



Universidade  
Estadual de Londrina

---

ALICE TAYOKO OGAWA

**CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES  
PROTEOLÍTICAS DA BACTÉRIA ANAERÓBIA**  
*Fusobacterium nucleatum*

ALICE TAYOKO OGAWA

**CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES  
PROTEOLÍTICAS DA BACTÉRIA ANAERÓBIA**  
*Fusobacterium nucleatum*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Shiduca Itow Jankevicius

Londrina  
2004

ALICE TAYOKO OGAWA

**CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES  
PROTEOLÍTICAS DA BACTÉRIA ANAERÓBIA *Fusobacterium  
nucleatum***

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. SHIDUCA ITOW JANKEVICIUS

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. MIRIAM MARUBAYASHI HIDALGO

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. HALHA OSTRENSKY SARIDAKIS

Londrina, 29 de março de 2004.

## **DEDICATÓRIA**

*À minha família pelo apoio, incentivo e sempre presente em todas as situações da minha vida!*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar sempre o meu caminho.

A minha família pelo incentivo e apoio.

A prof<sup>a</sup> Shiduca I. Jankevicius pela sua amizade e confiança em me acolher no seu laboratório para o estágio e treinamento, principalmente na orientação do trabalho de pesquisa.

A prof<sup>a</sup> e amiga Luzia Paccola por ter sido a primeira pessoa a despertar o interesse pelo mestrado em Microbiologia.

Ao amigo de todas as horas, Manzélio Cavazzana, pelo carinho e dedicação constante no treinamento durante o estágio.

À prof<sup>a</sup> Halha Saridakis pelo sempre apoio, conhecimento científico e pelo estágio conseguido na Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Aos professores da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Milton de Uzeda, Maria Cândida de Souza Ferreira e Regina Maria Cavalcanti Pilloto Domingues pela acolhida, amizade, repasse dos conhecimentos sobre bactérias anaeróbias e pelo fornecimento da cepa estudada.

Ao Joaquim, técnico do Laboratório de Anaeróbios da mesma instituição pela prontidão em preparar as cepas de *F.nucleatum*.

Aos professores do Curso de Mestrado pela dedicação e divulgação do saber e do conhecimento científico.

Ao Ediel pela sua amizade, seu bom humor; sempre pronto no bom andamento do laboratório.

À Tatiana A.C.B. de Souza pela colaboração amiga e incansável.

Aos colegas e amigos de laboratório nos meus primeiros passos, Giselle Baccan e Tânia Felizardo e ao Claudio Ueno pelas dicas e acompanhamento dos experimentos.

A profª Sueli Obara pela sua dedicação no repasse dos conhecimentos em bioquímica.

Aos colegas do curso de mestrado: Cintia, Dorismey, Eliane, Elisa, Fernanda, Fernando, Graciela, Lígia, Luiz, Maria Cecília, Mariana, Newton, Odair e Rafael, pela união e amizade para trilharmos juntos com harmonia durante todo o curso.

Aos colegas de laboratório: Adriana, Rafael, Viviane, Daniela, Custódio, Érica, Eliane, Letícia, Eloisa, Beto, Gisele, Rita, Fernando, Luciana pela convivência, carinho e amizade.

Às colegas do Laboratório de Biologia Molecular, Renata, Flora, Iliana pela convivência e amizade.

Aos colegas docentes do Curso de Especialização em Endodontia da Associação Odontológica do Norte do Paraná (AONP), José Jorge da Rosa Neto, Floriano Guilhén e Mauro Boer pelo apoio e amizade.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia Microbiana do Departamento de Microbiologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Shiduca Itow Jankevicius.

OGAWA, Alice Tayoko. **Caracterização das atividades proteolíticas da bactéria anaeróbica *Fusobacterium nucleatum***. Londrina, 2004. 60f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2004.

## RESUMO

Foram determinadas as atividades proteolíticas do bacilo anaeróbio *Fusobacterium nucleatum*, presente em várias infecções oral e sistêmica humana. As reações foram otimizadas quanto a pH, temperatura, tempo de reação, volume da fonte de enzima e concentração de substrato. Foram utilizados os substratos sintéticos  $\alpha$ -naftilamida (Cys-Na, Ser-Na, Leu-Na, Glu-Na, Lys-Na e BANA), o carboxi-L-tirosina p-nitrofeniléster (CTN) e o substrato natural azoalbumina. Reação do sobrenadante ocorreu apenas com o substrato Glu-Na. Nas células vivas, as reações ocorreram com Cys-Na, Ser-Na e Glu-Na; e com as células lisadas, com os substratos Glu-Na, Leu-Na e CTN. O pH ótimo variou de 6,0 a 7,5 em todas as reações, com exceção para o CTN (pH 13). A temperatura ótima oscilou entre 30 e 40°C. O tempo ótimo de reação foi 60 minutos, exceto para as células vivas com o Glu-Na (40 min), células lisadas (20 min) e o substrato CTN (80 min). Não houve atividade com a azoalbumina. A atividade enzimática foi avaliada por vários inibidores de protease, sendo detectada a presença de metalo, serina, cisteína e aspartato proteases.

**Palavras-chave:** *Fusobacterium nucleatum*. Enzimas proteolíticas. Inibidores de proteases.

OGAWA, Alice Tayoko. **Characterization of proteolytic activities of anaerobic bacteria *Fusobacterium nucleatum***. Londrina, 2004. 60f. Dissertation (Master of Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2004.

### **ABSTRACT**

The proteolytic activities of the anaerobe bacillus *Fusobacterium nucleatum* present in several oral and systemic human infections were determined. The reactions were optimized in their pH, temperature, reaction time, enzyme source and substrate volume. The synthetic substrates  $\alpha$ -naphthylamides (Cys-Na, Ser-Na, Leu-Na, Glu-Na, Lys-Na and BANA), carboxi-L-tyrosine p-nitrophenylester (CTN), and natural substrate azoalbumin were used. With supernatants reaction occurred only with Glu-Na. In the living cells, reacted with Cys-Na, Ser-Na and Glu-Na; and lysate cells with Glu-Na, Leu-Na and CTN. Optimal pH ranged from 6.0 to 7.5 in all the reaction, except for CTN (pH 13). Optimal temperature oscillated between 30 and 40°C. The optimal reaction time was 60 minutes, except for Glu-Na with living cells (40 min), lysate cells (20 min), and CTN substrate (80 min). There was no activity with azoalbumin. The enzyme activity by several protease inhibitors was assessed and the presence of metallo, serine, cysteine and aspartato protease was detected.

**Keywords:** *Fusobacterium nucleatum*. Proteolytic enzymes. Protease inhibitors.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>BANA</b>	N-Benzoil DL-arginina $\square$ - naftilamida
<b>BAPPN</b>	Bactéria anaeróbia portadora de pigmento negro
<b>BSA Soro</b>	albumina bovina
<b>CFU</b>	Unidade formadora de colônia
<b>CIM</b>	Concentração inibitória mínima
<b>CTN N</b>	Carbobenzoxi L-tirosina p-nitro fenilester
<b>Cys-Na</b>	L-cisteina- $\square$ -naftilamida
<b>Da</b>	Dalton
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetracético
<b>EGTA</b>	Ácido etileno bis-tetracético
<b>Glu-Na</b>	L-glutamil- $\square$ -naftilamida
<b>Ig A,D,E,G,M</b>	Imunoglobulinas A,D,E,G,M
<b>IL</b>	Interleucina
<b>Kb</b>	Kilobares
<b>Km</b>	Constante de Michaelis-Mentem
<b>Leu-Na</b>	L-leucina $\square$ -naftilamida
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>Lys-Na</b>	L-lisina- $\square$ -naftilamida
<b>mM</b>	Milimolar
<b>NaC</b>	Cloreto de sódio
<b>NCCLS</b>	National Committe for Clinical Laboratory Standards
<b>PCA</b>	Ácido perclórico
<b>PCR</b>	Reação em cadeia de polimerase
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PMC</b>	Paramonoclorofenol
<b>PMN</b>	Neutrófilos polimorfonucleares
<b>PMSF</b>	Fluoreto de fenil metilsulfônico
<b>PVP</b>	Polivinilpirrolidona
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>Ser-Na</b>	L-serina- $\square$ -naftilamida
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>TLCK</b>	N-tosil-lisina clorometilacetona
<b>TPCK</b>	N-tosil-fenilalanina clorometilacetona
<b>Tris</b>	Tris (Hidroximetil) aminometano
<b>TSB-PRAS</b>	Trypticase Soy Broth pré-reduzido

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
1.1 FUSOBACTERIUM NUCLEATUM.....	12
1.2 F. NUCLEATUM NO PERIODONO.....	14
1.3 F. NNUCLEATUM NO ENDODONTO E PERIÁPICE.....	15
1.4 ANTIMICROBIANOS PARA F. NUCLEATUM .....	18
1.5 VIRULÊNCIA DO F. NNUCLEATUM .....	20
1.5.1 Adesão .....	20
1.5.2 Coagregação .....	21
1.5.3 Enzimas como fator de virulência .....	23
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	30
2.1 OBJETIVO GERAL.....	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	31
3.1 CULTURA DE FUSOBACTERIUM NNUCLEATUM .....	31
3.2 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS E SOBRENADANTES DA CULTURA.....	31
3.3 ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	31
3.4 OTIMIZAÇÃO DAS REAÇÕES.....	32
3.5 DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS.....	34
3.6 AÇÃO DE INIBIDORES SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....	34
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	36
<b>APÊNDICE</b> .....	45
Artigo: Characterization Proteolytic Activities of Anaerobic Bacterium Fusobacterium .....	46

## 1 INTRODUÇÃO

A cavidade bucal representa um dos *habitat* microbianos mais complexos e heterogêneos do corpo humano. Mais de 300 espécies bacterianas são reconhecidas como componentes de sua microbiota. Nos últimos anos, novas espécies têm sido descritas, embora muitas ainda permaneçam sem classificação (SUNDQVIST, 1992).

