificação de biomassa semelhante ao controle negativo foi evidenciada. Este achado sugere que, sob estresse do agente antimicrobiano, as células remanescentes e, conseqüentemente, mais tolerantes, aumentam a produção de matriz polimérica extra-celular como um mecanismo de defesa ao agente agressor. Tal achado também foi evidenciado por Liu e Burne (2009) e por Wu e colaboradores (2010).

Capítulo 9 – Conclusões

9 CONCLUSÕES

Após elucidação e análise dos resultados encontrados em nosso estudo, pode-se concluir que o peptídeo antimicrobiano Lys-a1 possui marcante atividade antimicrobiana e antibiofilme contra as cepas *Streptococcus oralis* ATCC 10557; *Streptococcus salivarius* ATCC 7073; *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556; *Streptococcus parasanguinis* ATCC 903; *Streptococcus mutans* ATCC 25175; *Streptococcus sobrinus* ATCC 6715, fatos estes que o tornam um potencial agente biotecnológico no controle de micro-organismos envolvidos no processo cariogênico.

Contudo, maiores estudos acerca dos mecanismos de ação do peptídeo sobre a membrana celular bacteriana precisam ser realizados com vista a total compreensão de sua atividade e vislumbre de possíveis modificações em sua estrutura para aumento de atividade antimicrobiana e diminuição de citotoxicidade.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAS, J. A.; GRIFFEN, A. L.; DARDIS, S. R.; LEE, A. M.; OLSEN, I.; DEWHIRST, F. E.; LEYS, E. J.; PASTER, B. J. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. **J Clin Microbiol.**, v. 46, n. 4, p. 1407-1417, abr. 2008.
- ABEE, T.; KOVÁCS, A. T.; KUIPERS, O. P.; VAN DER VEEN, S. Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. **Curr Opin Biotechnol.**, v. 22, p. 1-8, nov. 2010.
- AHIMOU, F.; SEMMENS, M. J.; HAUGSTAD, G.; NOVAK, P. J. Effect of protein, polysaccharide, and oxygen concentration profiles on biofilm cohesiveness. **Appl Environ Microbiol.**, v. 73, p. 2905-2910, set. 2007.
- AIRES, C. P.; DEL BEL CURY, A. A.; TENUTA, L. M.; KLEIN, M. I.; KOO, H.; DUARTE S.; CURY, J. A. Effect of starch and sucrose on dental biofilm formation and on root dentine demineralization. **Caries Res.**, v. 42, p. 380-386, set. 2008.
- AJDIC, D.; CHEN, Z. A novel phosphotransferase system of *Streptococcus mutans* is responsible for transport of carbohydrates with α -1,3 linkage. **Mol Oral Microbiol.**, v. 25, n. 2, p. 15-22, set. 2012.
- AKCALI, A.; HUCK, O.; TENENBAUM, H.; DAVIDEAU, J. L.; BUDUNELI, N. Periodontal diseases and stress: a brief review. **J Oral Rehabil.**, v. 40, n. 1, p. 60-68, jan. 2013.
- AL-DAJANI, M.; LIMEBACK, H. Emerging science in the dietary control and prevention of dental caries. **J Calif Dent Assoc.**, v. 40, n. 10, p. 799-804, out. 2012.
- ALHEDE, M.; BJARNSHOLT, T.; JENSEN, P. O. *Pseudomonas aeruginosa* recognizes and responds aggressively to the presence of polymorphonuclear leukocytes. **Microbiology.**, v. 155, p. 3500-3508, fev. 2009.
- ALMEIDA, T. F.; VIANNA, M. I.; CABRAL, M. B.; CANGUSSU, M. C.; FLORIANO, F. R. Family context and incidence of dental caries in preschool children living in areas covered by the Family Health Strategy in Salvador, Bahia State, Brazil. **Cad Saude Publica.**, v. 28, n. 6, p. 1183-1195, jun. 2012.
- APATZIDOU, D. A. Modern approaches to non-surgical biofilm management. **Front Oral Biol.**, v. 15, p. 99-116, 2012.
- AUTIO-GOLD, J. The Role of Chlorhexidine in Caries Prevention. **Oper Dent.**, v. 33, n. 6, p. 710-716, dez. 2008.
- AYELE, F. A.; TAYE, B. W.; AYELE, T. A.; GELAYE, K. A. Predictors of Dental caries among children 7-14 years old in Northwest Ethiopia: a community based cross-sectional study. **BMC Oral Health.**, v. 13, n. 7, p. 12-17, jan. 2013.

- BABAUTA, J. T.; NGUYEN, H. D.; HARRINGTON, T. D.; RENSLOW, R.; BEYENAL, H. pH, redox potential and local biofilm potential microenvironments within *Geobacter sulfurreducens* biofilms and their roles in electron transfer. **Biotechnol Bioeng.**, 2v. 109, n. 10, p. 2651-2662, out. 2012.
- BADIHI-HAUSLICH, L.; SELA, M. N.; STEINBERG, D.; ROSEN, G.; KOHAVI, D. The adhesion of oral bacteria to modified titanium surfaces: role of plasma proteins and electrostatic forces. **Clin Oral Implants Res.**, v. 13, p. 21-32, dez. 2011.
- BAGRAMIAN, R. A.; GARCIA-GODOY, F.; VOLPE, A. R. The global increase in dental caries. A pending public health crisis. **Am J Dent.**, v. 22, n. 1, p. 3-8, fev. 2009.
- BANAS, J. A.; BISWAS, S.; ZHU, M. Effects of DNA methylation on expression of virulence genes in *Streptococcus mutans*. **Appl Environ Microbiol.**, v. 77, n. 20, p. 7236-7242, out. 2011.
- BATONI, G.; MAISETTA, G.; BRANCATISANO, F. L.; ESIN, S.; CAMPA, M. Use of antimicrobial peptides against microbial biofilms: advantages and limits. **Curr Med Chem.**, v. 18, p. 256-279, jun. 2011.
- BEIER, B. D.; QUIVEY, R. G.; BERGER, A. J. Raman Microspectroscopy for Species Identification and Mapping within Bacterial Biofilms. **AMB Express.**, v. 2, n. 1, p. 35-42, jul. 2012.
- BLACK, G. V. Dr. Black's conclusions reviewed again. **Dent Cosmos.**, v. 40, p. 440-451, 1898.
- BOLINTINEANU, D. S.; VIVCHARUK, V.; KAZNESSIS, Y. N. Multiscale models of the antimicrobial Peptide protegrin-1 on gram-negative bacteria membranes. **Int J Mol Sci.**, v. 13, n. 9, p. 11000-11011, jul. 2012.
- BOWEN, W. H.; KOO, H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. **Caries Res.**, v. 45, n. 1, p. 69-86, abr. 2011.
- BOZELLI Jr, J. C.; SASAHARA, E. T.; PINTO, M. R.; NAKAIE, C. R.; SCHREIER, S. Effect of Head Group and Curvature on Binding of the Antimicrobial Peptide Tritrpticin to Lipid Membranes. **Chem Phys Lipids.**, v. 165, n. 4, p. 365-373, mai. 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de atenção à saúde. **Projeto SB-Brasil: Resultados Principais.** Brasília, DF, 2011.
- BRETZ, W. A.; ROSA, O. P. Emerging technologies for the prevention of dental caries. Are current methods of prevention sufficient for the high risk patient? **Int Dent J.**, v. 61, n. 1, p. 29-33, ago. 2011.

- BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nat Rev Microbiol.**, v. 3, n. 3, p. 238-250, 2005.
- BUZALAF, M. A.; PESSAN, J. P.; HONÓRIO, H. M.; TEN CATE, J. M. Mechanisms of action of fluoride for caries control. **Monogr Oral Sci.**, v. 22, p. 97-114, jun. 2011.
- CALFEE, D. P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci, and other Gram-positives in healthcare. **Curr Opin Infect Dis.**, v. 25, p. 385-394, mar. 2012.
- CARNEIRO, V. A.; SANTOS, H. S.; ARRUDA, F. V.; BANDEIRA, P. N.; ALBUQUERQUE, M. R.; PEREIRA, M. O.; HENRIQUES, M.; CAVADA, B. S.; TEIXEIRA, E. H. Casbane diterpene as a promising natural antimicrobial agent against biofilm-associated infections. **Molecules.**, v. 16, n. 1, p. 190-201, dez. 2010.
- CARVALHO, D. C. L. **Avaliação in vitro do efeito do abacate, Hass, banana prata e maçã Fuji sobre a fermentação e a síntese de polissacarídeos extracelulares da placa dentária humana.** 2003. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2003.
- CASTRO, M. S.; FERREIRA, T. C. G.; CILLI, E. M.; CRUSCA Jr, E.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; SEBEN, A.; RICART, C. A.; SOUSA, M. V.; FONTES, W. Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from the arboreal South American frog *Hypsiboas albopunctatus* ("spotted treefrog"). **Peptides.**, v. 30, n. 2, p. 291-296, fev. 2009.
- CAVAZZOLA, A. S. **Avaliação dos efeitos dos chás de camomila, cidreira e erva doce sobre a fermentação e síntese de polissacarídeos na placa dentária humana: estudo in vitro.** 2003. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2003.
- CCAHUANA-VÁSQUEZ, R. A.; CURY, J. A. *S. mutans* biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. **Braz Oral Res.**, v. 24, p. 135-141, jun. 2010.
- CHEN, F.; WANG, D. Novel technologies for the prevention and treatment of dental caries: a patent survey. **Expert Opin Ther Pat.**, v. 20, n. 2, p. 681-694, 2010.
- CHOI, S.; PARK, K. H.; CHEONG, Y.; MOON, S. W.; PARK, Y. G.; PARK, H. K. Potential effects of tooth-brushing on human dentin wear following exposure to acidic soft drinks. **J Microsc.**, v. 247, n. 2, p. 176-185, ago. 2012.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty informational supplement, approved standard MS100-S20.** Wayne, PA: CLSI; 2010.

- CORBIN, A.; PITTS, B.; PARKER, A.; STEWART, P. S. Antimicrobial Penetration and Efficacy in an In Vitro Oral Biofilm Model. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 55, p. 3338-3344, nov. 2011.
- CRUSCA JR, E.; REZENDE, A. A.; MARCHETTO, R.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; FONTES, W.; CASTRO, M. S.; CILLI, E. M. Influence of N-Terminus modifications on the biological activity, membrane interaction, and secondary structure of the antimicrobial peptide Hylin-a1. **Pept Sci.**, v. 96, p. 41-48, ago. 2011.
- CUADRA-SAENZ, G.; RAO, D. L.; UNDERWOOD, A. J.; BELAPURE, S. A.; CAMPAGNA, S. R.; SUN, Z.; TAMMARIELLO, S.; RICKARD, A. H. Autoinducer-2 influences interactions amongst pioneer colonizing streptococci in oral biofilms. **Microbiology.**, v. 158, n. 7, p. 1783-1795, jul. 2012.
- CURY, J. A.; TENUTA, L. M. A. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions?. **Braz Oral Res.**, v. 23, n. 1, p. 23-30, fev. 2009.
- CURY, J. A.; TENUTA, L. M. How to maintain a cariostatic fluoride concentration in the oral environment. **Adv Dent Res.**, v. 20, n. 1, p. 13-16, 2008.
- DANNE, C.; DRAMSI, S. Pili of gram-positive bacteria: roles in host colonization. **Res Microbiol.**, v. 163, n. 9, p. 645-658, dez. 2012.
- DEO, V.; BHONGADE, M. L. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response. **Dent Today.**, v. 29, n. 9, p. 60-69, dez. 2010.
- DIEFENDERFER, K. E.; STAHL, J. Caries remineralization therapy: implications for dental readiness. **Mil Med.**, v. 172, n. 1, p. 48-50, 2008.
- DOUGHTY-SHENTON, D.; JOSEPH, J. D.; ZHANG, J.; PAGLIARINI, D. J.; KIM, Y.; LU, D.; DIXON, J. E.; CASEY, P. J. Pharmacological targeting of the mitochondrial phosphatase PTPMT1. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 333, n. 2, p. 584-592, mai. 2010.
- ECKERT, R.; SULLIVAN, R.; SHI, W. Targeted Antimicrobial Treatment to Re-establish a Healthy Microbial Flora for Long-term Protection. **Adv Dent Res.**, v. 24, p. 94-97, mai. 2012.
- ELLWOOD, R.; FEJERSKOV, O.; CURY, J. A.; CLARKSON, B. Fluoride in caries control. In: FEJERSKOV, O.; KIDD, E. **Dental caries: The disease and its clinical management.** 2nd ed. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2008. p. 287-323.
- EPSTEIN, A. K.; POKROY, B.; SEMINARA, A.; AIZENBERG, J. Bacterial biofilm shows persistent resistance to liquid wetting and gas penetration. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 108, n. 3, p. 995-1000, jan. 2011.

- FEATHERSTONE, J. D. B. Dental caries: a dynamic disease process. **Aust Dent J.**, v. 52, p. 286-291, fev. 2008.
- FELDMAN, M.; WEISS, E.; SHEMESH, M.; OFEK, I.; BACHRACH, G.; ROZEN, R.; STEINBERG, D. Cranberry constituents affect fructosyltransferase expression in *Streptococcus mutans*. **Altern Ther Health Med.**, v. 15, n. 2, p. 32-38, mar. 2009.
- FIELD, E. K.; D'IMPERIO, S.; MILLER, A. R.; VANENGELEN, M. R.; GERLACH, R.; LEE, B. D.; APEL, W. A.; PEYTON, B. M. Application of molecular techniques to elucidate the influence of cellulosic waste on the bacterial community structure at a simulated low-level-radioactive-waste site. **Appl Environ Microbiol.**, v. 76, p. 3106-3115, mai. 2010.
- FITZGERALD, R. J.; KEYES, P. H. Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. **JADA.**, v. 61, p. 9-19, 1960.
- FLEMING A. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. **Proc R Soc London B.**, v. 93, p. 306-317, 1922.
- FRAZÃO, P. Epidemiology of dental caries: when structure and context matter. **Braz Oral Res.**, v. 26, n. 1, p. 108-114, fev. 2012.
- FUKAI, K.; OHNO, H.; BLINKHORN, A. A cross-sectional survey investigating care of the primary dentition by paediatric dental specialists in Japan and the UK. **Int Dent J.**, v. 62, n. 4, p. 203-207, ago. 2012.
- GARNETT, J. A.; SIMPSON, P. J.; TAYLOR, J.; BENJAMIN, S. V.; TAGLIAFERRI, C.; COTA, E.; CHEN, Y. Y.; WU, H.; MATTHEWS, S. Structural insight into the role of *Streptococcus parasanguinis* Fap1 within oral biofilm formation. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 417, n. 1, p. 421-426, jan. 2012.
- GELLER PALTI, D. **Avaliação da desmineralização produzida por desafio cariogênico in situ em esmalte dentário com diferentes idades pós-eruptivas.** 2007. 103 f. Tese (Doutorado)– Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2007.
- GENG, J.; CHIU, C. H.; TANG, P.; CHEN, Y.; SHIEH, H. R.; HU, S.; CHEN, Y. Y. Complete genome and transcriptomes of *Streptococcus parasanguinis* FW213: phylogenic relations and potential virulence mechanisms. **PLoS One.**, v. 7, p. 347-360, abr. 2012.
- GKEKA, P.; SARKISOV, L. Interactions of phospholipid bilayers with several classes of amphiphilic alpha-helical peptides: insights from coarse-grained molecular dynamics simulations. **J Phys Chem B.**, v. 114, n. 2, p. 826-839, mar. 2010.

- GREWAL, H.; VERMA, M.; KUMAR, A. Prevalence of dental caries and treatment needs amongst the school children of three educational zones of urban Delhi, India. **Indian J Dent Res.**, v. 22, n. 4, p. 517-519, ago. 2011.
- GROSS, E. L.; BEALL, C. J.; KUTSCH, S. R.; FIRESTONE, N. D.; LEYS, E. J.; GRIFFEN, A. L. Beyond *Streptococcus mutans*: dental caries onset linked to multiple species by 16S rRNA community analysis. **PLoS One.**, v. 7, n. 10, p. 18-22, jan. 2012.
- HALCROW, S. E.; HARRIS, N. J.; TAYLES, N.; IKEHARA-QUEBRAL, R.; PIETRUSEWSKY, M. From the mouths of babes: Dental caries in infants and children and the intensification of agriculture in mainland Southeast Asia. **Am J Phys Anthropol.**, v. 28, p. 15-31, jan. 2013.
- HALE, J. D.; HANCOCK, R. E. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. **Expert Rev Anti Infect Ther.**, v. 5, n. 6, p. 951-959, dez. 2007.
- HAN, D. H.; KIM, J. B.; PARK, D. Y. The decline in dental caries among children of different ages in Korea, 2000-2006. **Int Dent J.**, v. 60, n. 5, p. 329-335, out. 2010.
- HARDIE, K. R.; HEURLIER, K. Establishing bacterial communities by 'word of mouth': LuxS and autoinducer 2 in biofilm development. **Nature Rev Microbiol.**, v. 6, p. 635-643, 2008.
- HE, J.; ANDERSON, M. H.; SHI, W.; ECKERT, R. Design and activity of a 'dual-targeted' antimicrobial peptide. **Int J Antimicrob Agents.**, v. 33, p. 532-537, jun. 2009.
- HOUSHMAND, M.; HOLTFRETER, B.; BERG, M. H.; SCHWAHN, C.; MEISEL, P.; BIFFAR, R.; KINDLER, S.; KOCHER, T. Refining definitions of periodontal disease and caries for prediction models of incident tooth loss. **J Clin Periodontol.**, v. 39, n. 7, p. 635-644, jul. 2012.
- HUA, J.; SCOTT, R. W.; DIAMOND, G. Activity of antimicrobial peptide mimetics in the oral cavity: II. Activity against periopathogenic biofilms and anti-inflammatory activity. **Mol Oral Microbiol.**, v. 25, n. 6, p. 426-432, dez. 2010.
- IRIE, Y.; BORLEE, B. R.; O'CONNOR, J. R.; HILL, P. J.; HARWOOD, C. S.; WOZNIAK, D. J.; PARSEK, M. R. Self-produced exopolysaccharide is a signal that stimulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 109, n. 50, p. 20632-20636, dez. 2012.
- ISAKSSON, H.; ALM, A.; KOCH, G.; BIRKHED, D.; WENDT, L. K. Caries Prevalence in Swedish 20-Year-Olds in Relation to Their Previous Caries Experience. **Caries Res.**, v. 47, n. 3, p. 234-242, jan. 2013.

- JAMES, P.; PARNELL, C.; WHELTON, H. The Caries-Preventive Effect of Chlorhexidine Varnish in Children and Adolescents: A Systematic Review. **Caries Res.**, v. 44, p. 333-340, jul. 2010.
- JORGE, P.; LOURENÇO, A.; PEREIRA, M. O. New trends in peptide-based anti-biofilm strategies: a review of recent achievements and bioinformatic approaches. **Biofouling.**, v. 28, n. 10, p. 1033-1061, ago. 2012.
- KEYES, P. H. Recent advances in dental research: bacteriology. **Int Dent J.**, v. 12, n. 4, p. 443-464, 1962.
- KLEIN, M. I.; XIAO, J.; LU, B.; DELAHUNTY, C. M.; YATES Jr.; KOO, H. *Streptococcus mutans* protein synthesis during mixed-species biofilm development by high-throughput quantitative proteomics. **PLoS One.**, v. 7, n. 9, p. 45-58, nov. 2012.
- KLINKE, T.; KNEIST, S.; DE SOET, J. J.; KUHLISCH, E.; MAUERSBERGER, S.; FORSTER, A.; KLIMM, W. Acid production by oral strains of *Candida albicans* and lactobacilli. **Caries Res.**, v. 43, n. 2, p. 83-91, fev. 2009.
- KOLENBRANDER, P. E. Multispecies communities: interspecies interactions influence growth on saliva as sole nutritional source. **Int J Oral Sci.**, v. 3, p. 49-54, 2011.
- KOLENBRANDER, P. E.; PALMER Jr, R. J.; PERIASAMY, S.; JAKUBOVICS, N. S. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell–cell distance. **Nat Rev Microbiol.**, v. 8, p. 471-480, abr. 2010.
- KOLENBRANDER, P. E.; PALMER Jr, R. J.; RICKARD, A. H.; JAKUBOVICS, N. S.; CHALMERS, N. I.; DIAZ, P. I. Bacterial interactions and successions during plaque development. **Periodontol 2000.**, v. 42, p. 47-49, jan. 2006.
- KOLEY, D.; RAMSEY, M. M.; BARD, A. J.; WHITELEY, M. Discovery of a biofilm electrocline using real-time 3D metabolite analysis. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 108, n. 50, p. 19996-20001, dez. 2011.
- KUBONIWA, M.; TRIBBLE, G. D.; HENDRICKSON, E. L.; AMANO, A.; LAMONT, R. J.; HACKETT, M. Insights into the virulence of oral biofilms: discoveries from proteomics. **Expert Rev Proteomics.**, v. 9, n. 3, p. 311-323, jun. 2012.
- LARMAS, M. Distribution of caries in children: variations between and within populations. **J Dent Res.**, v. 91, n. 12, p. 1209-1210, dez. 2012.
- LAURIS, J. R.; SILVA-BASTOS, R.; MAGALHAES-BASTOS, J. R. Decline in dental caries among 12-year-old children in Brazil, 1980-2005. **Int Dent J.**, v. 62, n. 6, p. 308-314, dez. 2012.

- LEE, C. C.; SUN, Y.; QIAN, S.; HUANG, H. W. Transmembrane pores formed by human antimicrobial peptide LL-37. **Biophys J.**, v. 100, n. 7, p. 1688-1696, out. 2011.
- LEE, J.; JAYARAMAN, A.; WOOD, T. K. Indole is an interspecies biofilm signal mediated by SdiA. **BMC Microbiol.**, v. 7, n. 2, p. 42-46, 2007.
- LI, L. N.; GUO, L. H.; LUX, R.; ECKERT, R.; YARBROUGH, D.; HE, J.; ANDERSON, M.; SHI, W. Y. Targeted antimicrobial therapy against *Streptococcus mutans* establishes protective non-cariogenic oral biofilms and reduces subsequent infection. **Int J Oral Sci.**, v. 2, n. 2, p. 66-73, 2010.
- LI, Y. H.; TIAN, X. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. **Sensors (Basel)**., v. 12, n. 3, p. 2519-2538, jan. 2012.
- LIANG, X.; CHEN, Y. Y.; RUIZ, T.; WU, H. New cell surface protein involved in biofilm formation by *Streptococcus parasanguinis*. **Infect Immun.**, v. 79, p. 3239-3248, nov. 2011.
- LIMA, J. E. O. Cárie dentária: um novo conceito. **Rev Dent Press Ortodon Ortop Facial.**, v. 12, n. 6, p. 13-22, nov. 2007.
- LIU, H. Y.; CHEN, C. C.; HU, W. C.; TANG, R. C.; CHEN, C. C.; TSAI, C. C.; HUANG, S. T. The impact of dietary and tooth-brushing habits to dental caries of special school children with disability. **Res Dev Disabil.**, v. 31, n. 6, p. 1160-1169, nov. 2010.
- LIU, J.; LING, J. Q.; ZHANG, K.; WU, C. D. Physiological properties of *Streptococcus mutans* UA159 biofilm-detached cells. **FEMS Microbiol Lett.** V. 101, p. 115-128, dez. 2012.
- LIU, Y.; BURNE, R. A. Multiple two-component systems of *Streptococcus mutans* regulate agmatine deiminase gene expression and stress tolerance. **J Bacteriol.**, v. 191, p. 7363-7366, abr. 2009.
- LIU, Y.; WANG, L.; ZHOU, X.; HU, S.; ZHANG, S.; WU, H. Effect of the antimicrobial decapeptide KSL on the growth of oral pathogens and *Streptococcus mutans* biofilm. **Int J Antimicrob Agents.**, v. 37, p. 33-38, jan. 2011.
- MARR, A. K.; MCGWIRE, B. S.; MCMASTER, W. R. Modes of action of Leishmanicidal antimicrobial peptides. **Future Microbiol.**, v. 7, n. 9, p. 1047-1059, set. 2012.
- MAZDA, Y.; KAWADA-MATSUO, M.; KANBARA, K.; OOGAI, Y.; SHIBATA, Y.; YAMASHITA, Y.; MIYAWAKI, S.; KOMATSUZAWA, H. Association of CiaRH with resistance of *Streptococcus mutans* to antimicrobial peptides in biofilms. **Mol Oral Microbiol.**, v. 27, p. 124-135, ago. 2012.

- MIKAMI, Y.; SUZUKI, N.; TAKAHASHI, T.; OTSUKA, K.; TSUDA, H. Bacitracin upregulates mbrAB transcription via mbrCD to confer bacitracin resistance in *Streptococcus mutans*. **J Pharmacol Sci.**, v. 117, p. 204-207, abr. 2011.
- MIKKELSEN, L.; JENSEN, S. B.; SCHIOTT, C. R.; LÖE, H. Classification and prevalences of plaque streptococci after two years oral use of chlorhexidine. **J Periodont Res.**, v. 16, n. 6, p. 646-658, 1981.
- MILLER, W. The presence of bacterial plaques on the surface of teeth and their significance. **Dent Cosmos.**, v. 44, p. 425-446, jan. 1902.
- MURRAY, E. J.; STRAUCH, M. A.; STANLEY-WALL, N. R. SigmaX is involved in controlling *Bacillus subtilis* biofilm architecture through the AbrB homologue Abh. **J Bacteriol.**, v. 191, p. 6822-6832, nov. 2009.
- NAGORSKA, K.; OSTROWSKI, A.; HINC, K.; HOLLAND, I. B.; OBUCHOWSKI, M. Importance of eps genes from *Bacillus subtilis* in biofilm formation and swarming. **J Appl Genet.**, v. 51, p. 369-381, mai. 2010.
- NAKATSUJI, T.; GALLO, R. L. Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas. **J Invest Dermatol.**, v. 132, p. 887-895, 2012.
- NAPIMOGA, M. H.; KAMIYA, R. U.; ROSA, R. T.; ROSA, E. A.; HÖFLING, J. F.; MATTOS-GRANER, R.; GONÇALVES, R. B. Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries active individuals. **J Med Microbiol.**, v. 53, p. 697-703, jul. 2004.
- NATARAJAN, N. **Cariogenicity: Macrosocioeconomics Vs Saccharophagy. Role of socio-politicoeconomics and sugar consumption in tooth decay among 12 year olds. A global ecological crosssectional study.** 2011. Dissertação (Mestrado) - Lund University, Sweden. 2011.
- NEALSON, K. H. Autoinduction of bacterial luciferase. Occurrence, mechanism and significance. **Arch Microbiol.**, v. 112, p. 73-79, 1977.
- NEWBRUN, E. **Cariology.** 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1983.
- OKADA, M.; SODA, Y.; HAYASHI, F.; DOI, T.; SUZUKI, J.; MIURA, K.; KOZAI, K. Longitudinal study of dental caries incidence associated with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in pre-school children. **J Med Microbiol.**, v. 54, n. 7, p. 661-665, jul. 2005.
- OKADA, T.; TAKADA, K.; FUJITA, K.; IKEMI, T.; OSGOOD, R. C.; CHILDERS, N. K.; MICHALEK, S. M. Differentiation of banding patterns between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* isolates in rep-PCR using ERIC primer. **J Oral Microbiol.**, v. 90, p. 12-19, nov. 2011.