A natureza da microbiota bucal é influenciada pelo surgimento dos dentes. As bactérias encontradas na boca durante os primeiros meses de vida, quando os dentes estão ausentes, são predominantemente anaeróbios facultativos, tais como estreptococos e lactobacilos. Uma variedade de outras bactérias, incluindo alguns aeróbios, pode estar presente. Com o aparecimento dos dentes, altera-se a microbiota bucal, predominando os anaeróbios e várias bactérias especialmente adaptadas para crescerem sobre superfícies e fissuras dos dentes formados (NISENGARD: NEWMAN, 1997).

A densa massa bacteriana que se forma sobre a superfície dentária é denominada placa dental. Alguns autores utilizam os termos placa dentária e biofilme dentário com a mesma finalidade. Essa estrutura é composta principalmente por bactérias que se apresentam densamente dispostas numa matéria amorfa, denominada matriz. Nessa matriz intermicrobiana ocorre à predominância de polímeros extracelulares, sintetizadas pelas bactérias. A placa dental pode ser arbitrariamente classificada como supragengival, quando se apresenta depositada sobre as coroas dentárias, e subgengival, quando se localiza no sulco gengival ou na bolsa periodontal. As características ambientais do sulco gengival apresentam diferenças na composição bacteriana comparada com a da placa supragengival. A maior disponibilidade de nutrientes do exsudato gengival e a ação protetora da estrutura periodontal aos agentes mecânicos e químicos permitem a colonização de bactérias que não possuem mecanismos específicos de aderência. Na microbiota do sulco gengival sadio são predominantes bactérias Gram-positivas (85%), principalmente espécies de *Streptococcus* e *Actinomyces*. No entanto, com o desenvolvimento de gengivite, verifica-se o acentuado aumento de microrganismos Gram-negativos (45%), representados principalmente por *Fusobacterium nucleatum*, espécies de *Bacteroides* e *Prevotella intermedia*. Já, no quadro de periodontite avançada, destacam-se os bacilos Gram-negativos e microrganismos espiralados anaeróbios (cerca de 75%), incluindo *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteróides forsythus*, *F. nucleatum* e *Treponema denticola* (UZEDA, 2002).

Das 300 espécies de bactérias identificadas em placas dentais, apenas alguns organismos específicos têm sido relacionados como agentes etiológicos primários das periodontites. *F. nucleatum* está incluído nesse grupo juntamente com *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *Eikenella corrodens*, *T. denticola* e *Campylobacter rectus* (MELVIN et al, 1994). Essas bactérias são responsáveis pela gengivite e periodontites crônica, agressiva e necrosante

A presença de associações bacterianas nas periodontites fez com que Socransky (1998), através da técnica de hibridização DNA-DNA, empregando sondas genômicas, realizassem uma ampla pesquisa sobre os complexos de espécies bacterianas existentes no sulco gengival. A metodologia permitiu a análise da presença de 40 espécies bacterianas em amostras de placa subgengival, coletadas de 160 indivíduos adultos com periodontite e 25 sem sinais clínicos de doença periodontal. As diferentes associações bacterianas foram divididas em cinco complexos. O complexo denominado vermelho apresenta três espécies bacterianas (*B. forsythus*, *P. gingivalis* e *T. denticola*) e está fortemente associado com bolsas periodontais profundas e sangramento à sondagem. Na categoria do complexo laranja, determinaram as associações de *F. nucleatum* com as bactérias *P. intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Peptostreptococcus micros*, relacionando suas presenças com bolsas profundas, e sugeriram que esse grupo parece preceder a colonização do complexo vermelho. O terceiro grupo, denominado complexo amarelo, contém cinco espécies de *Streptococcus*. O quarto grupo, o complexo verde, apresenta associações de três espécies de *Capnocytophaga*, *Campylobacter concisus*, *E. corrodens* e *A. actinomycetemcomitans* e, finalmente, o complexo roxo, *Veillonella parvula* e *Actinomyces naeslundii*.

## 1.1 FUSOBACTERIUM NUCLEATUM

*Fusobacterium nucleatum* é uma bactéria anaeróbia estrita, Gram-negativa, imóvel, não esporulante e uma das mais comuns nas infecção humana e animal. Segundo Bolstad (1996), é um patógeno encontrado na cavidade bucal principalmente nas periodontites laterais e apicais e polpas necrosadas, podendo provocar também abscesso peritonsilar, piomiosite, artrite séptica, abscesso hepático, úlceras dérmicas, infecções intrauterina, do trato urinário, do pulmão e pleuropulmonar, pericardite e endocardite. Seu estudo ganhou

importância devido à sua capacidade de sinergismo com outros gêneros e espécies nas infecções mistas.

Até 1984, havia 10 espécies pertencentes ao gênero *Fusobacterium*, listadas no Manual Bergey de Bacteriologia Sistemática, sendo estas: *F. necrogenes*, *F. gonidiaformans*, *F. varium*, *F. mortiferum*, *F. russii*, *F. naviforme*, *F. perfoetans*, *F. prausnitzii*, *F. necrophorum* e *F. nucleatum*. Após 1984, foram incluídas cinco espécies: *F. simiae*, *F. periodonticum*, *F. alocis*, *F. sulci* e *F. ulcerans*; cinco subespécies: *F. nucleatum*, subsp. *nucleatum*, *vincentii*, *polymorphum*, *animalis* e *fusiforme*, sendo ainda a espécie *F. necrophorum* dividida em *F. pseudonecrophorum* e *F. necrophorum* subsp. *necrophorum* e subsp. *funduliforme*. Dentre as fusobactérias, somente a espécie *F. nucleatum* realmente se apresenta na forma fusiforme, ou seja, bacilos com as extremidades afiladas, quando na coloração de Gram (MORAES, 2001).

*F. nucleatum* requer um meio de cultura rico para seu crescimento, e geralmente cresce bem em meio contendo tripticaseína, peptona e extrato de levedura. É uma das poucas espécies anaeróbias não esporulante que utiliza aminoácidos para catabolizar suas fontes de energia. Segundo Dzink e Socransky (1990), bactérias do gênero *Fusobacterium* são dependentes de aminoácidos e geralmente utilizam para seu metabolismo lisina, metionina, treonina e serina. Wyss (1993) concluiu que, para o crescimento de *F. nucleatum*, a fenilalanina é essencial, porém o aspartato não, e o adoçante aspartame pode ser usado como fonte de fenilalanina. Segundo Buckel e Barker (1974), são a única bactéria Gram-negativa capaz de fermentar o glutamato via 2-hidroxi-glutarato. Essa bactéria não utiliza a glucose como fonte de energia, mas sim na biossíntese das moléculas intracelulares (SHAH; GHARBIA, 1989a).

Segundo Bolstad (1996), o principal produto do metabolismo da peptona ou de carboidratos por *Fusobacterium* é o butirato, freqüentemente com acetato e lactato e em menor quantidade propionato, succinato, formato e álcoois de cadeias curtas. *F. nucleatum* produz propionato a partir da treonina e não do lactato; não hidroliza a esculina, produz indol; butirato, propionato e íons de amônio que inibem a proliferação dos fibroblastos da gengiva humana, auxiliando assim a penetração da bactéria no epitélio gengival (BARTOLD et al. 1991).

A distribuição ecológica de *F. nucleatum* pode residir nas diferenças nutricionais nos sítios em que esses organismos colonizam. Períodos de atividade patológica coincidem com a liberação de aminoácidos e peptídeos os quais constituem os primeiros

substratos para seu crescimento, e se originam da atividade hidrolítica tanto do hospedeiro como da bactéria (SEDDON; SHAH, 1989; SHAH; GHARBIA, 1989 b).

## 1.2 F. NUCLEATUM NO PERIODONTO

A frequência de *F. nucleatum* na cavidade bucal varia de uma pesquisa para outra. O local da coleta e/ou a metodologia utilizada podem influenciar no resultado final. No estudo de Souto (2000), em 4.032 amostras, coletadas de sulcos gengivais (em seis sítios de cada dente) de 25 pacientes com e sem doenças periodontais, com o mínimo de 20 dentes presentes, *F. nucleatum* foi prevalente juntamente com outras bactérias, como *P. gingivalis*, *B. forsythus*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola*, assim como espécies não comuns a microbiota bucal (*A. baumannii*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bartonella* sp).

Söler (1993), utilizando sonda de DNA em amostras coletadas de bolsas periodontais de 20 pacientes adultos, com periodontite severa, detectou *F. nucleatum*, *T. denticola* e *Eikenella corrodens* em todas as amostras.

Kamma (1994), em um estudo com 73 amostras, coletadas de sulcos gengivais de 10 pacientes adultos, com periodontite, variando de moderada a severa, verificaram que, cultivadas em anaerobiose durante cinco dias, as bactérias de maior frequência foram *P. gingivalis* (91,7%), *F. nucleatum* (90,4%), *Streptococcus intermedia* (87,7%) e *B. forsythus* (53,4%).

A presença frequente de *F. nucleatum*, nas lesões do periodonto, fez com que Suchett-Kaye (1999) selecionassem quatro famílias, sem placa dental e com gengivas saudáveis sem bolsas periodontais, para um estudo. Observaram a alta ocorrência de *F. nucleatum*, com exceção na criança de 10 meses. Este estudo detectou a colonização precoce da bactéria na cavidade bucal, sugerindo que é uma bactéria residente e, quando ocorre uma doença na gengiva, é uma das primeiras a se instalar.

A presença de *F. nucleatum*, em pessoas com gengivas saudáveis, foi também observada por Ávila Campos (2003), por meio de reação em cadeia de polimerase (PCR), nas placas subgengivais de 50 pacientes (entre 18 a 65 anos de idade), com problemas periodontais, e 50 pacientes (de 18 a 51 anos) com gengivas saudáveis, uma porcentagem de 96 e

92%, respectivamente, não havendo, portanto, diferenças significativas. Nenhum dos pacientes fazia uso de antimicrobianos, pelo menos três meses antes das coletas das amostras.

Ao analisar culturas de amostras coletadas de cuspeiras e seringas de água, após 40 minutos do último paciente atendido, dos equipamentos odontológicos da Clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, Gaetti Jardim Junior e Ávila Campos (1997) constataram a presença do *F. nucleatum* em 60% e 3,3%, respectivamente. Os autores comprovaram a capacidade dessas bactérias anaeróbias em se manterem viáveis extra oralmente e em ambientes externos.