- ONURDAĞ F. K.; OZKAN, S.; OZGEN, S.; OLMUŞ, H.; ABBASOĞLU, U. *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* adhesion on soft contact lenses. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.**, v. 249, n. 4, p. 559-564, dez. 2010.
- ORLAND, F. J.; BLAYNEY, J. R.; HARRISON, R. W.; REYNIERS, J. A.; TREXLER, P. C.; WAGNER, M.; GORDON, H. A.; LUCKEY, T. D. Use of the germfree animal technic in the study of experimental dental caries, part I: basic observations on rats reared free of all microorganisms. **J Dent Res.**, v. 33, n. 2, p. 147-174, abr 1954.
- O'TOOLE, G. A.; KOLTER, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. **Molecular Microbiol.**, v. 28, p. 449-461, 1998.
- PALOMBO, E. A. Traditional Medicinal Plant Extracts and Natural Products with Activity against Oral Bacteria: Potential Application in the Prevention and Treatment of Oral Diseases. **Evid Based Complement Alternat Med.**, v. 2011, p. 1-15, jan. 2011.
- PARISOTTO, T. M.; KING, W. F.; DUQUE, C.; MATTOS-GRANER, R. O.; STEINER-OLIVEIRA, C.; NOBRE-DOS-SANTOS, M.; SMITH, D. J. Immunological and microbiologic changes during caries development in young children. **Caries Res.**, v. 45, n. 4, p. 377-385, ago. 2011.
- PAULSEN, V. S.; BLENCCKE, H. M.; BENINCASA, M.; HAUG, T.; EKSTEEN, J. J.; STYRVOLD, O. B.; SCOCCHI, M.; STENSVÅG, K. Structure-activity relationships of the antimicrobial Peptide arasin 1 - and mode of action studies of the N-terminal, proline-rich region. **PLoS One.**, v. 8, n. 1, p. 526-533, jan. 2013.
- PENGPID, S.; PELTZER, K. Hygiene behaviour and health attitudes in African countries. **Curr Opin Psychiatry.**, v. 25, n. 2, p. 149-154, mai. 2012.
- RICKARD, A. H.; PALMER Jr, R. J.; BLEHERT, D. S.; CAMPAGNA, S. R.; SEMMELHACK, M. F.; EGLAND, P. G.; BASSLER, B. L.; KOLENBRANDER, P. E. Autoinducer 2: a concentration dependent signal for mutualistic bacterial biofilm growth. **Mol Microbiol.**, v. 60, n. 6, p. 1446-1456, jun. 2006.
- RODRIGUES, J. A.; LUSSI, A.; SEEMANN, R.; NEUHAUS, K. W. Prevention of crown and root caries in adults. **Periodontol 2000.**, v. 55, n. 1, p. 231-249, fev. 2011.
- SÁ, N. C.; CAVALCANTE, T. T.; ARAÚJO, A. X.; SANTOS, H. S.; ALBUQUERQUE, M. R.; BANDEIRA, P. N.; CUNHA, R. M.; CAVADA, B. S.; TEIXEIRA, E. H. Antimicrobial and antibiofilm action of Casbane Diterpene from *Croton nepetaefolius* against oral bacteria. **Arch Oral Biol.**, v. 57, n. 3, p. 550-555, 2012.
- SAMPAIO, F. C.; LEVY, S. M. Systemic fluoride. **Monogr Oral Sci.**, v. 22, p. 133-145, 2011.

- SELWITZ, R. H.; ISMAIL, A. I.; PITTS, N. B. Dental Caries. **Lancet.**, v. 369, n. 3, p. 51-59, 2007.
- SHEMESH, M.; TAM, A.; STEINBERG, D. Differential gene expression profiling of *Streptococcus mutans* cultured under biofilm and planktonic conditions. **Microbiology.**, v. 153, n. 5, p. 1307-1317, mai. 2007.
- SIBLEY, C. D.; PARKINS, M. D.; RABIN, H. R.; SURETTE, M. G. The relevance of the polymicrobial nature of airway infection in the acute and chronic management of patients with cystic fibrosis. **Curr Opin Investig Drugs.**, v. 10, p. 787-794, mar. 2009.
- SILVA, B. R.; FREITAS, V. A. A.; NASCIMENTO-NETO, L. G.; CARNEIRO, V. A.; ARRUDA, F. V. S.; AGUIAR, A. S. W.; CAVADA, B. S.; TEIXEIRA, E. H. Antimicrobial peptide control of pathogenic microorganisms of the oral cavity: A review of the literature. **Peptides.**, v. 36, n. 2, p. 315-321, ago. 2012.
- SOM, A.; VEMPARALA, S.; IVANOV, I.; TEW, G. N. Synthetic mimics of antimicrobial peptides. **Biopolymers.**, v. 90, n. 2, p. 83-93, 2008.
- SOTO, S. M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. **Virulence.**, v. 4, n. 3, p. 32-41, fev. 2013.
- STUART, L. S.; HARRIS, T. H. Bactericidal and fungicidal properties of a crystalline protein isolated from unbleached wheat flour. **Cereal Chem.**, v. 19, p. 288-300, 1942.
- SUBRAMANIAM, P.; BABU, K. L.; RODRIGUEZ, A. Relation of salivary risk factors to dental caries in children with cerebral palsy. **J Clin Pediatr Dent.**, v. 34, n. 4, p. 355-360, jan. 2010.
- SUNI, J.; VÄHÄNIKKILÄ, H.; PÄKKILÄ, J.; TJÄDERHANE, L.; LARMAS, M. Review of 36,537 Patient Records for Tooth Health and Longevity of Dental Restorations. **Caries Res.**, v. 47, n. 4, p. 309-317, fev. 2013.
- TAKEUCHI, H.; FURUTA, N.; MORISAKI, I.; AMANO, A. Exit of intracellular *Porphyromonas gingivalis* from gingival epithelial cells is mediated by endocytic recycling pathway. **Cell Microbiol.**, v. 13, n. 5, p. 677-691, fev. 2011.
- TEIXEIRA, V.; FEIO, M. J.; BASTOS, M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. **Prog Lipid Res.**, v. 51, n. 2, p. 149-177, abr. 2012.
- TENORIO, E. L.; KLEIN, B. A.; CHEUNG, W. S.; HU, L. T. Identification of interspecies interactions affecting *Porphyromonas gingivalis* virulence phenotypes. **J Oral Microbiol.**, v. 3, n. 1, p. 11-15, ago. 2011.

- TRAEBERT, J.; GUIMARÃES, L. D. O. A.; DURANTE, E. Z.; SERRATINE, A. C. Low maternal schooling and severity of dental caries in Brazilian preschool children. **Oral Health Prev Dent.**, v. 7, n. 1, p. 39-45, mar. 2009.
- URZUA, I.; MENDOZA, C.; ARTEAGA, O.; RODRÍGUEZ, G.; CABELLO, R.; FALEIROS, S.; CARVAJAL, P.; MUÑOZ, A.; ESPINOZA, I.; ARANDA, W.; GAMONAL, J. Dental caries prevalence and tooth loss in Chilean adult population: first national dental examination survey. **Int J Dent.**, v. 12, p. 170-180, 2012.
- VAN GENNIP, M.; CHRISTENSEN, L. D.; ALHEDE, M. Inactivation of the rhlA gene in *Pseudomonas aeruginosa* prevents rhamnolipid production, disabling the protection against polymorphonuclear leukocytes. **APMIS.**, v. 117, p. 537-546, 2009.
- VAN STRYDONCK, D. A.; SLOT, D. E.; VAN DER VELDEN, U.; VAN DER WEIJDEN, F. Effect of a chlorhexidine mouthrinse on plaque, gingival inflammation and staining in gingivitis patients: a systematic review. **J Clin Periodontol.**, v. 39, n. 11, p. 1042-1055, nov. 2012.
- VIEIRA, A. R.; MODESTO, A.; ISMAIL, A.; WATT, R. Summary of the IADR Cariology Research Group Symposium, Barcelona, Spain, July 2010: new directions in cariology research. **Caries Res.**, v. 46, n. 4, p. 346-352, dez. 2012.
- VU, B.; CHEN, M.; CRAWFORD, R. J.; IVANOVA, E. P. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. **Molecules.**, v. 14, n. 7, p. 2535-2554, jul. 2009.
- WADE, W. G. The oral microbiome in health and disease. **Pharmacol Res.**, v. 69, n. 1, p. 137-143, mar. 2013.
- WANG, W.; TAO, R.; TONG, Z.; DING, Y.; KUANG, R.; ZHAI, S.; LIU, J.; NI, L. Effect of a novel antimicrobial peptide chrysophsin-1 on oral pathogens and *Streptococcus mutans* biofilms. **Peptides.**, v. 33, n. 1, p. 212-219, jan. 2012.
- WATERS, C. M.; BASSLER, B. L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. **Annu Rev Cell Dev Biol.**, v. 21, n. 3, p. 319-346, 2005.
- WILLCOX, M. D. Microbial adhesion to silicone hydrogel lenses: a review. **Eye Contact Lens.**, v. 39, n. 1, p. 60-65, jan. 2013.
- WILLIAM, L. J. A contribution to the study of pathology of enamel. **Dent Cosmos.**, v. 39, p. 169-196, 1897.
- WIRADHARMA, N.; KHOE, U.; HAUSER, C. A.; SEOW, S. V.; ZHANG, S.; YANG, Y. Y. Synthetic cationic amphiphilic α -helical peptides as antimicrobial agents. **Biomaterials.**, v. 32, n. 8, p. 2204-2212, mar. 2011.

- WONG, M. C.; GLENNY, A. M.; TSANG, B. W.; LO, E. C.; WORTHINGTON, H. V.; MARINHO, V. C. Topical fluoride as a cause of dental fluorosis in children. **Cochrane Database Syst Rev.**, v. 20, n. 1, p. 21-34, jan. 2010.
- WU, C.; AYALA, E. A.; DOWNEY, J. S.; MERRITT, J.; GOODMAN, S. D.; QI, F. Regulation of ciaXRH operon expression and identification of the CiaR regulon in *Streptococcus mutans*. **J Bacteriol.**, v. 192, p. 4669-4679, jun. 2010.
- XIAO, J.; KLEIN, M. I.; FALSETTA, M. L.; LU, B.; DELAHUNTY, C. M.; YATES JR, R. D.; HEYDORN, A.; KOO H. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. **PLoS Pathog.**, v. 8, n. 4, p. 102-123, ago. 2012.
- YOUSEFI, B.; GHADERI, S.; REZAPOOR-LACTOOYI, A.; AMIRI, N.; VERDI, J.; SHOAE-HASSANI, A. Hydroxy decenoic acid down regulates gtfB and gtfC expression and prevents *Streptococcus mutans* adherence to the cell surfaces. **Ann Clin Microbiol Antimicrob.**, v. 11, p. 21-29, jul. 2012.
- ZERO, D. T.; FONTANA, M.; MARTÍNEZ-MIER, E. A.; FERREIRA-ZANDONÁ, A.; ANDO, M.; GONZÁLEZ-CABEZAS, C.; BAYNE, S. The biology, prevention, diagnosis and treatment of dental caries: scientific advances in the United States. **J Am Dent Assoc.**, v. 140, n. 1, p. 25-34, set. 2009.
- ZIJNGE, V.; AMMANN, T.; THURNHEER, T.; GMÜR, R. Subgingival biofilm structure. **Front Oral Biol.**, v. 15, p. 1-16, 2012.

*ANEXO I – Artigos Publicados Pertinentes ao
Tema Abordado*



Antimicrobial activity of the synthetic peptide Lys-a1 against oral streptococci

Bruno Rocha da Silva^a, Victor Aragão Abreu de Freitas^a, Victor Alves Carneiro^d,
Francisco Vassiliepe Sousa Arruda^a, Esteban Nicolás Lorenzón^b, Andréa Silvia Walter de Aguiar^c,
Eduardo Maffud Cilli^b, Benildo Sousa Cavada^d, Edson Holanda Teixeira^{a,*}

^a BioMol Group/DPML/LIBS, Integrate Biomolecules Laboratory, Federal University of Ceara, Fortaleza, CE, Brazil

^b Institute of Chemistry, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Araraquara, SP, Brazil

^c Clinical Dentistry Department, Federal University of Ceara, Fortaleza, CE, Brazil

^d BioMol Group/DBBM/BioMol-Lab, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 October 2012

Received in revised form 3 December 2012

Accepted 3 December 2012

Available online 20 January 2013

Keywords:

Antimicrobial peptide

Biofilms

Streptococcus mutans

Dental caries

ABSTRACT

The peptide LYS-[TRP⁶]-Hy-A1 (Lys-a1) is a synthetic derivative of the peptide Hy-A1, initially isolated from the frog species *Hypsiboas albopunctatus*. According to previous research, it is a molecule with broad antimicrobial activity. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of the synthetic peptide Lys-a1 (KIFGAIWPLALGALKNLIK-NH₂) on the planktonic and biofilm growth of oral bacteria. The methods used to evaluate antimicrobial activity include the following: determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) in microtiter plates for growth in suspension and quantification of biomass by crystal violet staining and counting of colony forming units for biofilm growth. The microorganisms *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* were grown in Brain Heart Infusion broth at 37 °C under atmospheric pressure with 10% CO₂. The peptide was solubilized in 0.1% acetic acid (v/v) at various concentrations (500–1.9 μg mL⁻¹). Chlorhexidine gluconate 0.12% was used as the positive control, and BHI culture medium was used as the negative control. The tested peptide demonstrated a remarkable antimicrobial effect, inhibiting the planktonic and biofilm growth of all strains tested, even at low concentrations. Thus, the peptide Lys-a1 is an important source for potential antimicrobial agents, especially for the control and prevention of microbial biofilms, which is one of the most important factors in cariogenic processes.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Dental caries results from the localized destruction of dental hard tissues susceptible to acidic products from the bacterial fermentation of carbohydrates [36]. It is one of the primary preventable infectious diseases in pediatric patients, although individuals may be affected by dental caries throughout life [8,28,33].

Caries is the major cause of tooth loss and orofacial pain, although it can be controlled on its early stages. However, it is not a self-limiting disease. If therapeutic measures are not taken, it can progress until complete destruction of the tooth [34,40].

A primary etiological factor related to the development of dental caries is the colonization of pathogenic microorganisms on oral surfaces [21]. Such microorganisms vary according to the development of the lesion and some host factors. However, the ability of

these colonizers to develop into biofilms is one of the most important virulence factors and, consequently, one of the most studied field [20].

Biofilms are complex microbial communities that develop on a wide variety of surfaces. They are generally associated with an extracellular matrix composed of various types of biopolymers derived from bacterial metabolism [1,11].

Growth in biofilms provides protection against antibiotics and environmental stress factors in two ways: the physical barrier formed by the extracellular matrix, which hinders the penetration of antimicrobial agents into the biofilm [12]; and bacterial communication mechanisms that stimulate bacteria to produce enzymes and proteins important for the physiological adaptation of biofilm [10].

Due to its public health importance as the leading cause of orofacial infections, several studies have been conducted on combating biofilm development with the goal of controlling pathogenic oral microflora [5,7,35,41].

In this context, a group of molecules with unique characteristics, antimicrobial peptides (AMPs), have been the focus of research in the field of microbiology. AMPs are a heterogeneous group of

* Corresponding author at: Federal University of Ceará, Rua Monsenhor Furtado, s/n, Rodolfo Teófilo, CEP 60441-750, Fortaleza, CE, Brazil. Tel.: +55 85 3366 8300; fax: +55 85 3366 8301.

E-mail address: edson@ufc.br (E.H. Teixeira).

molecules found in many living organisms, from microorganisms to mammals [26]. These molecules have received considerable attention because they act on the cell membrane of a pathogen, which is a difficult structure for the bacterial cell to modify and maintain viability. Thus, bacteria and fungi have difficulty overcoming the deleterious effects produced by AMPs [13].

Among the various sources of AMPs, the glands of anurans (amphibians) represent one of the richest natural reserves of AMPs. Recently, Castro et al. isolated a peptide named Hylin-A1 (Hy-a1, IFGAILPLALGALKNLK-NH₂), which is the first cytolytic peptide isolated from the skin of the arboreal frog *Hypsiboas albopunctatus*, a very common species in South America. This peptide exhibits significant activity against several bacterial strains, both Gram-positive and Gram-negative [6].

However, considering that the biological activity of an AMP is often associated with the number of positive charges in its sequence, including the N-terminal region [6], Crusca et al. have synthesized several analogs of the peptide Hy-a1, which include changes in the N-terminal region, and obtained analogs with enhanced antimicrobial effectiveness [13]. Among these analogs, the peptide LYS-[TRP⁶]-Hy-a1 was distinguished by a three- to four-fold increase in antibacterial and antifungal activity compared to Hy-a1 [13].

Thus, the objective of this study was to evaluate the potential of the peptide LYS-[TRP⁶]-Hy-a1 (Lys-a1), an analog of the AMP Hy-a1, for controlling the microbial growth and biofilm formation of oral cariogenic bacteria.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and culture conditions

Bacterial strains involved in the cariogenic process, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sobrinus* ATCC 6715, *Streptococcus oralis* ATCC 10557, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus parasanguinis* ATCC 903 and *Streptococcus salivarius* ATCC 7073 were grown in Brain Heart Infusion (BHI, Difco, Detroit, MI). All strains were grown individually. After an initial inoculation into 5 mL of sterile medium BHI for 24 h at 37 °C and 10% CO₂, an aliquot of the culture was further inoculated into 5 mL of sterile medium BHI under the same conditions. Thus, bacterial cells in late exponential growth phase, according to the growth curve, were adjusted to concentrations of 1×10^6 CFU mL⁻¹ in BHI for experiments on the antimicrobial activity on cells in suspension, and to concentrations of 2×10^7 CFU mL⁻¹ in BHI supplemented with 1% sucrose (BHIs) for experiments on the inhibition of formation and development of biofilms.

2.2. Peptide synthesis, purification and preparation

The peptide Lys-a1 was synthesized and purified according to a recently published methodology [13]. The peptide was fully solubilized in sterile deionized water with 0.1% acetic acid (CH₃COOH) at a concentration of 1000 µg mL⁻¹ prior to use and stored in a freezer at -20 °C.

2.3. Antimicrobial activity assay

The antimicrobial activity of Lys-a1 was assessed by the microdilution test in 96-well “U” bottom microtiter plates, according to the standard global application developed by the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) consensus process [9].

The plates were prepared with sterile BHI containing the peptide Lys-a1 at a concentration of 1000 µg mL⁻¹. Then, two-fold serial dilutions were made to achieve varying concentrations

(1.95–1.000 µg mL⁻¹) at a final volume of 0.1 mL. Next, 0.1 mL of cells (1×10^6 CFU mL⁻¹) was added to each well to yield a final volume of 0.2 mL. Chlorhexidine gluconate (0.12%) and BHI sterile culture medium were added to separate wells as the positive and negative controls, respectively.

The plates were incubated at 37 °C with 10% CO₂ for 24 h. After incubation, the turbidity of each well was measured using a spectrophotometer (Sunrise – Tecam) at 620 nm. The minimum inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest concentration of Lys-a1 capable of inhibiting bacterial growth visually.

To determine the minimum bactericidal concentration (MBC), Petri dishes with BHI agar were inoculated with 10 µL from the wells that showed no visible microbial growth. The MBC was defined as the lowest concentration of Lys-a1 capable of completely inhibiting microbial growth on the Petri dishes.

2.4. Antibiofilm activity assay

The assay of biofilm formation was performed according to the methodology described by O’toole and Kolter in 96-well “flat” bottom microtiter plates with modifications [32]. The plates were prepared in the same manner as in the antimicrobial activity test. However, two plates were prepared for each test, one for the quantification of biomass (crystal violet) and one for counting the CFU (colony forming units) adhered to the plate.

2.4.1. Quantification of biomass

After 24 h of incubation at 37 °C, the plates were washed three times with sterile distilled water, and then 200 µL of methyl alcohol P.A. was added to fix adhered cells. After the removal of methanol, 200 µL of 0.1% crystal violet was added for 15 min. This procedure was performed to allow an indirect quantification of biofilm formation by staining with crystal violet. Then, the washing procedure was repeated and the plate placed at room temperature for 1 h for drying. To dissolve the crystal violet bound to the biofilm, 200 µL of 33% acetic acid was added for 15 min. The suspension obtained was transferred to another 96-well sterile plate, and the absorbance of each well was measured with a spectrophotometer (Sunrise – Tecam) at 595 nm [5,7].

2.4.2. Count of colony forming units (CFU)

After incubation for 24 h at 37 °C, the plates were washed three times with sterile distilled water to remove weakly attached cells. Next, 200 µL of sterile 0.9% NaCl solution was added to each well of the plate, and the plate was then subjected to an ultrasonic bath (Sonicor/SC-52) for 6 min to release the cells from the formed biofilm. The mixture from five wells was removed following repeated aspiration and collected into a sterile 2.0 mL microtube to a final volume of 1 mL. Ten-fold serial dilutions of the cell suspension were performed in a new 96-well plate for subsequent plating. Then, the plates were incubated at 37 °C for 24 h and the number of colonies grown on each plate were counted and converted to units of CFU mL⁻¹.

2.5. Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate, and the results were entered into Microsoft Excel (Version 2010 for Windows) and later analyzed with GraphPad Prism software (version 5.0 for Windows). To analyze the significant differences between groups, one-way ANOVA was conducted with a Bonferroni post-test, and $p < 0.001$ was considered significant.

Table 1
In vitro susceptibility of oral microorganisms tested against the peptide Lys-a1.

Microorganism	Source	MIC values ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	MBC values ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>Streptococcus oralis</i>	ATCC 10557	15.6	31.25–500
<i>Streptococcus salivarius</i>	ATCC 7073	3.9–7.8	15.6–500
<i>Streptococcus sanguinis</i>	ATCC 10556	15.6	31.25–500
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	ATCC 903	3.9	3.9–500
<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 25175	125	250–500
<i>Streptococcus sobrinus</i>	ATCC 6715	15.6	31.25–500

3. Results

3.1. Antimicrobial activity

The synthetic peptide Lys-a1 demonstrated different antimicrobial activities for the various strains tested (Table 1). The MIC values ranged from 3.9 to 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$, while the MBC values ranged from 3.9 to 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. *S. salivarius* and *S. parasanguinis* were clearly more susceptible to Lys-a1, and *S. mutans* showed remarkable resistance. The values of MBC were generally 1–2 times the MIC values in all strains.

3.2. Antibiofilm activity

3.2.1. Analysis of quantification of biomass

The tested peptide showed effective inhibition of the growth of biofilms for 24 h. Analyses of the data show a significant difference ($p < 0.001$) compared to the negative control (Fig. 1). The peptide Lys-a1 demonstrated the potential to inhibit biofilm formation in all bacterial species tested. For the strains *S. oralis*, *S. sanguinis* and *S. sobrinus*, concentrations greater than 15.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ were effective in reducing microbial biofilm by 98–100%, showing no statistically significant difference from the positive control (Fig. 1A, C and F). *S. parasanguinis* was more susceptible to Lys-a1; a concentration of 1.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of Lys-a1 reduced biofilm formation by more than 70%. A similar result was also demonstrated with *S. salivarius*; however, 3.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ was necessary to achieve this effect (Fig. 1B).

Finally, *S. mutans* was more resistant to the biofilm inhibiting activity of the peptide, as well as the antimicrobial activity. At concentrations ranging from 7.8 to 62.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Lys-a1 interfered significantly in biofilm formation, with biomass reductions ranging from 10 to 88%. Concentrations above 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ were more effective, causing biomass reductions of 99%, with no significant difference from the positive control.

3.2.2. Counts of colony forming units

Counts of CFU were performed only at concentrations below the MBC because at higher concentrations, there were no viable colonies to count due to the bactericidal activity of the peptide (Fig. 2). Similar to previous tests, the peptide Lys-a1 showed dose-dependent activity against all microbial species tested. *S. parasanguinis* showed the greatest susceptibility to the peptide, significantly reducing the number of viable bacterial cells at very low concentrations, 1.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Although *S. mutans* demonstrated resistance to Lys-a1, the number of viable cells in the biofilm was reduced. At lower concentrations (15.6 and 31.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$), the peptide reduced the number of cells by approximately 60%, reaching a reduction of over 90% at concentrations greater than 62.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4. Discussion

The resistance of microorganisms to antibiotics in chronic infections is a well-established phenomenon [37]. The emergence of a wide range of antibiotic resistant bacterial strains,

such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin-resistant enterococci (VRE), has provided a therapeutic dilemma, especially for patients with immunologic deficits [4].

In the case of oral bacteria, an aggravating factor in regard to resistance against antimicrobial agents is the ability of these bacteria to develop into biofilms [21]. Previous studies have shown that bacteria in biofilms have an antibiotic resistance up to 10 times greater than that in planktonic growth [20,21]. This property is due to specific mechanisms, such as intra- and inter-species communication (*quorum sensing*), which enhances the production of enzymes capable of inactivating antimicrobials, as well as the physical barrier formed by extracellular polymeric matrix, which reduces the direct contact between the active antimicrobial molecule and the microorganism [11,20]. In this context, AMPs appear relevant due to their high activity at low concentrations and the low rates of bacterial resistance observed [38]. A recent review highlights the rising number of studies on the use of antimicrobial peptides in controlling pathogenic microorganisms of the oral cavity [38]. Furthermore, the authors emphasized the rising number of studies with synthetic antimicrobial peptides, due to their more specific activity and reduced toxicity to humans.

The antimicrobial peptide Lys-a1, used in this study, was previously described by Crusca et al. in 2011 [13]. Initially, the researchers performed two modifications on the original peptide (Hylin-a1). A lysine was added to the N-terminus to assess the effect of the increased number of positive charges on the antimicrobial and hemolytic activities. A simple substitution was also performed at position 6, leucine (LEU) for tryptophan (TRP). This last residue acts as a natural fluorophore, thereby making it possible to study the molecule by fluorescence spectroscopic tests. As expected, the increase in the number of positive charges in the peptide improved the antimicrobial activity compared to the native peptide and increased the broad spectrum of activity against Gram-positive and Gram-negative strains [13]. The results obtained in this article corroborate the study previously conducted by Crusca et al. in 2011 [13]. Lys-a1 showed antimicrobial activity at low concentrations against most of the bacterial strains analyzed. Emphasis should be given to its activity against *S. sanguis*, *S. salivarius*, *S. oralis* and, particularly, *S. parasanguinis*, all initial colonizers of the oral biofilm.

The bacteria termed as colonizers of the initial oral biofilm are extremely important for the development of pathological processes associated with biofilms [21]. These microorganisms play a vital role in bacterial anchoring because they bind specifically to the tooth surface and enable interactions with other bacteria that have acidogenic potential or that are capable of destroying the collagen fibers that trigger the process of dental caries and periodontitis, respectively [20].

Among the early colonizers, *S. parasanguinis* plays a fundamental role in the process of cariogenic biofilm development. This role is supported by a series of genes related to the production of binding proteins, such as the Fap1 gene, which is responsible for the production of fimbriae that adhere the microorganism itself to the tooth surface [17,18]; and the BapA1 gene, which is responsible for a direct link between early colonizers and late colonizers, contributing to the development of the biofilm [22]. In this manner, the remarkable antimicrobial and antibiofilm activity of Lys-a1 on this species is distinctive because it confers broad applicability in the control of oral biofilms during the early stages of formation.