As mesmas bactérias encontradas nas periodontites também se fazem presentes nas pericoronarites, que é uma condição inflamatória bastante dolorosa. Acomete os tecidos moles que revestem a coroa de dentes parcialmente erupcionados, em especial os terceiros molares inferiores. A literatura aponta para a participação de microrganismos residentes na cavidade bucal na sua etiologia, em especial os anaeróbios obrigatórios, Gaetti Jardim Junior e Pedrini (1997) analisaram 15 pacientes portadores de pericoronarite e 15 indivíduos saudáveis, de ambos os gêneros na faixa etária de 17 a 25 anos. As amostras foram plaqueadas em ágar sangue com hemina e menadiona, meios seletivos Omata e Disraeli e TSBV e incubadas em anaerobiose a 37°C, por três, quatro e dez dias, respectivamente. Nos pacientes com pericoronarite foi detectada a presença das seguintes bactérias e sua frequência: bactérias de pigmentos negros (BAPPN) em 100%, *F. nucleatum* 100%, *Peptostreptococcus* spp. 73,3% e *A. actinomycetemcomitans* em 20%. Nos indivíduos saudáveis, BAPPN estava presente em 66,6%, *F. nucleatum* em 73,3% e *Peptostreptococcus* spp. em 53,3% das amostras.

### **1.3 F. NNUCLEATUM NO ENDODONTO E PERIÁPICE**

Todas as bactérias que normalmente habitam a cavidade bucal têm teoricamente, a capacidade de invadir o espaço do canal radicular dentário, durante e após a necrose pulpar, para participar na infecção do canal e invadir os tecidos periapicais. Entretanto, as bactérias presentes no canal radicular infectado, comparado com a microbiota da cavidade bucal, são bastante restritas, e isto está relacionado às pressões seletivas resultando na sobrevivência de certas bactérias e não de outras (SUNDQVIST, 1994). Em um estudo em 1992 com cultivo de polpas necrosadas de 65 dentes humanos que apresentavam

radiograficamente radioluscência periapical, Sundqvist obteve um total de 353 cepas bacterianas, com uma média de 5,4 cepas por canal e o isolado mais freqüente foi *F. nucleatum* com 48% de presença. Nesse estudo, o autor observou uma associação positiva de *F. nucleatum* com *Peptostreptococcus micros*, *Porphyromonas endodontalis*, *Selenomonas sputigena* e *Wolinella* sp.

Rocha (1998) analisaram culturas de amostras coletadas de lesões perirradiculares de dentes humanos extraídos de 30 pacientes. Desses pacientes, 14 (46,7%) procuraram o serviço de cirurgia, queixando-se de dor, enquanto 16 (53,3%) pacientes não relataram dor. Nenhum dos pacientes fazia uso de antimicrobianos, no dia da consulta nem nos últimos 30 dias antes da coleta. Foram isoladas 137 cepas bacterianas que, em ordem decrescente de freqüência de isolamento de lesões periapicais, foram: *F. nucleatum*, bacilos Gram-negativos pigmentados anaeróbios estritos, *Peptostreptococcus* sp, *Streptococcus mitis* e bacilos Gram-positivos não esporulados anaeróbios estritos. *F. nucleatum* foi encontrado em 28 dos 30 casos estudados com uma freqüência de 93,3%. De 14 casos de lesão periapical cujos pacientes relataram sentir dor, em 12 havia a presença do *F. nucleatum* e bacilos Gram-negativos pigmentados.

Brauner e Conrads (1995) obtiveram resultados diferentes, quando analisaram 43 dentes humanos dos quais cultivaram amostras de 19 polpas que apresentaram sintomas de pulpíte e 24 granulomas periapicais de dentes extraídos. Em apenas um caso de cada grupo *F. nucleatum* estava presente, representando 5,3 e 4,2%, respectivamente, das bactérias encontradas.

No estudo de Iwu (1990) com cultura de amostras de granulomas periapicais (confirmação histopatológica), coletadas durante curetagem periapical, apicectomia e obturações retrógradas de 16 pacientes, a presença do *F. nucleatum* ocorreu apenas em uma amostra.

Wayman (1992) analisaram 58 lesões perirradiculares, através de cortes microscópicos e cultivos. Na análise histopatológica, os autores diagnosticaram 41 granulomas, 16 cistos e um abscesso. Obtiveram 51 culturas positivas, porém observaram a presença de bactérias no estudo histopatológico em apenas oito casos. Nas culturas, obtiveram cinco isolados mais comuns em ordem decrescente, *Staphylococcus epidermidis*, *F. nucleatum*, *Propionibacterium acnes*, *P. micros* e *Bacteroides gracilis*. Dentre os anaeróbios, *F. nucleatum* foi observado em 15% dos isolados.

Külekiçi (1996) estudaram amostras de pus coletadas de 13 pacientes com abscesso dentoalveolar que tinham recebido terapia antibiótica prévia, e as amostras foram

cultivadas em anaerobiose. De 70 isolados, 38 (40%) eram microrganismos facultativos e 42 (60%) eram anaeróbios. *F. nucleatum* esteve presente em 7,1% de todas as amostras.

Gomes (1996) analisaram 70 dentes de pacientes (de 12 a 77 anos) com sintomas e sinais distintos, como polpa viva e necrosada, canais previamente obturados, com abscesso perirradicular, fístula e, na radiografia, apresentando alteração na região do ápice dentário. As amostras coletadas foram cultivadas em anaerobiose por 14 dias para permitir o crescimento de cepas de crescimento lento. Isolaram 242 cepas com 65 bactérias de espécies diferentes. Os anaeróbios, mais comumente encontrados, foram *P. micros* (14,2%), *Prevotella melaninogenica* (6,4%), *Prevotella oralis* (5,2%), *Eubacterium aerofaciens* (4,5%), *F. nucleatum* (3,9%), *Prevotella buccae* (3,2%) e *P. intermedia* (2,6%).

O estudo de Assed (1996) com 25 polpas necrosadas de dentes incisivos centrais e laterais superiores com periodontite apical crônica, utilizando o método da imunofluorescência indireta, detectou a presença do *F. nucleatum* em 10 dentes (40%).

No estudo de Siqueira Junior (2001), através do método de hibridização “Checkerboard DNA-DNA” com 27 amostras coletadas de abscessos perirradiculares dentários de pacientes adultos, no setor de emergência de três hospitais do Rio de Janeiro, cujos dentes eram acompanhados de dor e tumefação, a presença do *F. nucleatum* foi 18,5%. Utilizando esse mesmo método Moraes (2001) analisou 13 polpas necrosadas de dentes monorradiculares com evidência radiográfica de perda óssea perirradicular e encontrou *F. nucleatum* em quatro (31%) dos 13 espécimes. Nesse estudo, o autor comparou outras metodologias para detecção de *F. nucleatum*, que foram: técnica de PCR e culturas das amostras. Detectou 15,4% e 10% respectivamente. Utilizando técnicas diferentes com as mesmas amostras, o autor obteve resultados diferentes entre si e observou maior sensibilidade de detecção no primeiro método.

Em 2002, Roças utilizou o método do PCR com primers de 16s rDNA em material coletado de 22 dentes com polpas necrosadas e lesões perirradiculares assintomáticos e 19 com lesões sintomáticas. A bactéria mais encontrada foi o *T. denticola*, com 77,3% e 80%, respectivamente. *F. nucleatum* não foi detectado.

Debelian e Tronstad (1995) estudaram a probabilidade das bactérias presentes nos canais radiculares se espalharem sistemicamente durante e após as instrumentações endodônticas. Analisaram amostras sanguíneas de 26 pacientes, apresentando dentes com polpas necrosadas e com periodontites apicais. Das bactérias encontradas no interior do canal, *F. nucleatum* foi o mais freqüente com 53,8% (14 dentes). Nas amostras sanguíneas, coletadas durante o tratamento do canal, isolaram apenas em um caso

*Fusobacterium* no sangue e 10 minutos após o encerramento do tratamento endodôntico, não observaram mais sua presença.

#### **1.4 ANTIMICROBIANOS PARA *F. NUCLEATUM***

A preocupação em eliminar *F. nucleatum*, nas doenças produzidas por esta bactéria, tem levado vários pesquisadores à procura de um medicamento eficiente no seu combate. No estudo de sensibilidade do *F. nucleatum* a antimicrobianos realizado por ROCHA et al. (1998), com 16 amostras isoladas de lesões periapicais, pelo método de diluição em agar, recomendado pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS (1993), utilizando-se o meio de cultura Wilkins-Chalgren ágar e os antimicrobianos: penicilina G, eritromicina, tetraciclina, metronidazol e cefoxitina, verificaram que houve resistência à eritromicina em 68,8% das amostras e 12,5% a penicilina. Para a cefoxitina, tetraciclina e metronidazol, a concentração inibitória mínima em 90% das amostras tiveram valores abaixo da concentração crítica.

O uso do metronidazol no combate a *F. nucleatum* foi bem sucedido por Siqueira Junior (1995), em um caso clínico de infecção persistente de abscesso perirradicular com fístula ativa.

No estudo de Landucci (2003), utilizando 21 isolados de *F. nucleatum* de polpas necrosadas e antimicrobianos (clorexidina, amoxicilina e metronidazol) pela metodologia da concentração inibitória mínima, a clorexidina (84,21%) e o metronidazol (78,95%) foram os que apresentaram maior suscetibilidade.

A eliminação de *F. nucleatum* e outras bactérias do interior dos canais endodônticos também tem sido a preocupação de muitos pesquisadores. Estudo *in vitro*, realizado por Ferreira (2002) utilizando bactérias anaeróbias, (*F.nucleatum*, *Prevotella nigrescens*, *Clostridium perfringens* e *Bacteroides fragilis*) através da técnica de diluição em caldo com diferentes soluções irrigadoras e medicamentos utilizados no interior dos canais como: digluconato de clorexidina 2%, detergente de mamona 10%, p-monoclorofenol canforado e hidróxido de cálcio 10%, observaram que todos apresentaram atividade contra as bactérias analisadas, sendo o digluconato de clorexidina aquele que demonstrou melhor eficiência.