At higher concentrations (>250 $\mu\text{g mL}^{-1}$), Lys-a1 showed antimicrobial activity against the cariogenic strain *S. mutans*. This result, in contrast with other synthetic peptides [16,19,24], can be explained by various mechanisms inherent to this species, which can influence its greater tolerance to the peptide. These mechanisms include the up-regulation of genes related to the ATP-binding cassette transporters (MbrA, B, C and D) [30], and antimicrobial

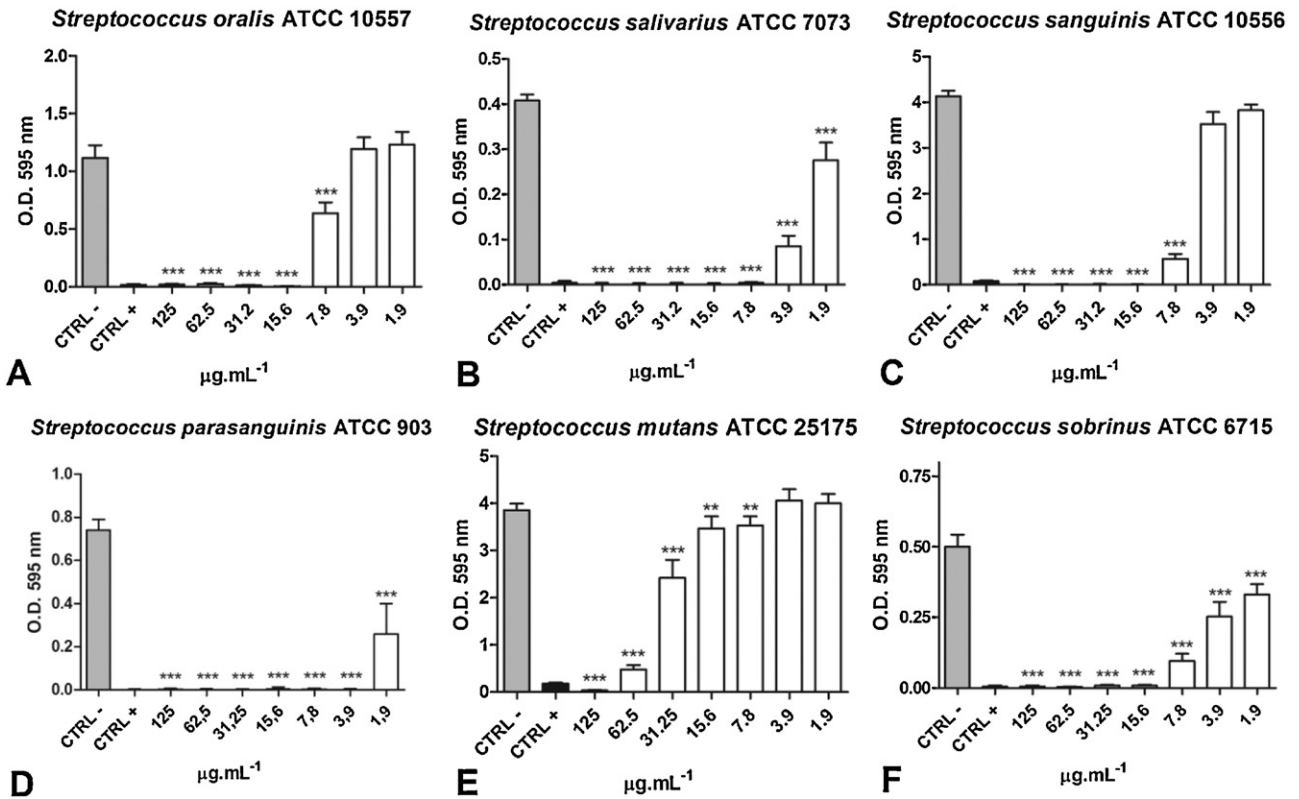


Fig. 1. Antibiofilm activity (biomass as measured by crystal violet) of the peptide Lys-a1 against the bacterial strains analyzed (A–F). Lys-a1 (□), negative control (■) and chlorhexidine gluconate 0.12% (■). ***p* < 0.01; ****p* < 0.001 when compared to negative control.

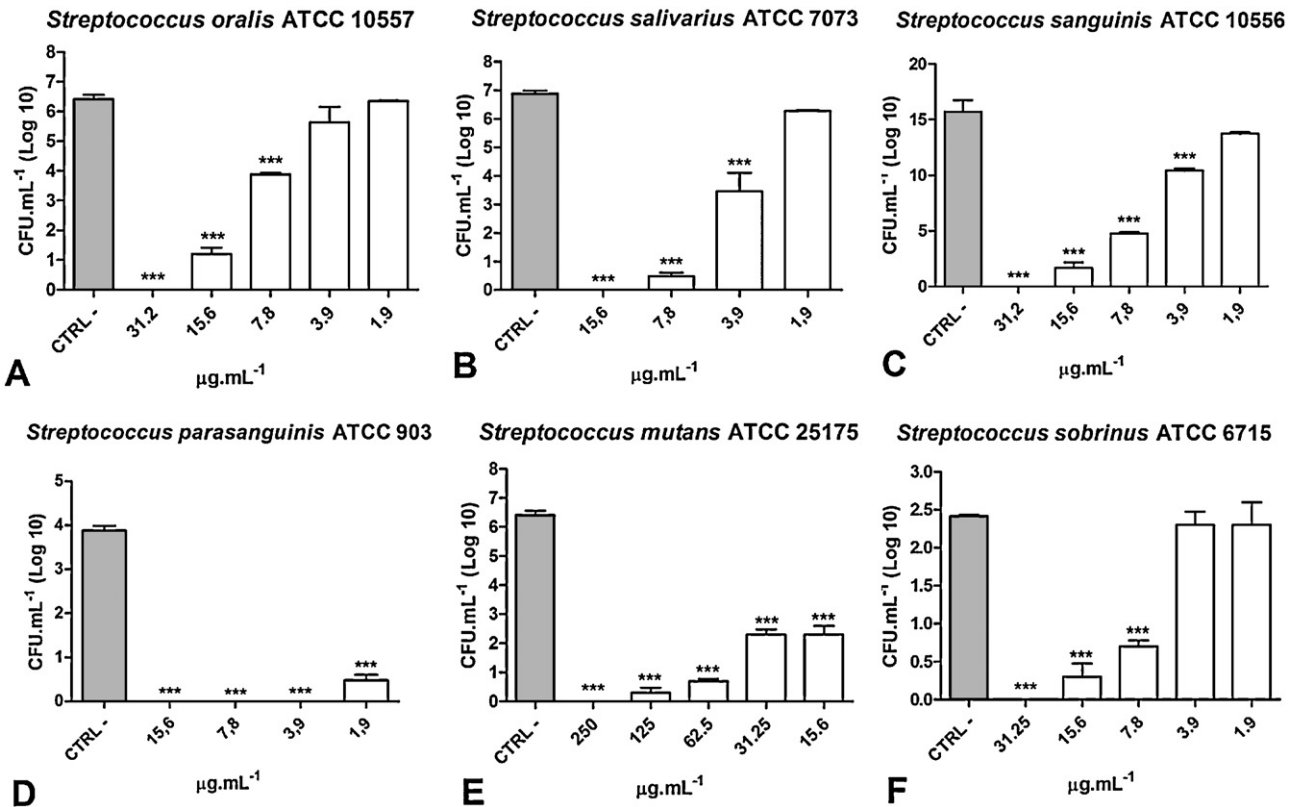


Fig. 2. Antibiofilm activity (number of CFUs) of the peptide Lys-a1 against the bacterial strains analyzed (A–F). Lys-a1 (□) and negative control (■). ****p* < 0.001 when compared to negative control.

resistance genes, such as CiaRH, which is responsible for mutacin production, competence development, acidic stress tolerance, and biofilm formation [3,23,27,42].

The *S. mutans* strain (ATCC 25175) used in this study has been widely analyzed by the scientific community; its genome has been fully sequenced, and its strong resistance to antimicrobial agents has been recognized [31]. This resistance has been well documented in a study by Eckert et al., in which the authors evaluated the antimicrobial activity of a synthetic peptide specific for different strains of *S. mutans* [15]. They found that the strain *S. mutans* ATCC 25175 showed approximately five times more resistant to the antimicrobial agent than the strains UA159 and T8. Other studies have also analyzed the activity of several compounds on *S. mutans* ATCC 25175 and have shown results similar to those of this article [2,39].

Several studies suggest that a differentiated and accelerated metabolism for polysaccharide production in the extracellular matrix is the main reason for the increased resistance of bacterial strain *S. mutans* ATCC 25175 to attacking agents [14,25,29]. This strain is commonly found in individuals with chronic carious lesions and therefore has more time to develop resistance. It is considered one of the most aggressive strains of that species [31].

Regarding the antibiofilm activity, the tested peptide proved to be extremely effective. It inhibited biofilm formation at concentrations similar to the MIC, most likely due to the inhibition of planktonic growth. However, at sub-inhibitory concentrations, Lys-A1 was also able to interfere significantly in biofilm formation in all strains tested. This may be related to the intrinsic activity of cationic peptides acting on the plasmatic membrane, which directly interferes with cellular metabolism and aggregation processes for the formation of bacterial biofilms [3].

The possible up-regulation of genes related to the production of biofilm in *S. mutans* is supported by the result in the "Count of CFU". In Fig. 2E, a decrease in the number of viable cells at lower concentrations ($15.6\text{--}31.25\ \mu\text{g mL}^{-1}$) can be observed, whereas at these same concentrations, a quantification of biomass similar to the negative control was observed. This finding suggests that under the stress of the antimicrobial agent, the remaining and consequently more tolerant cells increase the production of extracellular polymer matrix as a defense mechanism against the attacking agent [23,42].

5. Conclusion

Through the elucidation and analysis of the results of this research, the antimicrobial peptide Lys-a1 has shown remarkable antimicrobial and antibiofilm activity against the oral pathogenic streptococci tested, which makes it a potential agent for the control of these microorganisms.

However, further studies on the mechanisms of action of the peptide on the bacterial cell membrane must be conducted to fully understand its activity and clarify possible structural modifications for increased antimicrobial activity and decreased cytotoxicity.

Acknowledgments

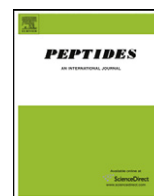
We would like to thank CNPq, CAPES and FUNCAP for financial support. EHT and BSC are senior investigators of CNPq.

References

- [1] Abee T, Kovács AT, Kuipers OP, van der Veen S. Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Curr Opin Biotechnol* 2010;22:1–8.
- [2] Basri DF, Tan LS, Shafiei Z, Zin NM. In vitro antibacterial activity of galls of *Quercus infectoria* Olivier against oral pathogens. *Evid Based Complement Altern Med* 2012;2012:632–8.

- [3] Batoni G, Maisetta G, Brancatisano FL, Esin S, Campa M. Use of antimicrobial peptides against microbial biofilms: advantages and limits. *Curr Med Chem* 2011;18:256–79.
- [4] Calfee DP. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci, and other Gram-positives in healthcare. *Curr Opin Infect Dis* 2012;25:385–94.
- [5] Carneiro VA, Santos HS, Arruda FV, Bandeira PN, Albuquerque MR, Pereira MO, et al. Casbane diterpene as a promising natural antimicrobial agent against biofilm-associated infections. *Molecules* 2010;16:190–201.
- [6] Castro MS, Ferreira TCG, Cilli EM, Crusca Jr E, Mendes-Giannini MJS, Sebben A, et al. Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from the arboreal South American frog *Hypsiboas albopunctatus* (spotted treefrog). *Peptides* 2009;30:291–6.
- [7] Cavalcante TT, Rocha BAM, Carneiro VA, Arruda FVS, Nascimento ASF, Sá NC, et al. Effect of lectins from Diocleinae subtribe against oral Streptococci. *Molecules* 2011;16:3530–43.
- [8] Chen F, Wang D. Novel technologies for the prevention and treatment of dental caries: a patent survey. *Expert Opin Ther Pat* 2010;20:681–94.
- [9] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty informational supplement, approved standard M5100-S20. Wayne, PA: CLSI; 2010.
- [10] Corbin A, Pitts B, Parker A, Stewart PS. Antimicrobial penetration and efficacy in an *in vitro* oral biofilm model. *J Antimicrob Chemother* 2011;55:3338–44.
- [11] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284:1318–22.
- [12] Costerton W, Veeh R, Shirtliff M, Pasmore M, Post C, Ehrlich G. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest* 2003;112:146–7.
- [13] Crusca Jr E, Rezende AA, Marchetto R, Mendes-Giannini MJS, Fontes W, Castro MS, et al. Influence of N-terminus modifications on the biological activity, membrane interaction, and secondary structure of the antimicrobial peptide Hylin-a1. *Pept Sci* 2010;96:41–8.
- [14] Decker EM, Dietrich I, Klein C, von Ohle C. Dynamic production of soluble extracellular polysaccharides by *Streptococcus mutans*. *Int J Dent* 2011;2011:435–41.
- [15] Eckert R, He J, Yarbrough DK, Qi F, Anderson MH, Shi W. Targeted killing of *Streptococcus mutans* by a pheromone-guided smart antimicrobial peptide. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:3651–7.
- [16] Eckert R, Sullivan R, Shi W. Targeted antimicrobial treatment to re-establish a healthy microbial flora for long-term protection. *Adv Dent Res* 2012;24:94–7.
- [17] Garnett JA, Simpson PJ, Taylor J, Benjamin SV, Tagliaferri C, Cota E, et al. Structural insight into the role of *Streptococcus parasanguinis* Fap1 within oral biofilm formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;417:421–6.
- [18] Geng J, Chiu CH, Tang P, Chen Y, Shieh HR, Hu S, et al. Complete genome and transcriptomes of *Streptococcus parasanguinis* FW213: phylogenetic relations and potential virulence mechanisms. *PLoS One* 2012;7:347–60.
- [19] He J, Anderson MH, Shi W, Eckert R. Design and activity of a 'dual-targeted' antimicrobial peptide. *Int J Antimicrob Agents* 2009;33:532–7.
- [20] Kolenbrander PE, Palmer Jr RJ, Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell–cell distance. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:471–80.
- [21] Kolenbrander PE, Palmer Jr RJ, Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontology* 2000 2006;42:47–79.
- [22] Liang X, Chen YY, Ruiz T, Wu H. New cell surface protein involved in biofilm formation by *Streptococcus parasanguinis*. *Infect Immun* 2011;79:3239–48.
- [23] Liu Y, Burne RA. Multiple two-component systems of *Streptococcus mutans* regulate agmatine deiminase gene expression and stress tolerance. *J Bacteriol* 2009;191:7363–6.
- [24] Liu Y, Wang L, Zhou X, Hu S, Zhang S, Wu H. Effect of the antimicrobial decapeptide KSL on the growth of oral pathogens and *Streptococcus mutans* biofilm. *Int J Antimicrob Agents* 2011;37:33–8.
- [25] Lobo MM, Gonçalves RB, Pimenta LA, Bedran-Russo AK, Pereira PN. In vitro evaluation of caries inhibition promoted by self-etching adhesive systems containing antibacterial agents. *J Biomed Mater Res B: Appl Biomater* 2005;75:122–7.
- [26] Lorenzón EN, Cespedes GF, Vicente EF, Nogueira LG, Bauab TM, Castro MS, et al. Effects of dimerization on the structure and biological activity of antimicrobial peptide Ctx-Ha. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:3004–10.
- [27] Mazda Y, Kawada-Matsuo M, Kanbara K, Oogai Y, Shibata Y, Yamashita Y, et al. Association of CiaRH with resistance of *Streptococcus mutans* to antimicrobial peptides in biofilms. *Mol Oral Microbiol* 2012;27:124–35.
- [28] Mejare I, Stenlund H, Zelezny-Homlund C. Caries incidence and lesion progression from adolescence to young adulthood: a prospective 15-year cohort study in Sweden. *Caries Res* 2004;38:130–41.
- [29] Merritt J, Qi F, Goodman SD, Anderson MH, Shi W. Mutation of luxS affects biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 2003;71:1972–9.
- [30] Mikami Y, Suzuki N, Takahashi T, Otsuka K, Tsuda H. Bacitracin upregulates *mbrAB* transcription via *mbrCD* to confer bacitracin resistance in *Streptococcus mutans*. *J Pharmacol Sci* 2011;117:204–7.
- [31] Napimoga MH, Kamiya RU, Rosa RT, Rosa EA, Höfling JF, Mattos-Graner RO, et al. Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-active individuals. *J Med Microbiol* 2004;53:697–703.
- [32] O'toole GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* 1998;28:449–61.