Sassone (2003) estudaram *in vitro* a atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio (1% e 5%) e clorexidina (0,12% e 1%) utilizando as amostras bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *P. gingivalis* e *F. nucleatum* por meio do teste de contato. As soluções foram avaliadas em intervalos de tempos diferentes: imediatamente, 5, 15 e 30 minutos após o contato e repetido 10 vezes. O resultado demonstrou que a clorexidina a 0,12% não eliminou *E. faecalis* em todos os intervalos, enquanto que na concentração de 0,5% e 1% de clorexidina e hipoclorito de sódio a 1% e 5% tiveram ação antimicrobiana.

Siqueira Junior (1995) avaliaram a atividade antibacteriana de medicamentos, usualmente utilizados como medicação intracanal nos tratamentos endodônticos, como o paramonoclorofenol (PMC) canforado, PMC associado ao furacin e, PMC aquoso a 2% e também, pastas de hidróxido de cálcio em água destilada ou PMC aquoso a 2% sobre bactérias anaeróbias (*Porphyromonas endodontalis*, *P.gingivalis*, *F. nucleatum*, *Propionibacterium acnes* e *B. fragilis*). O método utilizado foi o teste de difusão em ágar com as medidas dos halos de inibição do crescimento bacteriano. O PMC canforado, o PMC associado ao furacin e a pasta de hidróxido de cálcio associada ao PMC apresentaram os maiores halos de inibição de crescimento bacteriano, principalmente frente às bactérias *P. endodontalis*, *P. gingivalis* e *F. nucleatum*, em uma média aproximada de 25 mm de diâmetro. O PMC a 2% apresentou baixa atividade antibacteriana, evidenciada pelos pequenos halos de inibição observados com exceção de *F. nucleatum* que apresentou maior sensibilidade (13 mm) em relação ao próximo com halo de 3 mm. Nenhuma atividade antibacteriana foi observada para a pasta de hidróxido de cálcio em água destilada.

No tratamento das periodontites, uma boa higiene associada com a remoção mecânica das placas supra e subgingivais ainda são os métodos mais eficazes no combate aos microrganismos. Para o controle da placa, a utilização de anti-sépticos tem sido recomendada como coadjuvante dos meios mecânicos. Anti-sépticos como PVP-iodine (ROSLING et al., 2001); gluconato de clorexidina na forma de gel (VINHOLIS et al., 2001), de “chip” (GRISI et al., 2002) ou solução para bochecho (SEGRETO et al., 1986); triclosan na pasta de dente (BRUHN et al., 2002), e antimicrobianos como a amoxicilina e metronidazol (BUCHMANN et al., 2002) apresentaram-se bastante eficientes. Roldán (2003) associaram três anti-sépticos (clorexidina, cloreto de cetilperidínio e lactato de zinco) para reduzir a halitose, provocada por bactérias anaeróbias (*F. nucleatum*, *P. intermedia* e *P. gingivalis*) em pacientes sem periodontites, e obtiveram bons resultados desse enxaguatório bucal na redução significativa dos microrganismos e conseqüente eliminação do mau odor.

Medicamentos alternativos como própolis, utilizada como agente antimicrobiano no combate às bactérias periodontopatogênicas *in vitro*, foi estudada por Gebara (2002) através de concentrações seriadas pelo método de CIM. Verificaram que a suscetibilidade do *F. nucleatum* à própolis foi com uma concentração menor, com apenas 0,25 µg/mL, contra 14 µg/mL para as bactérias *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *E. coli*.

## 1.5 Virulência do *F. Nucleatum*

### 1.5.1 Adesão

As bactérias aderem aos tecidos do hospedeiro por uma interação específica mediada por macromoléculas de sua superfície e que possibilitam sua união às estruturas da superfície das células do hospedeiro. A adesão bacteriana é essencial na colonização e fixação durante o processo infeccioso em um hospedeiro suscetível, sendo, portanto importante fator de virulência dos microrganismos (HOLT; BRAMANTI, 1991).

As adesinas são proteínas localizadas na superfície da bactéria que mediam sua adesão ao substrato específico como primeiro passo na colonização. As adesinas de *F. nucleatum* podem ser detectadas pela hemaglutinação de ovinos e humanos (FALKLER JUNIOR; HAWLEY, 1977); aderidas às células epiteliais da cavidade bucal, aos fibroblastos gengivais e neutrófilos polimorfonucleares (FALKLER JUNIOR et al., 1982); e ao colágeno (XIE et al., 1991) e têm atividade hemolítica (FALKLER JUNIOR et al., 1983).

A adesão de *F. nucleatum* em isolados de pacientes com periodontite, em cultura de tecido epitelial *in vitro*, foi analisada por Babu (1995). Quando esse tecido epitelial foi recoberto por fibronectina plasmática purificada, apresentou adesão bem como quando recoberto por saliva humana, porém a adesão ficou prejudicada quando foi retirada a fibronectina da saliva. Foi analisada a adesão a superfície de vidro, recoberta com fibronectina e outra com saliva. A adesão ocorreu em ambas superfícies sempre que a fibronectina estava presente e teve influência da temperatura, obtendo melhor resultado a 37°C.

Em um estudo com cultura de células epiteliais de gengiva humana e células KB, *F. nucleatum* apresentou capacidade de aderir e invadir os dois tecidos e estimulou a produção da interleucina-8 pelo tecido epitelial (HAN et al., 2000).

Em *F. nucleatum* foi demonstrada a presença de mecanismos de evasão ao sistema de defesa do hospedeiro, por sua capacidade de aderir e provocar a apoptose das células mono e polimorfonucleares sanguíneas *in vitro* (JEWETT et al., 2000).

Pode ocorrer também a adesão do plasminogênio presente no soro humano sobre a superfície externa do *F. nucleatum*. Na pesquisa de Darenfed (1999), a bactéria demonstrou propriedade de transformar em plasmina esse plasminogênio, que é uma proteína com capacidade de degradar tecidos e a bactéria utiliza esse artifício para aumentar a capacidade de invasão ao órgão onde está instalada.

### 1.5.2 Coagregação

Quando a bactéria adere à outra bactéria, o fenômeno é chamado de coagregação, e esta interação é definida como o reconhecimento entre superfícies moleculares de dois tipos de bactérias diferentes (KOLENBRANDER, 1988). Coagregação é, portanto, uma interação direta bactéria/bactéria altamente específica, em que apenas alguns tipos de células são capazes de se associar. O reconhecimento pode ser intragenérico (do mesmo gênero), intergenérico (gêneros diferentes) ou multigenérico (com três ou mais gêneros).

*F. nucleatum* participa tanto na adesão ao hospedeiro como na coagregação às outras bactérias e desempenha um papel importante na rede de coagregação multigenérica nas bolsas periodontais (KOLENBRANDER: LONDON, 1993), não ocorrendo coagregação entre espécies deste gênero (KOLENBRANDER et al., 1989). Estes autores descreveram ainda a capacidade de *F. nucleatum* em coagregar com várias espécies de *Selenomonas*, e que o quelante ácido etileno diamino tetracético (EDTA) inibiu a coagregação de *Fusobacterium* com outros Gram-negativos estudados.

Kinder e Holt (1989), num estudo *in vitro* com bactérias selecionadas (*Bacteroides gingivalis*, *F. nucleatum*, *Canocytophaga* spp, *Bacteróides intermedius*, *Wolinella recta*, *Actinomyces viscosus*) verificaram que a coagregação de *B. gingivalis* com *F. nucleatum* foi a mais forte e evidente. *F. nucleatum* também interagiu seletivamente com outras espécies subgingivais coagregando com *A. viscosus* e *Actinomyces* spp. Nesse estudo, os autores verificaram que na coagregação de *B. gingivalis* com *F. nucleatum*, o pH do meio (5-10) não interferiu significativamente e na temperatura de 37°C foi atingido o máximo. A adição de fibronectina e fibrinogênio numa concentração inferior a 300µg/mL não aumentou a

porcentagem da coagregação. Incorporação de asialfetuina resultou em 35% de inibição e EDTA e EGTA a 5mM resultou em 100 e 80% em inibição, respectivamente. O pré tratamento das bactérias (*F.nucleatum* e *B. gingivalis*) com enzimas pronase (protease XIV de *Streptomyces griseus*), tripsina, proteínase, papaína,  $\alpha$ -amilase e metaperiodato de sódio, para verificar o efeito das enzimas sobre as proteínas ou carboidratos das superfícies bacterianas, resultou na inibição da coagregação em presença de pronase, metaperiodate de sódio e  $\alpha$ -amilase.

No estudo de Andersen (1998) com *Helicobacter pylori*, utilizando 79 cepas bacterianas representando 16 gêneros, isoladas na sua maioria da cavidade bucal, *H. pylori* não apresentou coagregação com qualquer das cepas, exceto com o gênero *Fusobacterium*, ocorrendo forte coagregação com quatro subespécies de *F. nucleatum* e *F. periodonticum*, todos originários da placa dental humana. *F. nucleatum* também coagrega com *Streptococcus salivarius* (LÉVESQUE et al., 2003).

A virulência de *F. nucleatum* foi testada em camundongos machos (Balb/c) por Gaetti e Jardim Junior (2000), com inoculação intraperitoneal de  $5 \times 10^8$  CFU/mL da bactéria. Foram constatadas alterações patológicas no fígado, sistema nervoso central, coração e rim com reação inflamatória e congestão vascular. Ocorreu morte em 61,2% dos animais após 48 horas quando eram utilizados isolados de pacientes com doenças periodontais, em 57,1% quando se tratava de pacientes saudáveis e 60% quando inoculado *F.nucleatum* isolado de macacos (*Cebus apella*). A utilização de bactérias inativadas das mesmas fontes, nesse experimento, também provocou a morte dos camundongos em 22,5%; 19,1% e 10,0%, respectivamente, sugerindo a ação dos lipopolissacarídeos (LPS) bacteriano na morte desses animais. A inoculação do sobrenadante, livre de células, não apresentou letalidade aos animais, porém provocou a perda de peso e dos movimentos.

Ebersole (1995) avaliaram a virulência de diversos microrganismos periodontopatogênicos e concluíram que têm habilidades distintas para promover patologias individuais, podendo agir em sinergismo ou antagonismo, e levando a diferentes formas de destruição dos tecidos. Nesse estudo, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* e *T. denticola* foram as espécies mais virulentas causando lesões associadas ao tecido conjuntivo, enquanto *A. actinomycetemcomitans* e *Campylobacter rectus* estavam associados a lesões no tecido epitelial.

O sinergismo de *F. nucleatum* com outra bactéria foi observado também, por Kuriyama et all (2000), onde a associação deste com *Streptococcus constellatus*,

inoculados em camundongos, provocou a morte dos animais, enquanto, inoculando-se as bactérias separadamente não ocorreu morte alguma.

Muitos fatores podem influenciar a relação parasita/hospedeiro nas infecções. Um deles é a suscetibilidade dos microrganismos ao soro humano que participa na resposta de defesa contra invasões microbianas. Gaetti, Jardim Junior, Ávila Campos (1999) utilizaram 80 cepas de *F. nucleatum* isolados de pacientes com alteração periodontal, sadios e macaco prego, sendo 49, 21 e 10 isolados; respectivamente, para testar suas suscetibilidades ao efeito antibacteriano do soro humano. Os isolados de pacientes sadios apresentaram maior suscetibilidade ao soro em 71,4% contra 53,1% e 60% dos pacientes com periodontites e macaco prego, respectivamente. Este estudo sugere a maior resistência das bactérias residentes em tecidos inflamados às defesas naturais do hospedeiro, porém, reforça a propriedade antibacteriana do soro.

### **1.5.3 Enzimas como fator de virulência**

A incapacidade das proteases de plantas e animais de suprir a demanda comercial mundial tem aumentado o interesse pelas proteases microbianas. Atualmente, é estimado que 40% das proteases comercializadas são de origem microbiana. Para a produção de enzimas de uso comercial, as microbianas têm sido preferentemente utilizadas devido à sua diversidade, ao rápido crescimento desses organismos, ao cultivo em espaços pequenos e pelo fato de poder manipular geneticamente para gerar novas enzimas com propriedades alteradas que serão utilizadas em várias aplicações (GODFREY; WEST, 1996).

A manutenção da vida celular depende da ocorrência contínua de um conjunto de reações químicas, que devem atender a duas exigências fundamentais: precisam ser altamente específicas, de modo a gerar produtos definidos, e deve ocorrer em velocidade adequada à fisiologia celular.

Como catalisadores, as enzimas aumentam em várias ordens de grandeza a velocidade das reações e, por serem altamente específicas, no metabolismo primário, selecionam, entre todas as reações potencialmente possíveis, aquelas que efetivamente deverão ocorrer. Geralmente há uma grande diferença de tamanho entre as moléculas de enzimas e as de seus substratos. As enzimas são macromoléculas proteicas e seus pesos moleculares variam de 10.000 a alguns milhões, enquanto o peso molecular dos substratos é

muitas ordens de grandeza inferior. Embora a molécula enzimática como um todo seja necessária para o papel catalítico, a ligação com o substrato dá-se apenas em uma região pequena e bem definida da enzima. Esta região à qual o substrato se liga é chamada *centro ativo* ou *sítio ativo* da enzima, sendo formado por resíduos de aminoácidos e constitui uma estrutura com forma definida, que permite à enzima “encaixar” no substrato. Como cada enzima possui uma organização estrutural específica, o seu centro ativo permite a ligação apenas do seu substrato, conferindo grande especificidade para a catálise. As enzimas proteolíticas são específicas para a hidrólise de proteínas, não atuando sobre carboidratos ou lipídios, para cujas hidrólises são necessárias enzimas próprias (MARZZOCO; TORRES, 1999).

A estrutura e a forma do centro ativo são uma decorrência da estrutura tridimensional da enzima e podem ser afetadas por quaisquer agentes capazes de provocar mudanças conformacionais na proteína. Isso torna a atividade enzimática dependente das características do meio, notadamente do pH e da temperatura. A maioria das enzimas apresenta um valor de pH para o qual a sua atividade é máxima – a velocidade da reação diminui à medida que o pH se afasta do valor ótimo, que é característico para cada enzima, mas com frequência está próximo do pH neutro. Como ocorre com a maioria das reações químicas, a velocidade da reação enzimática, que a 0°C apresenta valores próximos de zero, é favorecida pela elevação da temperatura. Acima de 50-55°C, a maioria das proteínas globulares – incluindo as enzimas – é desnaturada. As amplas variações de pH e temperatura são pertinentes ao estudo da atividade enzimática *in vitro*. Os seres vivos, entretanto, têm suas reações ocorrendo em ambiente tamponado, já que todas as células dispõem de mecanismos de manutenção do pH (MARZZOCO; TORRES, 1999).

O estudo das reações enzimáticas e de uma série de propriedades das enzimas baseia-se em medidas da *velocidade* da reação, que é diretamente proporcional à concentração do reagente. O estudo das velocidades de reação e como elas mudam em resposta a mudanças nos parâmetros experimentais é conhecida como *cinética*. Para estabelecer essa cinética, mede-se a velocidade inicial da reação e sua velocidade máxima as quais são diretamente proporcionais à concentração do substrato. A dosagem de enzimas é sempre feita através da medida de sua atividade que é avaliada pela velocidade da reação que a enzima catalisa. Para avaliar a eficiência das enzimas, utiliza-se a constante de Michaelis-Mentem ( $K_m$ ), cujo valor indica a afinidade que uma enzima apresenta pelo seu substrato. Quanto mais baixo é o valor do  $K_m$  maior a afinidade da enzima pelo substrato (MARZZOCO; TORRES, 1999).

As proteases são classificadas de acordo com três principais critérios: tipo de reação catalisada; natureza química do sítio catalítico e relação evolucionária com referência à sua estrutura. As proteases são subdivididas em dois principais grupos: exopeptidase e endopeptidase, dependendo dos seus sítios de ação. A exopeptidase cliva a ligação peptídica próxima ao terminal amino ou carboxi do substrato, sendo denominado de amino ou carboxipeptidase, respectivamente. A endopeptidase cliva a ligação peptídica na região central do substrato. Com base na presença do grupo funcional no sítio ativo, as proteases são também classificadas em serina, aspartato, cisteína e metalo-proteases (RAO et al 1998).

Entre as famílias das enzimas proteolíticas, a das serina-protease é a maior. São chamadas de serina aminoácidos quando o grupo hidroxil está envolvido na ligação e catálise do substrato no sítio ativo e são produzidas por várias bactérias, fungos, leveduras e outros microrganismos. Nas cisteína ou tiol proteases, cuja atividade depende da integridade do grupo SH no seu sítio ativo, o seu mecanismo de ação é semelhante ao da serina proteases. As metalo-proteases contêm um íon metálico divalente no sítio ativo e têm os mais diversos tipos de catálise. Incluem enzimas de origens variadas como as collagenases dos grandes organismos, toxinas hemorrágicas de venenos de cobras e termolisina das bactérias. Foram identificadas 30 famílias de metalo-proteases das quais 17 contêm apenas endoproteases, 12 contêm exopeptidases e uma contém ambas, endo e exo peptidases. A collagenase foi a primeira a ser descoberta em cultura da bactéria anaeróbia *Clostridium histolyticum*, como um dos fatores tóxicos da bactéria. A ação da collagenase é muito específica, isto é, atua apenas sobre colágeno e gelatina e em nenhum outro substrato proteico. O mecanismo de ação das metalo-proteases é ligeiramente diferente das demais. Essa enzima depende da presença da ligação do cátion divalente e pode ser inativada pela diálise ou pela adição de agentes quelantes. Aspartato-proteases, geralmente conhecidas como proteases ácidas, são endopeptidases que dependem do resíduo do ácido aspártico para sua atividade catalítica. São inibidas pela pepstatina (RAO et al. 1998).

As proteases executam grande variedade de funções fisiológicas complexas. Sua importância em conduzir funções metabólicas e regulatórias essenciais é evidente pela sua ocorrência em todas as formas de organismos vivos. As proteases têm um papel crítico em muitos processos fisiológicos e patológicos, tais como o catabolismo protéico, coagulação sanguínea, crescimento e migração celular, estruturação tissular, morfogênese no desenvolvimento, inflamação, crescimento e metástase tumoral, ativação dos zimogênios, liberação de hormônios e peptídeos farmacologicamente ativos, dos precursores de proteínas e

transporte das proteínas secretórias através das membranas. Algumas das principais atividades em que as proteases participam são: turnover protéico, esporulação e liberação conidial, germinação, modificação enzimática, nutrição e regulação dos genes de expressão. Em geral, as proteases extracelulares catalisam as hidrólises de grandes proteínas em pequenas moléculas para subsequente absorção pelas células, enquanto as proteases intracelulares têm um papel crítico na regulação do metabolismo (RAO et al., 1998).

A virulência das bactérias é decorrente de vários fatores. Além de estruturas específicas da sua superfície que a protege das defesas do hospedeiro, e capacidade de aderência e colonização no tecido infectado, as bactérias possuem um arsenal de enzimas hidrolíticas que podem ser utilizadas por diversos meios para catabolizarem macromoléculas, tanto para seu metabolismo como também para destruir barreiras encontradas no tecido do hospedeiro para sua fixação (RAO et al., 1998).

As bactérias Gram-positivas e Gram-negativas da microbiota do sulco gengival elaboram uma série de enzimas que podem hidrolisar substratos encontrados no epitélio e no tecido conjuntivo do periodonto. Assim, a presença de vários microrganismos com atividades proteolíticas no sulco gengival pode ser significativa, uma vez que vários peptídeos podem ser liberados, provocando aumento da permeabilidade capilar, migração leucocitária e dor (SCHULTZ HAUDT et al., 1953).