- [33] Pitts NB, Boyles J, Nugent ZJ, Thomas N, Pine CM. The dental caries experience of 5-year-old children in England and Wales (2003/4) and in Scotland (2002/3). Surveys co-ordinated by the British Association for the Study of Community Dentistry. *Community Dent Health* 2005;22:45–56.
- [34] Pitts NB. Are we ready to move from operative to non-operative/preventive treatment of dental caries in clinical practice. *Caries Res* 2004;38:294–304.
- [35] Sá NC, Cavalcante TT, Araújo AX, Santos HS, Albuquerque MR, Bandeira PN, et al. Antimicrobial and antibiofilm action of Casbane Diterpene from *Croton nepetaefolius* against oral bacteria. *Arch Oral Biol* 2012;57:550–5.
- [36] Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet* 2007;369:51–9.
- [37] Sibley CD, Parkins MD, Rabin HR, Surette MG. The relevance of the polymicrobial nature of airway infection in the acute and chronic management of patients with cystic fibrosis. *Curr Opin Invest Drugs* 2009;10:787–94.
- [38] Silva BR, Freitas VAA, Nascimento-Neto LG, Carneiro VA, Arruda FVS, Aguiar ASW, et al. Antimicrobial peptide control of pathogenic microorganisms of the oral cavity: a review of the literature. *Peptides* 2012;36:315–21.
- [39] Stauder M, Papetti A, Daglia M, Vezzulli L, Gazzani G, Varaldo PE, et al. Inhibitory activity by barley coffee components towards *Streptococcus mutans* biofilm. *Curr Microbiol* 2010;61:417–21.
- [40] US Department of Health and Human Services. Oral health in America: a report of the Surgeon General. Rockville: National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health; 2000. p. 308.
- [41] Wang W, Tao R, Tong Z, Ding Y, Kuang R, Zhai S, et al. Effect of a novel antimicrobial peptide chrysophsin-1 on oral pathogens and *Streptococcus mutans* biofilms. *Peptides* 2012;33:212–9.
- [42] Wu C, Ayala EA, Downey JS, Merritt J, Goodman SD, Qi F. Regulation of ciaXRH operon expression and identification of the CiaR regulon in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* 2010;192:4669–79.



Review

Antimicrobial peptide control of pathogenic microorganisms of the oral cavity: A review of the literature

Bruno Rocha da Silva^{a,*}, Victor Aragão Abreu de Freitas^a, Luiz Gonzaga Nascimento-Neto^a, Victor Alves Carneiro^b, Francisco Vassiliepe Sousa Arruda^a, Andréa Silvia Walter de Aguiar^c, Benildo Sousa Cavada^b, Edson Holanda Teixeira^{a,*}

^a LIBS, Integrate Biomolecules Laboratory, Faculty of Medicine of Sobral, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^b BioMol-Lab, Laboratory of Biologically Active Molecules, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^c Clinical Dentistry Department, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 April 2012

Received in revised form 24 May 2012

Accepted 24 May 2012

Available online 1 June 2012

Keywords:

Antimicrobial peptide

Biofilm

Dental caries

Periodontal disease

ABSTRACT

Antimicrobial peptides, molecules produced in many different organisms, have high biocidal activity against several microorganisms. However, several questions about these molecules remain unclear. Therefore, this report details a systematic survey of the literature on the use of antimicrobial peptides against oral pathogens and indicates which peptides and microorganisms are most extensively studied. Articles were located using the PubMed and Science Direct databases with the following inclusion criteria: publication date between 2002 and 2011; keywords “biofilm OR biological film OR biological layer OR bacterial growth” AND “peptide” AND “oral cavity OR mouth OR buccal mucosa OR oral mucosa OR mouth mucosa”; and abstract in English. A total of 73 articles were selected after refinement of the data. An increase in publications focusing on the use of antimicrobial peptides against oral microorganisms was observed. In addition, the peptides produced by cells of the oral mucosa (defensins, LL-37 and histatins) as well as *Streptococcus mutans* (among cariogenic bacteria) and *Porphyromonas gingivalis* (among periodontal bacteria) were the most studied subjects. It was concluded that the use of antimicrobial peptides as a tool for microbial control is of increasing importance, likely due to its widespread use, mechanism of action, and low rates of bacterial resistance.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	316
2. Materials and methods	316
2.1. Sample delimitation	316
2.2. Sample selection and classification	316
2.3. Statistical analysis	316
3. Results	316
3.1. Study distribution by time period	316
3.2. Language of publication	317
3.3. Number of species studied and susceptibility assay used	317
3.4. AMPs and microorganisms studied	317
4. Discussion	318
4.1. Oral biofilms development	318
4.2. A new class of antimicrobial agents: the AMPs	319
4.3. Cathelicidin LL-37	319

* Corresponding authors at: Federal University of Ceará, Rua Geraldo Rangel, 100 - Campus do Derby - CEP 62041-040 - Sobral, CE, Brazil. Tel.: +55 88 3611 8000; fax: +55 88 3611 2202.

E-mail addresses: brunorochoa747@gmail.com (B.R.d. Silva), edson@ufc.br (E.H. Teixeira).

4.4. Histatins	319
4.5. Defensins	319
4.6. AMPs mechanisms of action.....	319
4.7. AMPs limitations and future directions	320
5. Conclusions.....	320
Acknowledgments.....	320
References.....	320

1. Introduction

Dental caries and periodontal disease are considered the most prevalent bacterial infections diseases in humans because they together affect 60–90% of the world population [50].

With respect to carious lesions, epidemiological data vary according to the population. In the United States, approximately 90% of all teenagers or young adults have or have had carious lesions [11]. In Australia, 60% of adolescents over the age of 20 have one or multiple sites of tooth demineralization [30].

Periodontal diseases are considered the main causes of tooth loss, which occurs in 15–25% of American adults [5].

The main etiological factor of such oral lesions is the colonization of pathogenic microorganism on the oral surfaces [35]. Such microorganisms vary depending on the lesion studied, development time, and host factors. However, the ability of these colonizers to grow in biofilms is one of the most important virulence factors and, correspondingly, one of their most extensively studied properties [34].

Biofilms are complex microbial communities established on a wide variety of surfaces. They are generally associated with an extracellular matrix consisting of several types of biopolymers [1].

Growth within biofilms grants protection from antibiotics due to the reduced penetration of various antimicrobial agents into its inner structure [14]. Microorganisms in biofilms are thus extremely difficult or impossible to eradicate [2,64].

Therefore, the search for new molecules that inhibit the growth of planktonic microbes and/or the development of such microbes into biofilms has been intensified in recent years.

In this context, antimicrobial peptides (AMPs) have been the focus of several studies in the field of Oral Microbiology. AMPs are a heterogeneous group of molecules produced by various tissues and cell lines in a range of species of invertebrates, plants and animals. As components of the innate immune response of multicellular organisms, AMPs, which possess biocidal activity against several microorganisms, significantly reduce infections. These molecules have been shown to be promising agents in controlling microbial growth due to its low concentration and selective antimicrobial activity, as well as low rates of microbial resistance induction [3,60].

The objective of this study was to carry out a systematic survey of the literature on the use of antimicrobial peptides against oral pathogens, focusing on dental caries and periodontal disease, and indicate which peptides and microorganisms are the most extensively studied, with the ultimate goal of tracing a profile of scientific publications in this area.

2. Materials and methods

2.1. Sample delimitation

The following international journal databases were reviewed: Science Direct and PubMed. Selection of these databases was based on the breadth of journals covered by each and our goal to provide an overview of the scientific research devoted to this topic over the long timeframe under analysis [56].

The following inclusion criteria were considered during the review: (a) articles published between January 2002 and December 2011; (b) the presence of the MeSH keywords “biofilm OR biological film OR biological layer OR bacterial growth” AND “peptide” AND “oral cavity OR mouth OR buccal mucosa OR oral mucosa OR mouth mucosa”, entered into the advanced search form; and (c) the availability of an abstract in English. A total of 280 articles were found.

For comparison, we also conducted a second survey of publications on agents with antimicrobial activity. This survey was conducted using the same inclusion criteria described above but replaced the keywords “peptide” AND “antimicrobial agent”.

2.2. Sample selection and classification

All the abstracts found were read. Review articles and those that did not fit the scope of the survey were excluded, resulting in a total of 73 publications related to AMPs and 388,727 articles related to the larger area of antimicrobial agents. These abstracts were read and classified for subsequent quantitative analysis. In cases where the abstract was too short to allow for classification, the full article was read. Each article was classified according to the following attributes: title of article, year of publication (subcategories [biennium]: first period, 2002–2003; second period, 2004–2005; third period, 2006–2007; fourth period, 2008–2009; fifth period, 2010–2011), journal name, language of publication, number and types of AMPs assessed, and number and species of microorganism analyzed in the study. The origin of the AMPs as well as the model of antimicrobial assay (planktonic and/or biofilm) were verified.

2.3. Statistical analysis

Data were entered into Microsoft Excel 2007 spreadsheets and systematically transferred to the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 17.0 for statistical analysis. Frequency distribution calculations were used to assess general sample characteristics, to investigate possible spelling errors in the raw data, and to obtain an overview of the use of AMPs against oral microorganisms.

3. Results

3.1. Study distribution by time period

Analysis of the distribution of publications over the different bienniums showed homogeneity during the first four periods. However, despite slight increases in earlier years, the fifth period (2010–2011) showed a large increase in the number of publications on the use of antimicrobial peptides to control pathogenic microorganisms. The publications from this period comprise 43.8% (32 articles) of all publications analyzed in this study (Table 1).

Studies of the larger field of antimicrobial agents also increased slightly in earlier years. In contrast with the increase in publications seen above, papers in the larger field decreased in the final biennium (Table 2).

Table 1
Distribution of publications related to AMP from 2002 to 2011, per biennium.

	Absolute value (n)	Relative value (%)	Cumulative relative frequency (%)
2002–2003	9	12.4	12.4
2004–2005	9	12.4	24.8
2006–2007	11	15	39.8
2008–2009	12	16.4	56.2
2010–2011	32	43.8	100
Total	108	100	

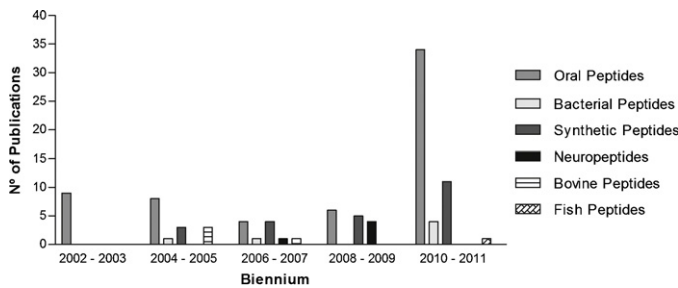
**Fig. 1.** Distribution of publications in accordance with the source of AMPs studied, per biennium.

Fig. 1 shows the same distribution of studies, however, divided according to the origin of the analyzed AMP. A predominance of publications in all bienniums were the AMPs produced by cells of the oral mucosa. These studies, as well as those on synthetic AMPs, showed significant growth over the years, especially during the final period (three articles in the second period, four in the third, five in the fourth, and 11 in the fifth) (Fig. 1).

3.2. Language of publication

Most of the reviewed articles were written in English (63 articles, 86.3%), followed by German (3, 4.1%), Japanese (3, 4.1%), French (3, 4.1%) and Chinese (1, 1.4%).

3.3. Number of species studied and susceptibility assay used

From a total of 73 studies, 43 (58.9%) analyzed only one species, seven (9.6%) analyzed two, and 23 (31.5%) analyzed three or more species. Furthermore, the assay used for testing susceptibility to AMPs should be noted; 52 articles (71.3%) performed analyzes on microorganisms in their planktonic form, 18 (24.6%) used monospecies microorganisms in biofilms, and only three articles (4.1%) performed tests on multi-species biofilms.

3.4. AMPs and microorganisms studied

The list for the analyzed AMPs and microorganisms, as well as their absolute and relative frequencies, is noted in Tables 3 and 4.

Table 2
Distribution of publications in the larger area from 2002 to 2011, per biennium.

	Absolute value (n)	Relative value (%)	Cumulative relative frequency (%)
2002–2003	65.202	16.77	16.77
2004–2005	73.091	18.81	35.58
2006–2007	79.967	20.57	56.15
2008–2009	86.811	22.33	78.48
2010–2011	83.656	21.52	100
Total	388.727	100	

Table 3
AMP distribution according to their classification by origin.^a

	Absolute value (n)	Relative value (%)	Cumulative relative frequency (%)
Oral peptide			
α-Defensin 1	6	6	6
α-Defensin 2	2	2	8
α-Defensin 3	1	1	9
β-Defensin 1	5	5	14
β-Defensin 2	9	9	23
β-Defensin 3	8	8	31
β-Defensin 4	1	1	32
Cathelicidin LL-37	12	12	44
Histatin 3	1	1	45
Histatin 5	13	13	58
Lactoferrin	5	5	63
Neuropeptides			
Neurokinin A	2	2	65
Neuropeptide Y	3	3	68
Bacterial peptides			
Nisin	5	5	73
Fish peptides			
Pleurocidin	1	1	74
Bovine peptides			
Lactoferrin	3	3	77
Synthetic peptides			
2-1G2	1	1	78
C16G2	1	1	79
Clavanin	1	1	80
CSP	1	1	81
DHVAR5	1	1	82
GL13	1	1	83
GL13-K	1	1	84
GL13-NH2	1	1	85
IgG-SMAP28	2	2	87
IgG-SMAP29	1	1	88
JH8194	1	1	89
JH 8195	1	1	90
JH8944	1	1	91
KSL	1	1	92
KSL-W	1	1	93
M8(KH)-20	1	1	94
PMX000519	1	1	95
PMX30016	1	1	96
PMX70004	1	1	97
SM4	1	1	98
SM8	1	1	99
Subtilisin A	1	1	100
Total	100	100	

^a More than one AMP was assessed in some articles. Therefore the total number of AMPs analyzed exceeds the total number of studies reviewed.