As proteases de bactérias patogênicas são fatores de virulência que podem atuar como ativadores proteolíticos das procologenases humanas a degradarem fragmentos de colágeno e participarem na destruição do periodonto dental (SORSA et al., 1992). Vários estudos demonstraram que as proteases liberadas por *F. nucleatum* podem degradar os principais constituintes dos tecidos periodontais, incluindo colágeno, fibronectina e laminina (HOLT; BRAMANTI, 1991).

A importância das enzimas no estudo *in vitro* de Uitto (1989), que analisaram efeito direto de *B. gingivalis* em cultura de fibroblastos gengivais humanos e também a ação do extrato celular de *B. gingivalis* e a enzima tripsina-like purificada da bactéria, demonstraram que a fibronectina (com peso molecular 220.000 Da) e algumas outras moléculas glicoproteicas com peso molecular acima de 100.000 Da foram degradadas na superfície celular pela protease de *B. gingivalis*. Nesse mesmo estudo, os autores verificaram que a protease estimulou a secreção do ativador de plasminogênio e colagenase pelos fibroblastos.

A produção de proteinases por patógenos, como *Candida albicans* é importante no processo de infecção, pois é capaz de degradar vários substratos, tais como:

queratina, colágeno, albumina, fibronectina e hemoglobina (KAMINISHI et al., 1986). Oliveira et al (1998) observaram a produção de fosfolipase e de proteinase por amostras de *C. albicans* isoladas de 44 pacientes portadores de candidíase. Em outro estudo, a presença de fosfolipase, que é uma enzima hidrolítica, foi observada em sobrenadante de cultura de *C. albicans* (PRICE et al., 1982).

Ueno (1996) e Itow Jankevicius (1978) detectaram e caracterizaram a presença de enzimas nos extratos celulares de vários gêneros de tripanossomatídeos e analisaram o papel dessas proteases no ciclo de vida desses isolados. Oliveira (2004) caracterizaram uma aspartato-protease de tripanossomatídeo de vegetais, responsável pela morte de insetos *Veneza zonata* (Hemiptera Coreidae) em 24 horas.

Estudos com o protozoário intestinal *Entamoeba histolytica* apresentaram correlação entre virulência e a atividade proteolítica e a secreção amebiana com o extrato celular lisado (KEENE et al., 1990; GUIMARÃES et al., 2003).

Qin (2000), estudando genes de *Enterococcus faecalis* e sua expressão, identificaram quais eram responsáveis pela produção de gelatinase e serina proteases e relacionaram essas enzimas com a virulência da bactéria.

Collin e Olsén (2003) citam a propriedade dos microrganismos patogênicos de clivar imunoglobulinas do hospedeiro para escapar do sistema imune, através da produção de enzimas. É descrita a produção de imunoglobulina A protease pelas bactérias *Streptococcus sanguis*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*. Os autores citam *Streptococcus pyogenes* produtor de várias enzimas, como a serina protease para clivar o complemento C5a; a endo-b-N-acetilglicosamidase para hidrolisar a IgG; a cisteína protease para clivar IgG e inibir a opsonização da fagocitose; NAD-glicohidrolase para alterar a migração dos neutrófilos; arginina deiminase para atividade antitumoral e inibição da proliferação de linfócito T; superóxido dismutase (SOD) para detoxificação do radical oxigênio e cisteína protease para liberação de bradicinina, ativação da interleucina 1 $\beta$ , degradação do peptídeo LL-37, clivagem da IgG, degradação de IgA, IgM, IgD e IgE e liberação de histamina pelos mastócitos.

As bactérias podem também ativar a produção de enzimas, como a gelatinase e colagenase, na bolsa periodontal por neutrófilos polimorfonucleares (PMN). Essas células contêm uma variedade de enzimas de largo espectro com capacidade hidrolítica (WEISS, 1989). A presença de microrganismo, ou seus produtos, pode induzir a liberação das enzimas lisossomais dos PMNs (PAGE, 1991; DING et al., 1995). Ding et al. (1997) estudaram a capacidade fagocítica de PMN *in vitro* frente a bactérias (*F. nucleatum*, *P.*

*gingivalis* e *T. denticola*) isoladas de pacientes e verificaram a liberação de metalo e serina proteínases pelo PMN. *F. nucleatum* demonstrou forte capacidade de disparar a liberação de colagenase pelos PMNs comparado com *T. denticola* e *P. gingivalis*. Os sobrenadantes dos PMNs, quando incubados com as três cepas, também provocaram a liberação de gelatinase pelas células. A atividade da elastase presentes nos sobrenadantes dos PMNs, quando incubados com *F. nucleatum*, nos períodos de 5, 30, 60 e 120 minutos, foi maior do que incubados com *P. gingivalis* ou *T. denticola*.

Para bloquear a ação das proteases, o hospedeiro possui defesas naturais e os inibidores seriam uma delas, que agiriam na defesa das células, impedindo a ação das enzimas na destruição tissular. Considerando que o inibidor é produzido pelas próprias células, elas os empregam no controle da velocidade de muitas reações, permitindo mudança das condições fisiológicas e patológicas (MARZZOCO; TORRES, 1999).

A presença e/ou produção por organismos vivos de inibidores de proteases da própria célula ou para protease de origem estranha, é um fator de regulação e proteção para a célula. Os inibidores estão distribuídos nos mais diversos seres vivos, considerando que as proteases são onipresentes, muito provavelmente os inibidores também o são (ITOW JANKEVICIUS, 1978).

Atualmente os inibidores de proteases despertam grande interesse, em particular, nas áreas de parasitologia e microbiologia, pois muitos estão relacionados aos processos de invasão e sobrevivência do parasita no hospedeiro (BLUNDELL et al., 1990; McKERROW, 1988).

Inibidores de proteases são também utilizados no tratamento de doenças inflamatórias e/ou infecciosas. Inibidores de proteases como a das famílias serina e metaloproteases têm papel importante em minimizar a progressão das otites médias (ANTONELLI et al., 2003). Pacientes tratados com alta terapia anti-retroviral, contendo um inibidor de protease, podem reduzir risco de sarcoma de Kaposi e alguns tipos de linfomas não-Hodgkins (SGADARI et al., 2003).

Muitas vezes, há necessidade de aferir a quantidade de uma enzima presente em soluções que contêm também outras proteínas, como a dosagem de enzimas em plasma sanguíneo e outros fluídos corpóreos ou em extratos celulares. A dosagem de enzimas é sempre feita através da medida de sua atividade, que é avaliada pela velocidade da reação que a enzima catalisa. Dada a especificidade das enzimas, essa medida é possível, mesmo na presença de outras proteínas.

Devido à enorme gama de proteases existentes em microrganismos, sendo muitas delas inespecíficas aos substratos disponíveis e empregados na sua detecção, o estudo das atividades proteolíticas das enzimas intra e extracelulares das bactérias é bastante complexo. O uso de substratos sintéticos e naturais não é suficiente para identificar uma protease, uma vez que um substrato pode ser degradado por várias proteases diferentes ou uma protease pode degradar diferentes substratos (MARZZOCO; TORRES, 1999).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Considerando a importância das proteases no processo patológico das infecções dentárias, o objetivo foi detectar as enzimas proteolíticas de superfície, intra e extracelulares de *Fusobacterium nucleatum*, utilizando células vivas, células lisadas e sobrenadante de cultura celular.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimização das condições do ensaio enzimático (pH, temperatura, tempo da reação, fonte de enzimas e concentração do substrato) sobre os substratos sintéticos: N<sup>2</sup>-Benzoil-DL-Arginina-β-Naftilamida (BANA), L-Cistina-DL-β-Naftilamida (Cys-Na), Glutamil-β-Naftilamida (Glu-Na), Leucina-β-Naftilamida (Leu -Na), Lisina-β-Naftilamida (Lys-Na) e Serina-β-Naftilamida (Ser-Na).
- Otimização das condições do ensaio enzimático (pH, temperatura, tempo da reação, fonte de enzimas, volume do substrato) sobre o substrato N-carbobenzoxi-L-tirosina p-nitrofenil éster (CTN).
- Otimização das condições do ensaio enzimático (pH, temperatura, tempo da reação, fonte de enzimas, volume do substrato) sobre o substrato natural azoalbumina.
- Caracterização das atividades proteolíticas através da ação de inibidores enzimáticos sobre os substratos sintéticos BANA, Cys-Na, Glu-Na, Leu-Na, Lys-Na e Ser-Na.
- Caracterização das atividades proteolíticas através da ação de inibidores enzimáticos sobre o substrato CTN.
- Caracterização das atividades proteolíticas através da ação de inibidores enzimáticos sobre o substrato natural azoalbumina.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 CULTURA DE *FUSOBACTERIUM NUCLEATUM*

*F. nucleatum* ATCC 10.953 foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Anaeróbios do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. A cultura foi realizada em meio TSB-PRAS (Soy Broth and Trypticase – Biobras preparado como pré-reduzido) em presença de CO<sub>2</sub>, a temperatura de 36°C durante 48 horas de cultivo.

#### 3.2 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS E SOBRENADANTE DA CULTURA

As células bacterianas ( $2 \times 10^{11}$ ) foram centrifugadas a  $3,86 \times 10^3$  g por 5 min a 4°C e ressuspensas em 1 a 3 mL de solução de NaCl 0,85% resfriada a 4°C. As células no sedimento e o sobrenadante do meio de cultura foram utilizados para o estudo das atividades proteolíticas. As células foram divididas em alíquotas para serem utilizadas uma parte no seu estado íntegro e outra sonicada até a lise total das células com comprovação microscópica. Os experimentos foram realizados em duplicatas, com três repetições.

#### 3.3 ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Para a determinação das atividades enzimáticas foram utilizados os seguintes substratos sintéticos na concentração de 1mM: L-cistina-DL-β naftilamida (Cys-Na), L-Leucil β naftilamida (Leu-Na), N2 benzoil-DL-arginina β naftilamida (BANA), serina-β-naftilamida (Ser-Na) L-glutamil-β-naftilamida (Glu-Na), lisina-β-naftilamida (Lys-Na) (SIGMA); para a determinação da atividade esterásica foi utilizado o substrato carbobenzoxi-L-tirosina-p-nitrofenilester (CTN) e finalmente o substrato natural, azoalbumina a 1g% (SIGMA).

A metodologia utilizada foi proposta por Goldberg e Rutenburg (1959) para a determinação enzimática sobre os substratos aminoácidos sintéticos  $\beta$ -naftilamida que é um substrato para aminopeptidases.

A atividade esterásica foi testada com o carbobenzoxi-L-tirosina-p-nitrofenilester (CTN 0,1mM) como substrato e a metodologia descrita por Walsh e Wilcox (1970).

A atividade sobre a azoalbumina foi determinada pelo método de Charney e Tomarelli (1947). Este método é baseado na hidrólise dos substratos, com a liberação do composto diazotado, gerando cor alaranjada forte, mensurável no comprimento de onda de 440 nm.

### 3.4 OTIMIZAÇÃO DAS REAÇÕES

As reações para determinação das atividades enzimáticas, para cada substrato utilizado, tiveram suas condições otimizadas em relação a: pH, temperatura, tempo de incubação, volume da fonte de enzimas e concentração do substrato.

Foram utilizados os seguintes tampões para os **substratos sintéticos**: pH de 4,0 a 5,0 (Tris citrato), pH 5,5 a 6,5 (Tris maleato) e pH de 7,0 a 13 (Tris-HCl).

Todas as reações seguiram o procedimento abaixo, variando de acordo com a determinação de cada efeito desejado: pH (4,0 a 13,0, sendo 4,0 a 8,0 com intervalo de 0,5 e acima de 8,0 com intervalo de 1,0), temperatura (15° a 70°C com intervalo de 10°C), tempo de incubação (10 a 120 minutos com intervalo de 20 minutos), volume da fonte de enzima (para o sobrenadante: 100 a 3000  $\mu$ L com intervalo de 100  $\mu$ L e células: 10 a 100  $\mu$ L com intervalo de 10  $\mu$ l) e volume de substrato (50 a 500  $\mu$ L com intervalo de 50  $\mu$ L).

<b>Tubos</b>	<b>Tampão</b>	<b>Substrato</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>Células</b>
Controle	450 $\mu$ L	--	250 $\mu$ L	50 $\mu$ L
Branco	450 $\mu$ L	250 $\mu$ L	50 $\mu$ L	--
Teste	450 $\mu$ L	250 $\mu$ L	--	50 $\mu$ L

<b>Tubos</b>	<b>Tampão</b>	<b>Substrato</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>Meio de cultura</b>	<b>Sobrenadante</b>
Controle	450µL	--	250 µL	--	2000 µL
Branco	450µL	250 µL	--	2000 µL	--
Teste	450µL	250 µL	--	--	2000 µL

Foram utilizadas, para o padrão inicial, as temperaturas de 36°C e tempo de 60 minutos até a determinação dos valores ótimos.

Após incubação, todas as reações foram interrompidas com 250 µL de ácido tricloracético (TCA) 20%, mantidas em banho de gelo por 15 minutos e em seguida centrifugadas a 4°C por 5 minutos a 5000 r.p.m. Foram adicionados 500 µL de nitrito de sódio a 0,1%, 500 µL de sulfamato de amônia 0,5% e 1000 µL de N-1-etilenodiamino di HCl 0,05%. Com a hidrólise do substrato, ocorreu liberação da β-naftilamida, a qual ao reagir com o N-1naftil etileno diamino di-HCl (reativo cromógeno) gerou um produto de coloração azul, o qual foi medido no espectrofotômetro (Pharmacia) em comprimento de onda de 580 nm.

Para a determinação da atividade enzimática sobre o N-carbobenzoxi-L tirosina p-nitrofenil éster (CTN), foi utilizada uma mistura de 3,0 mL de tampão Tris-maleato (pH 7,0) com CTN (0,08 mM) e 1,3 mg de proteína celular. A reação foi efetuada nas próprias cubetas do espectrofotômetro, pré incubando-se os reagentes separadamente a 36°C durante o tempo usual de reação para evitar eventual degradação espontânea do substrato. Os resultados foram expressos em nanomoles de p-nitrofenol formado por mg de proteína por minuto.

Para a hidrólise do **substrato natural** azoalbumina, que resulta na liberação de composto diazotado, de cor alaranjado forte, que obedeceu ao seguinte procedimento:

<b>Tubos</b>	<b>Tampão Tris-HCl</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>Substrato</b>	<b>Células</b>
Controle	100 µL	100 µL	--	200 µL
Branco	100 µL	--	100 µL	--
Teste	100 µL	--	100 µL	200 µL

<b>Tubos</b>	<b>Tampão Tris-HCl</b>	<b>Substrato</b>	<b>H2O</b>	<b>Meio de cultura</b>	<b>Sobrenadante</b>
Controle	100 µl	--	100 µL	--	2000 µl
Branco	100 µl	100 µl	--	2000 µL	--
Teste	100 µl	100 µl	--	--	2000 µl

Após a incubação, as reações foram bloqueadas com 1,6 mL de ácido percloro acético (PCA) 5%, mantidas em banho de gelo por 15 minutos e centrifugadas (3000 rpm/3 min). Ao sobrenadante foi adicionado 1,6 mL de NaOH 1N, seguido de repouso durante 10 minutos e leitura espectrofotométrica a 440 nm.

### **3.5 DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS**

A dosagem de proteínas totais foi realizada segundo o método preconizado por Bradford (1976), empregando soro albumina bovina (BSA) como padrão.

### **3.6 AÇÃO DE INIBIDORES SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA**

Foram testados os seguintes inibidores para:

- Serina e cisteína-proteases: leupeptina (1mM).
- Cisteína-proteases: iodoacetamida (1mM).
- Serina-proteases: aprotinina (0,09 µg/mL), fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF 2mM), N-α-tosyl L-lisina clometil cetona (TLCK 2 mM) e N-tosyl-1-fenilalanina clorometil cetona (TPCK).
- Metalo-proteases: orto-fenantrolina (2 mM), etileno diamino tetracético (EDTA 10 mM), etileno bis tetracético (EGTA 10mM) e os sais (2mM) acetato de Pb, Al (OH)<sub>2</sub>, CaCO<sub>2</sub>, CoSO<sub>4</sub>, CuCl<sub>2</sub>, Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HgCl<sub>2</sub>, MnSO<sub>4</sub>, ZnSO.
- Aspartato-proteases: pepstatina (1,0 µg/mL).

Os inibidores foram incubados com as células bacterianas (vivas/lisadas) ou sobrenadante de cultura, durante 10 minutos sob as condições ótimas para cada substrato estudado, e em seguida foram adicionados os substratos correspondentes para determinação da inibição da atividade enzimática.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, R. N., GAMESHKUMAR, N., KOLENBRANDER, P. E. Helicobacter pylori adheres selectively to Fusobacterium spp. **Oral Microbiol Immun**, v.13, p.51-54, 1998.
- ANTONELLI, P. J. et al. Protease inhibitors alpha1-antitrypsin and ilomastat are not ototoxic in chinchilla. **Laryngoscope**, p.113, v.10, p.1764-1769, 2003.
- ÁVILA CAMPOS, M. J. PCR detection of four periodontopathogens from subgingival clinical samples. **Braz J Microbiol**, v.34, n.1, p. 81-84, 2003.
- ASSED, S; ITO, I.Y.; LEONARDO, M. R.; et al. Anaerobic microorganisms in root canals of human teeth with chronic apical periodontitis detected by indirect immunofluorescence. **End Dent Traumatol**, v.12, n.66-69, 1996.
- BABU, J. P.; DEAN, J. W.; PABST, M. J. Attachment of Fusobacterium nucleatum to fibronectin immobilized on gingival epithelial cells or glass coverslips. **J Periodontol**, Apr. p. 285-290, 1995.
- BARTOLD, P. M.; GULLY, N. J.; ZILM, P. S.; ROGERS, A. H. Identification of components in Fusobacterium nucleatum chemostat-culture supernatants that are potent inhibitors of human gingival fibroblast proliferation. **J Periodontol Res**, v.26, p.314-322, 1991.
- BLUNDELL, L. T.; LAPATTO, R.; WILDERSPIN, F. A.; et al. The 3-D structure of HIV-1 proteinase and the design of antiviral agents for the treatment of AIDS. **Trends Biochem Sci**, v.15, n.11, p. 425-529, 1990.
- BOLSTAD, A. I.; JENSEN, H. B.; BARK, V. Taxonomy, biology and periodontal aspects of Fusobacterium nucleatum. **C Microb Rev**, v.9, n.1, p. 55-71, 1996.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye bindings. **Anal Biochem**, v.72, p.248-254, 1976.
- BRAUNER, A. W.; CONRADS, G. Studies into the microbial spectrum of apical periodontitis. **Int Endod J**, v.28, p. 244-248, 1995.

BRUHN, G.; NEUTUSCHIL, L.; RICHTER, S.; et al. Effect of a toothpaste containing triclosan on dental plaque, gingivitis, and bleeding on probing – an investigation in periodontitis patients over 28 weeks. **Clin Oral Investig**, v.6, n.2, p.124-7, 2002.

BUCHMAN, R.; NUNN, M. E.; VAN DYKE, T. E., LANGE, D. E. Aggressive periodontitis: 5 year follow-up of treatment. **J Periodontol**, v.73, n.6, p. 675-83, 2002.

BUCKEL, W.; BARKER, H. A. Two pathways of glutamate fermentation by anaerobic bacteria. **J Bacteriol**, v.117, p.1248-1260, 1974.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **J Biol Chem**, v.171, p.501-505, 1947.

COLLIN, M.; OLSÉN, A. Extracellular enzymes with immunomodulating activities: variations on a theme in *Streptococcus pyogenes*. **Infect Immun**, v.71, n.6, p.2983-2992, 2003.

DARENFED, H.; GRENIER, D.; MAYRAND, D. Acquisition of plasmin activity by *Fusobacterium nucleatum* subsp *nucleatum* and potential contribution to tissue destruction during periodontitis. **Infect Immun**, v.67, n.12, p.6439-6444, 1999.