Among all the AMPs found, oral peptides were the most predominantly studied (63%), followed by synthetic AMPs (23% of studies).

With respect to the microorganisms studied, a homogeneous distribution can be noted when evaluating the absolute values. However, when analyzing the relative frequencies, we find a concentration of publications focused on the microorganisms involved in the process of dental caries (52.5%) and periodontal disease (28.8%). Moreover, the main bacteria related to their respective infectious processes were the main targets of research (*Streptococcus mutans*, 36 articles; *Candida albicans*, 21 articles; *Porphyromonas gingivalis*, 13 articles; and *Enterococcus faecalis*, 10 articles).

Finally, in order to better demonstrate the spectrum of scientific publications in this area, comparisons were made between the primary AMP evaluated in a paper and the groups of microorganisms studied in that paper (Table 5). It was found that the group of periodontal bacteria was most associated with the cathelicidin LL-37 peptide (15 studies), and

Table 4
Distribution of microbial species according to their associated pathology.^a

	Absolute value (n)	Relative value (%)	Cumulative relative frequency (%)
Periodontopathogenic bacteria			
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	9	5	5
<i>A. israelii</i>	1	0.5	5.5
<i>A. naeslundii</i>	5	2.8	8.3
<i>A. viscosus</i>	2	1.1	9.4
<i>E. corrodens</i>	1	0.5	9.9
<i>F. nucleatum</i>	5	2.8	12.7
<i>P. gingivalis</i>	13	7.2	19.9
<i>P. intermedia</i>	3	1.7	21.6
<i>P. micros</i>	3	1.7	23.3
<i>P. nigrescens</i>	1	0.5	23.8
<i>T. denticola</i>	3	1.7	25.5
<i>T. forsythia</i>	2	1.1	26.6
<i>V. atypica</i>	4	2.2	28.8
Cariogenic bacteria			
<i>L. acidophilus</i>	6	3.3	32.1
<i>L. casei</i>	7	3.8	35.9
<i>L. fermenti</i>	2	1.1	37
<i>S. gordonii</i>	15	8.4	45.4
<i>S. mitis</i>	7	3.8	49.2
<i>S. mutans</i>	36	19.9	69.1
<i>S. sanguinis</i>	15	8.4	77.5
<i>S. sobrinus</i>	7	3.8	81.3
Endodontic-lesion-related bacteria			
<i>E. faecalis</i>	10	5.5	86.8
Candidiasis-related Yeasts			
<i>C. albicans</i>	21	11.6	98.4
<i>C. dubliniensis</i>	2	1.1	99.5
<i>C. glabrata</i>	1	0.5	100
Total	181	100	

^a More than one microbial species was assessed in some articles. Therefore, the total number of microorganisms analyzed exceeds the total number of studies reviewed.

the β -defensin 2 AMP was most associated with cariogenic bacteria (9 studies); nisin was associated with microorganisms associated with endodontic infections (3 studies), and histatin 5 was associated with fungi related to candidiasis (12 studies).

4. Discussion

4.1. Oral biofilms development

The concept that microorganisms, especially bacteria, preferably live in communities enclosed in a polysaccharide matrix bound onto surfaces emerged gradually from scientific observations over

time. In the last two decades, however, this concept was remarkably strengthened [33]. These microbial communities, called biofilms, are complex structures that give associated microorganisms a survival mode that differs from the one they experience in planktonic form [12,13].

In the oral cavity, many microorganisms are capable of developing in harmony with the host. However, frequent ecological changes occur within the microbial community and result in the development of two major oral diseases: dental caries and periodontal disease [4,58].

The development of oral biofilms is complex and follows a very careful chronology. In general, oral bacteria possess mechanisms for adhesion to solid surfaces coated with saliva film, such as teeth, or a desquamative surface, such as epithelial tissue, or even bacteria already adhered on the surface [33,46]. The adherence of microbial cells to bacteria that are already immobilized on a surface is called coadhesion, while the binding of bacteria or microorganisms in suspension is called coaggregation [34]. Thus, the construction of oral biofilm is initiated by certain bacterial strains that have the ability to adhere to tooth enamel. Such bacteria are called early colonizers, and their main representatives are *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, and *Streptococcus parasanguinis* for predominantly cariogenic biofilms. Bacteria of the genus *Actinomyces* are implicated in periodontopathogenic biofilms. This relationship between early colonizers and the pathological process is due to bacterial selectivity itself in the coadhesion system; however, this strategy does not prevent the cross-holdings of these early colonizers in other diseases [19,34]. After the initial adhesion by the primary colonizers, biofilm development begins with the adhesion of other cells with receptors (selectins and adhesins) that allow selective adhesion to other microorganisms [19]. In the caries process, *S. mutans* and *Streptococcus sobrinus* deserve particular attention, while *Fusobacterium nucleatum* and *P. gingivalis* have a strong impact on the periodontopathogenic process [33,34]. Given the crucial importance of these microorganisms in these pathogenic processes, many studies are focused on the discovery of new methods of bacterial control (Table 4).

Although they are not the original colonizers of cariogenic biofilm, *S. mutans* and *S. sobrinus* are the main components responsible for tooth demineralization due to their ability to produce acid, which promotes the tooth demineralization process, and survive in an acidic environment [6].

Periodontal bacteria lack the acidogenic potential of cariogenic bacteria but are able to form more resistant biofilms and secrete lytic enzymes that degrade periodontal tissue [17,59]. Moreover, the dominant characteristic of periodontopathogenic bacteria is their ability to survive in anaerobic or facultative aerobic conditions [61].

Table 5
AMP distribution in accordance with the group of microorganisms examined in the review articles.^a

	Analyzed AMP									Total
	α -Defensin 1	β -Defensin 2	Cathelicidin LL-37	Histatin 5	Human Lactoferrin	Neuropeptide Y	Nisin	IgG-SMAP28		
Periodontopathogenic bacteria	N	2	9	15	1	2	1	2	9	41
	%	1.8	7.8	13.1	0.9	1.8	0.9	1.8	7.8	36
Cariogenic bacteria	N	9	4	6	3	7	8	8	2	47
	%	7.8	3.5	5.2	2.6	6.1	7	7	1.8	41.2
Endodontic-lesion-related bacteria	N	0	0	2	0	1	1	3	0	7
	%	0	0	1.8	0	0.9	0.9	2.6	0	6.1
Candidiasis-related Yeasts	N	1	0	2	12	1	2	1	0	19
	%	0.9	0	1.8	10.5	0.9	1.8	0.9	0	16.7
Total	N	12	13	25	16	11	12	14	11	114
	%	10.5	11.4	22	14.1	9.6	10.5	12.3	9.6	100

^a More than one microorganism and/or AMP was studied in some articles; therefore, the total number of publications exceeds the total number reviewed.

When studying the topic “Number of species studied and susceptibility assay used”, it was noted that more than half of the studies used only a single organism. Furthermore, the primary method used was to assess the susceptibility of microorganisms in their planktonic state. This state is not characteristic of the oral cavity, in which the biofilm mode of survival predominates.

However, studies addressing monospecies biofilms or bacteria in a planktonic state should not be disregarded, given the fact that they are fully able to demonstrate the antimicrobial potential of a given compound, as showed in studies by [9,10].

4.2. A new class of antimicrobial agents: the AMPs

Between 1920 and 1950, several compounds with antimicrobial properties were isolated from secretions of various living beings, including arachnids, amphibians, plants, and humans [22,57]. These compounds showed biological activity in small concentrations, exhibiting a peculiar selectivity for both Gram-positive and Gram-negative bacteria. These were designated as antimicrobial peptides and reported to kill or retard the growth of invading microorganisms, thereby contributing to the natural mechanism of adaptive immunity of the host [44].

In recent years, the study of AMPs as a new class of antimicrobial therapeutic agents has attracted considerable interest in many research centers [45,62]. This concern is justified by the rapid increase in the incidence of pathogens resistant to conventional drugs, which represents an important public health problem around the world [20,63].

In Table 1, the significant growth in the number of studies involving AMPs is evident, and those involving oral microorganisms were slightly evaluated in the first eight years of the studied period. However, in the last biennium, a significant leap in the number of publications was observed. It can be suggested that the advancements made in the techniques of obtaining and purifying molecules, in addition to constant research on these molecules, is the main factor that caused this increase [3,23,32,44].

Unlike the larger field of antimicrobial compounds, research in this subarea grew during the period in question (Table 2). The increase in number of publications noted in this table is slight in the early years, whereas the number of publications decreased during the last two years. Comparison of Tables 1 and 2 shows how researchers are increasingly focused on AMPs relative to other antimicrobial compounds.

The relationship between AMPs and the oral mucosal immune system may be responsible for the results shown in Fig. 1, which highlights the focus on oral cavity AMPs in the most recently published studies. These studies target compounds such as cathelicidin LL-37 (12 items) and histatin-5 (13 items) (Table 3).

4.3. Cathelicidin LL-37

The cathelicidins are proteins with N-terminal regions carrying highly conserved cathelin domains and a C-terminal region that is less well conserved and carries antimicrobial properties. These properties vary among species, which produce peptides with a wide variety of sizes, structures, and sequences [24,66]. Only one cathelicidin has been identified in humans, the cationic antimicrobial peptide of 18 kDa (hCAP18). This peptide is expressed by neutrophils and epithelial tissues, especially in the oral cavity and respiratory tract. When in need, hCAP18 is expressed and cleaved by proteases that generate a 37 amino acid antimicrobial peptide, LL-37 [27]. Several studies have demonstrated the potent antimicrobial activity of this peptide against oral microorganisms [31,41,51], including *Staphylococcus* species [16,52], and

its function in chemotaxis and stimulation of monocytes, T cells, neutrophils and mast cells [27].

4.4. Histatins

The histatins comprise a family of low molecular weight cationic proteins and are produced and secreted by the parotid, submandibular, and sublingual glands [21]. Histatins generally exhibit apoptotic activities on various microbial strains, as well as potent antifungal activity [21]. Histatin-5, a peptide composed of 24 amino acids, has the highest level of activity against *C. albicans* among all family members, including activity against species resistant to conventional antifungal agents. It is believed that this peptide exerts its antifungal activity by binding to receptors on the cell membrane and, after internalization, inhibits mitochondrial respiration by forming reactive oxygen species, which damage mitochondrial and cytoplasmic membranes and lead to ATP efflux and cell death [43]. Studies on the activity of histatin-5 have been conducted against biofilms of *C. albicans* because they are common colonizers of dental prostheses and can cause diseases such as candidiasis [49,53].

4.5. Defensins

A third class of peptides, the defensins, is notably highly studied (Table 3). This group of AMPs, composed of more than 380 members, contains conserved motifs of six cysteine residues forming intramolecular disulfide bonds and β -sheets [23]. They are believed to have originated as components of prokaryotic immune systems [68], and over time, differentiated into the defensins of plants, arthropods, and higher animals such as birds, reptiles, and mammals. At some point in the evolution of mammals, defensins separated into two subgroups, the α -defensins and β -defensins, which are structurally similar but have distinct activities and production sites [65]. In general, defensins are expressed in response to microorganism-induced stress and are responsible for the migration and activation of cells from the innate immune system [18]. Furthermore, studies show the antimicrobial activity of defensins on oral streptococci through mechanisms of cell rupture and inhibition of lipopolysaccharide production [26,55].

4.6. AMPs mechanisms of action

The mechanisms of action of AMPs are not yet fully understood. However, some theories about how these molecules act on cell membrane and bacterial metabolism have been proposed following studies using fluorescent microscopy, circular dichroism, mass spectrometry, and studies with model membranes [8,29,40,60,67].

Biocide activity models include cell death by both extracellular and intracellular paths. Regarding the models of extracellular interactions, the AMPs are initially attracted to the surface of microorganisms by electrostatic interactions between the anionic or cationic peptide and structures on the cell surface [39]. In the case of Gram-negative bacteria, the main interactions occur between cationic peptides and the negative charges present on the bacterial envelope, principally the anionic phospholipid and the phosphate group of lipopolysaccharide. In Gram-positive bacteria, the primary relationship occurs between anionic AMPs and the cell surface teichoic acid [8]. After the initial attraction, the AMP binds to cell surfaces and initiates the attachment phase. In this phase, the AMP crosses through the outer membrane (lipopolysaccharides in Gram-negative bacteria and teichoic and lipoteichoic acids in Gram-positive bacteria) and interacts directly with the bacterial cytoplasmic membrane [8]. At low peptide/lipid ratios, the AMPs are connected in parallel to the lipid bilayer. As this ratio increases, the peptides begin to orient perpendicularly to the membrane.

When peptide/lipid ratios are high, AMPs will start to penetrate the cell membrane, leading to the formation of transmembrane pores that subsequently cause cell death by loss of fluid and disruption of the cell membrane [40].

Though seemingly simple, different modeling studies have explored the dynamics of death generated by membrane damage. The barrel-stave model suggests that peptides arrange in the membrane in the form of a “barrel”, which allows for the flow of intracellular contents out into the extracellular environment [25]. The carpet model highlights the idea that when AMPs accumulate parallel with the cell surface, they are oriented to penetrate the lipid bilayer and form pores for the entry of more peptides into the cell. The accumulation of these peptides, which are now also on the inner side of the cell membrane, induces the formation of mycelia, which are released from the membrane, and starts its disintegration [41]. Finally, the toroidal-pore model indicates that the insertion of AMP helices on the cell membrane leads to connection of the lipid monolayers opposed to each other continuously and bilaterally, which causes the formation of pores that, similarly to the first model, allow fluid outflow to the external environment [7].

Although the lysis of the cell membrane leads to bacterial killing, the increase in the number of studies report that there are other methods of cell death is remarkable. Recent research revealed the presence of important intracellular targets for cell death. Examples of such activities are the inhibition of DNA synthesis, RNA and proteins, usually related to pleurocidin, α -defensin 1 and α -defensin 2, and the inhibition of enzymatic activity associated with histatins [32,47,48,54].

Though the membrane damage models vary, they are most likely linked. In 2005, Brogden noted that such mechanisms do not appear independently but are correlated and appear gradually. However, several factors may be closely associated with the effectiveness and specificity of the peptide, such as its size, amino acid sequence, charge, conformation and structure, hydrophobicity and amphipathicity [8].

Table 5 highlights some aspects that deserve attention. Initially, it can be noted that studies related to periodontal and cariogenic bacteria occur frequently and analyze a broad distribution of peptides. This finding is consistent with the epidemiological data discussed earlier, which indicates that, due to their clinical impacts, studies of diseases are more attractive to researchers. The distribution of studies on fungal diseases differs from the above trends, as such publications are frequent and closely related to histatin-5, a peptide that has demonstrated antifungal activity against other yeasts [36–38].

4.7. AMPs limitations and future directions

Despite all the advantages that AMPs demonstrate, including activity at low concentrations and across a wide spectrum, there are some limits to their therapeutic utility. One limitation is that the high cationic activity most AMPs have in non-physiological conditions is significantly reduced in biological fluids such as plasma, serum or saliva. When combined with the high toxicity of some AMPs and their quick renal excretion, it is difficult or impossible to use some AMPs by the parenteral route. Furthermore, the high cost of production of native peptides is, sometimes, an obstacle for therapeutic application of these molecules [3,44].

Attempts to work around these limitations include the design of modified peptides with the same antimicrobial characteristics of the original AMP, but with altered cytotoxic domains, which confers greater biocompatibility with human tissues [15]. In addition, specifically targeted AMPs (STAMPs) have been explored in recent studies. Such molecules are modified to carry peptide to recognition domains specific for a particular group of microorganisms. This

feature enables the AMPs to affect specific microbes without changing the whole indigenous microbial population [28,42].

5. Conclusions

After analyzing the results obtained in this bibliographical research and the discussion held earlier, it can be concluded that antimicrobial peptides are valuable tools for the control of microorganisms and biofilms of the oral cavity and that their study has become increasingly common over the last several years.

Although other studies are needed to better understand the mechanisms of AMP action and to reduce the adverse effects of these molecules, methods such as the design of synthetic peptides and STAMPs are becoming increasingly viable, especially when new developments in protein synthesis and purification are considered.

However, larger studies focused on more organisms and, in particular, the evaluation of AMPs on microorganisms in biofilms multispecies is necessary in order to fully investigate the potential for AMPs used in the oral cavity.

Acknowledgments

We would like to thank CNPq, CAPES and FUNCAP for financial support. BSC and EHT are senior investigators of CNPq.

References

- [1] Abee T, Kovács AT, Kuipers OP, van der Veen S. Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Curr Opin Biotechnol* 2010;22:1–8.
- [2] Alhede M, Bjarnsholt T, Jensen PO. *Pseudomonas aeruginosa* recognizes and responds aggressively to the presence of polymorphonuclear leukocytes. *Microbiology* 2009;155:3500–8.
- [3] Batoni G, Maisetta G, Brancatisano FL, Esin S, Campa M. Use of antimicrobial peptides against microbial biofilms: advantages and limits. *Curr Med Chem* 2011;18:256–79.
- [4] Beikler T, Flemmig TF. Oral biofilm-associated diseases: trends and implications for quality of life, systemic health and expenditures. *Periodontology* 2011;55:87–103.
- [5] Borrell LN, Burt BA, Taylor GW. Prevalence trends in periodontitis in the USA: from the NHANES III to the NHANES, 1988 to 2000. *J Dent Res* 2005;84:924–30.
- [6] Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res* 2011;45:69–86.
- [7] Bozelli Jr JC, Sasahara ET, Pinto MR, Nakaie CR, Schreier S. Effect of head group and curvature on binding of the antimicrobial peptide tritripticin to lipid membranes. *Chem Phys Lipids* 2011.
- [8] Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 2005;3:238–50.
- [9] Carneiro VA, Santos HS, Arruda FV, Bandeira PN, Albuquerque MR, Pereira MO, et al. Casbane diterpene as a promising natural antimicrobial agent against biofilm-associated infections. *Molecules* 2010;16:190–201.
- [10] Cavalcante TT, Rocha BAM, Carneiro VA, Arruda FVS, Nascimento ASF, Sá NC, et al. Effect of lectins from *Diocleinae* subtribe against oral *Streptococci*. *Molecules* 2011;16:3530–43.
- [11] Chen F, Wang D. Novel technologies for the prevention and treatment of dental caries: a patent survey. *Expert Opin Ther Pat* 2010;20:681–94.
- [12] Costerton JW, Geesey GG, Cheng K-J. How bacteria stick. *Sci Am* 1978;238:86–95.
- [13] Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995;49:711–45.
- [14] Costerton W, Veeh R, Shirtliff M, Pasmore M, Post C, Ehrlich G. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest* 2003;112:146–7.
- [15] Daep CA, Novak EA, Lamont RJ, Demuth DR. Selective substitution of amino acids limits proteolytic cleavage and improves the bioactivity of an anti-biofilm peptide that targets the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*. *Peptides* 2010;31:2173–8.
- [16] Dean SN, Bishop BM, van Hoek ML. Natural and synthetic cathelicidin peptides with anti-microbial and anti-biofilm activity against *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol* 2011;11:114.
- [17] Deo V, Bhongade ML. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response. *Dent Today* 2010;29:60–2, 64–6; quiz 68–9.
- [18] Diamond G, Beckloff N, Weinberg A, Kisich KO. The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. *Curr Pharm Des* 2009;15:2377–92.
- [19] Dige I, Nilsson H, Kilian M, Nyvad B. In situ identification of *streptococci* and other bacteria in initial dental biofilm by confocal laser scanning microscopy and fluorescence in situ hybridization. *Eur J Oral Sci* 2007;115:459–67.

- [20] DiMasi JA, Hansen RW, Grabowski HG. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J Health Econ* 2003;22:151–85.
- [21] Edgerton M, Koshlukova SE. Salivary histatin 5 and its similarities to the other antimicrobial proteins in human saliva. *Adv Dent Res* 2000;14:16–21.
- [22] Fleming A. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proc R Soc London B* 1922;93:306–17.
- [23] Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003;3:710–20.
- [24] Gennaro R, Zanetti M. Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers* 2000;55:31–49.
- [25] Gkeka P, Sarkisov L. Interactions of phospholipid bilayers with several classes of amphiphilic alpha-helical peptides: insights from coarse-grained molecular dynamics simulations. *J Phys Chem B* 2010;114:826–39.
- [26] Gomes PS, Fernandes MH. Defensins in the oral cavity: distribution and biological role. *J Oral Pathol Med* 2010;39:1–9.
- [27] Gordon YJ, Huang LC, Romanowski EG, Yates KA, Prose RJ, McDermott AM. Human cathelicidin (LL-37), a multifunctional peptide, is expressed by ocular surface epithelia and has potent antibacterial and antiviral activity. *Curr Eye Res* 2005;30:385–94.
- [28] He J, Yarbrough DK, Kreth J, Anderson MH, Shi W, Eckert R. Systematic approach to optimizing specifically targeted antimicrobial peptides against *Streptococcus mutans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:2143–51.
- [29] Henzler Wildman KA, Lee DK, Ramamoorthy A. Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide, LL-37. *Biochemistry* 2003;42:6545–58.
- [30] Jamieson LM, Armfield JM, Roberts-Thomson KF. Oral health inequalities among indigenous and nonindigenous children in the Northern Territory of Australia. *Community Dent Oral Epidemiol* 2006;34:267–76.
- [31] Ji S, Hyun J, Park E, Lee BL, Kim KK, Choi Y. Susceptibility of various oral bacteria to antimicrobial peptides and to phagocytosis by neutrophils. *J Periodontol Res* 2007;42:410–9.
- [32] Kavanagh K, Dowd S. Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. *J Pharm Pharmacol* 2004;56:285–9.
- [33] Kolenbrander PE. Multispecies communities: interspecies interactions influence growth on saliva as sole nutritional source. *Int J Oral Sci* 2011;3:49–54.
- [34] Kolenbrander PE, Palmer Jr RJ, Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell–cell distance. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:471–80.
- [35] Kolenbrander PE, Palmer Jr RJ, Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol* 2000 2006;42:47–79.
- [36] Komatsu T, Salih E, Helmerhorst EJ, Offner GD, Oppenheim FG. Influence of histatin 5 on *Candida albicans* mitochondrial protein expression assessed by quantitative mass spectrometry. *J Proteome Res* 2011;10:646–55.
- [37] Konopka K, Dorocka-Bobkowska B, Gebremedhin S, Düzgüneş N. Susceptibility of *Candida* biofilms to histatin 5 and fluconazole. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2010;97:413–7.
- [38] Kumar R, Chadha S, Saraswat D, Bajwa JS, Li RA, Conti HR, et al. Histatin 5 uptake by *Candida albicans* utilizes polyamine transporters Dur3 and Dur31 proteins. *J Biol Chem* 2011;286:43748–58.
- [39] Lee CC, Sun Y, Qian S, Huang HW. Transmembrane pores formed by human antimicrobial peptide LL-37. *Biophys J* 2011;100:1688–96.
- [40] Lee MT, Chen FY, Huang HW. Energetics of pore formation induced by membrane active peptides. *Biochemistry* 2004;43:3590–9.
- [41] Lee SH, Jun HK, Lee HR, Chung CP, Choi BK. Antibacterial and lipopolysaccharide (LPS)-neutralising activity of human cationic antimicrobial peptides against periodontopathogens. *Int J Antimicrob Agents* 2010;35:138–45.
- [42] Li LN, Guo LH, Lux R, Eckert R, Yarbrough D, He J, et al. Targeted antimicrobial therapy against *Streptococcus mutans* establishes protective non-cariogenic oral biofilms and reduces subsequent infection. *Int J Oral Sci* 2010;2:66–73.
- [43] Li XS, Sun JN, Okamoto-Shibayama K, Edgerton M. *Candida albicans* cell wall ssa proteins bind and facilitate import of salivary histatin 5 required for toxicity. *J Biol Chem* 2006;281:22453–63.
- [44] Nakatsuji T, Gallo RL. Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas. *J Invest Dermatol* 2012;132:887–95.
- [45] Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* 2007;70:461–77.
- [46] O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000;54:49–79.
- [47] Patrzykat A, Friedrich CL, Zhang L, Mendoza V, Hancock RE. Sublethal concentrations of pleurocidin derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:605–14.
- [48] Peschel A, Otto M, Jack RW, Kalbacher H, Jung G, Götz F. Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem* 1999;274:8405–10.
- [49] Peters BM, Zhu J, Fidel Jr PL, Scheper MA, Hackett W, El Shaye S, et al. Protection of the oral mucosa by salivary histatin-5 against *Candida albicans* in an *ex vivo* murine model of oral infection. *FEMS Yeast Res* 2010;10:597–604.
- [50] Petersen PE, Kandelman D, Arpin S, Ogawa H. Global oral health of older people – call for public health action. *Community Dent Health* 2010;27:257–67.
- [51] Phattaratarap E, Olson B, Broffitt B, Qian F, Brogden KA, Drake DR, et al. *Streptococcus mutans* strains recovered from caries-active or caries-free individuals differ in sensitivity to host antimicrobial peptides. *Mol Oral Microbiol* 2011;26:187–99.
- [52] Pompilio A, Scocchi M, Pomponio S, Guida F, Di Primio A, Fiscarelli E, et al. Antibacterial and anti-biofilm effects of cathelicidin peptides against pathogens isolated from cystic fibrosis patients. *Peptides* 2011;32:1807–14.
- [53] Pusateri CR, Monaco EA, Edgerton M. Sensitivity of *Candida albicans* biofilm cells grown on denture acrylic to antifungal proteins and chlorhexidine. *Arch Oral Biol* 2009;54:588–94.
- [54] Richard JP, Melikov K, Vives E, Ramos C, Verbeure B, Gait MJ, et al. Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J Biol Chem* 2003;278:585–90.
- [55] Schmidt NW, Mishra A, Lai GH, Davis M, Sanders LK, Tran D, et al. Criterion for amino acid composition of defensins and antimicrobial peptides based on geometry of membrane destabilization. *J Am Chem Soc* 2011;133:6720–7.
- [56] Silva BR, Arruda FVS, Carneiro VA, Cavalcante TTA, Aguiar ASW, Nascimento KS, et al. Lectins as biomarkers of oral cavity tumors: literature review. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2011;57:547–55.
- [57] Stuart LS, Harris TH. Bactericidal and fungicidal properties of a crystalline protein isolated from unbleached wheat flour. *Cereal Chem* 1942;19:288–300.
- [58] Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res* 2008;42:409–18.
- [59] Takeuchi H, Furuta N, Morisaki I, Amano A. Exit of intracellular *Porphyromonas gingivalis* from gingival epithelial cells is mediated by endocytic recycling pathway. *Cell Microbiol* 2011;13:677–91.
- [60] Tao R, Tong Z, Lin Y, Xue Y, Wang W, Kuang R, et al. Antimicrobial and antibiofilm activity of pleurocidin against cariogenic microorganisms. *Peptides* 2011;32:1748–54.
- [61] Tenorio EL, Klein BA, Cheung WS, Hu LT. Identification of interspecies interactions affecting *Porphyromonas gingivalis* virulence phenotypes. *J Oral Microbiol* 2011;3.
- [62] Tong Z, Dong L, Zhou L, Tao R, Ni L. Nisin inhibits dental caries-associated microorganism *in vitro*. *Peptides* 2010;31:2003–8.
- [63] Tong Z, Zhou L, Jiang W, Kuang R, Li J, Tao R, et al. An *in vitro* synergetic evaluation of the use of nisin and sodium fluoride or chlorhexidine against *Streptococcus mutans*. *Peptides* 2011;32:2021–6.
- [64] van Gennip M, Christensen LD, Alhede M. Inactivation of the *rhlA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* prevents rhamnolipid production, disabling the protection against polymorphonuclear leukocytes. *APMIS* 2009;117:537–46.
- [65] Wong JH, Xia L, Ng TB. A review of defensins of diverse origins. *Curr Protein Pept Sci* 2007;8:446–59.
- [66] Zanetti M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J Leukoc Biol* 2004;75:39–48.
- [67] Zhao H, Mattila JP, Holopainen JM, Kinnunen PK. Comparison of the membrane association of two antimicrobial peptides, magainin 2 and indolicidin. *Biophys J* 2001;81:2979–91.
- [68] Zhu S. Evidence for myxobacterial origin of eukaryotic defensins. *Immunogenetics* 2007;59:949–54.