DEBELIAN, G. F.; OLSEN, I.; TRONSTAD, L. Systemic diseases caused by oral microorganisms. **Endod Dent Traumatol**, v.10, p. 57-65, 1995.

DING, Y.; UITTO, V. J.; SALO, T.; et al. Modulation of host matrix metalloproteinases by bacterial virulence factors relevant in human periodontal diseases. **Oral Diseases**, v.1, p.279-286, 1995.

DING, Y.; HAAPASALO, M.; KEROSUO E.; et al. Release and activation of human neutrophil matrix metallo and serine proteinase during phagocytosis of *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*. **J Clin Periodontol**, v.24, p. 237-248, 1997.

DZINK, J. L.; SOCRANSKY, S. S. Amino acid utilization by *Fusobacterium nucleatum* grown in a chemical defined medium. **Oral Microbiol Immunol**, v.5, p.172-174, 1990.

EBERSOLE, J. L.; KESAVALU I.; SCHNEIDER S. L.; et al. Comparative virulence of periodontopathogens in a mouse abscess model. **Oral Dis** n.1, p.115, 1995.

FALKLER JUNIOR, W. A.; HAWLEY, C. A. Hemagglutinating activity of *Fusobacterium nucleatum*. **Infect Immun**, v.15, p.230-238, 1977.

FALKLER JUNIOR, W. A.; SMOOT, C. N.; MONGELLO, J. R. Attachment of cell fragments of *Fusobacterium nucleatum* to oral epithelial cells, gingival fibroblasts and white blood cells. **Arch Oral Biol**, v.27, p. 553-559, 1982.

FALKLER JUNIOR, W. A.; CLAYMAN, E. B.; SHAEFER, D. F. Hemolysis of human erythrocytes by the *Fusobacterium nucleatum* associated with periodontal disease. **Arch Oral Biol**, v.28, p.735-739, 1983.

FERREIRA, C. M.; ROSA, O. P. S.; TORRES, S. A.; et al. Activity of endodontic antibacterial agents against selected anaerobic bacteria. **Braz Dent J**, v.13, n.2, p.118-122, 2002.

GAETTI-JARDIM JUNIOR, AVILA-CAMPOS, M. J. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of oral *Fusobacterium* species from spittoons and air-water syringes. **Rev. Odontol Univ São Paulo**, v.11, n.1, p.1-4, 1997.

GAETTI-JARDIM JUNIOR, E.; PEDRINI, D. Bactérias anaeróbias associadas à pericoronarite. **RGO**, v. 45, n.1, p.7-10, 1997.

GAETTI-JARDIM JUNIOR, E.; AVILA-CAMPOS, M. Antimicrobial effect of human serum on oral *Fusobacterium nucleatum* isolate from human and monkeys. **Rev Odontol Univ São Paulo**, v.13, n.1, p.1-4, 1999.

GAETTI-JARDIM JUNIOR E.; LUVIZOTTO, M. C. R.; AVILA-CAMPOS, M. J. Virulence of oral *Fusobacterium nucleatum* from human and non-human primate in mice. **Braz J Microbiol**, v.31, n.2, p.146-150, 2000.

GEBARA, E. C. E.; LIMA, L. A.; MAYER, M. P. A. Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. **Braz J Microbiol**, v.33, n.4, p.365-369, 2002.

GODFREY, T., WEST, S. **Industrial enzymology**. 2. ed., New York: Macmillan Publishers Inc, p. 3, 1996.

GOLDBARG, J. A.; RUTENBERG, M. A. The colorimetric determination of leucine aminopeptidase in urine and serum of normal subjects and patients with cancer and other diseases. **Cancer**, p. 283-291, 1959.

GOMES, B. P. F. A.; LILLEY, J. D.; DRUCKER, D. B. Association of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. **Int Endod J**, v.29, p.69-75, 1996.

GRISI, D. C.; SALVADOR, S. L.; FIGUEIREDO, L. C.; et al. Effect of controlled release chlorhexidine chip on clinical and microbiological parameters of periodontal syndrome. **J Clin Periodontol**, v.29, n.10, p. 875-81, 2002.

GUIMARÃES, S.; SOGAYAR, M. I. T. L.; FRANCO, M. F. Protease activity in Giardia duodenalis trophozoites of axenic strain isolated from symptomatic and asymptomatic patients. **Mem Inst. Oswaldo Cruz**, v.98, n.1, p. 77-81, 2003.

HAN, Y. W.; SHI, W.; HUANG, G. T.; et al. Interaction between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: Fusobacterium nucleatum adheres to and invades epithelial cells. **Infect Immun**, v.68, n.6, p.3140-3146, 2000.

HOLT, S. C.; BRAMANTI, T. E. Factors in virulence expression and their role in periodontal disease pathogenesis. **Clin Rev Oral Biol Med**, v.2, p.177-281, 1991.

ITOW JANKEVICIUS, S. Enzimas proteolíticas em tripanossomatídeos. **Dissertação** (Mestrado em Microbiologia), Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1978.

IWU, C.; MACFARLANE, T. W.; MACKENZIE, D.; STENHOUSE, D. The microbiology of periapical granulomas. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.69, p.502-5, 1990.

JEWETT, A.; HUME, W. R.; HO L. E.; et al. Induction of apoptotic cell death in peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells by an oral bacterium, Fusobacterium nucleatum. **Infect Immun**, v. 68, n.4, p.1893-1898, 2000.

KAMMA, J. J.; NAOU, M.; FRIEDA, A. M. Microbiota of rapidly progressive periodontitis lesions in association with clinical parameters. **J Periodontol**, v.65, p.1073-1078, 1994.

KAMINISHI, H.; HAGIHARA, Y.; HAYASHI, S.; CHO T. Isolation and characteristics of collagenolytic enzyme produced by Candida albicans. **Infections Immunology**, v.53, p.312-316, 1986.

KEENE, W. E.; HIDALGO, M. E.; OROZCO, E.; MCKERROW, J. H. Entamoeba histolytica: correlation of the cytopathic infection of virulent trophozoites with secretion of a cysteine proteinase. **Exp Parasitol**, v.71, p.199-206, 1990.

KINDER, S. A.; HOLT, S. C. Characterization of coaggregation between *Bacteroides gingivalis* T22 and *Fusobacterium nucleatum* T18. **Infect Immun**, v.57, n.11, p.3425-3433, 1989.

KOLENBRANDER, P. E. Intergeneric coaggregation among human oral bacteria and ecology of dental plaque. **Annu Rev Microbiol**, v.42, p.627-656, 1988.

KOLENBRANDER, P. E.; ANDERSEN, R. N.; MOORE, L. V. Coaggregation of *Fusobacterium nucleatum*, *Selenomonas flueggei*, *Selenomonas infelix*, *Selenomonas noxia*, and *Selenomonas sputigena* with strains from 11 genera of oral bacteria. **Infect Immun** v.57, n.1, p. 3194-3203, 1989.

KOLENBRANDER, P. E.; LONDON, J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. **J Bacteriol**, v.175, p.3247-3252, 1993.

KÜLEKÇİ, G.; YAYTALI, D. I.; KOÇAK, H.; et all. Bacteriology of dentoalveolar abscesses in patients who have received empirical antibiotic therapy. *Clin Infect Dis*, v.23 51-53, 1996.

KURIYAMA, T.; NAKAGAWA, K.; KAWASHIRI, S.; et all. The virulence of mixed infection with *Streptococcus constellatus* and *Fusobacterium nucleatum* in a murine orofacial infection model. **Microbes Infect**, v.2, n.12, p.425-430, 2000.

LANDUCCI, L. F.; KATO, M. T.; GAETTI-JARDIM, E. C.; et all. Influência de concentrações subinibitórias de antimicrobianos sobre fatores de virulência de isolados de *Fusobacterium nucleatum* obtidos de dentes com polpa necrótica. **J Bras Endod**, v.4, n.15, p.3808, 2003.

LEVESQUE, C.; LAMONTHE, J.; FRENETTE, M. Coaggregation of *Streptococcus salivarius* with periodontopathogens: evidence for involvement of fimbriae in the interaction with *Prevotella intermedia*. **Oral Microbiol Immunol**, v.18, n.5, p.333-7, 2003.

MacDERMID, A. S.; McKEE, A. S.; ELLWOOD, D. C.; MARSH P. D. The effect of lowering the pH on the composition and metabolism of a community of nine oral bacteria grown in a chemostat. **J Gen Microbiol**, v.132, p.1205-1214, 1986.

MacDERMID, A. S.; McKEE A. S.; MARSH, P. D. Effect of environmental pH on enzyme activity and growth of *Bacteroides gingivalis* W50. **Infect Immun**, v.56, n.5, p.1096-1100, 1988.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. Enzimas. In: **Bioquímica Básica**. 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 59-88, 1999.

McKERRROW, H. J. The diversity of protease function in parasitic infections. *Ciência e Cultura*, v.45, n.5, p.319-321, 1993.

MELVIN, W. L.; ASSAD, D. A.; MILLER, G. A.; et al. Comparison of DNA probe and ELISA microbial analysis methods and their association with adult periodontitis. **J Periodontol**. v.65, p.576-582, 1994.

MORAES, S. R.. *Fusobacterium nucleaum* nas infecções endodônticas: métodos de detecção, prevalência e clonalidade. **Tese** (Doutorado em Microbiologia) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

NISENGARD, R. J.; NEWMAN, M. G. Doença periodontal. In: **Microbiologia Oral e Imunologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 309-330, 1997.

OLIVEIRA, E. E.; SILVA, S. C.; SOARES, A. J.; et al. Toxinas killer e produção de enzimas por *Cândida albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes com câncer. **Revista da Sociedade Brasileira Med Trop**, v.31, n.6, p.523-527, 1998.

OLIVEIRA, D.; SOUZA, T. A. C. B.; MURATA, L. S.; et al. Protease and phospholipase inhibition protect *Veneza zonata* (Hemiptera coreidae) against septicemia caused by parasite *Trypanosomatid 563 DT*. **J Inv Pathol**, v.85, n.1, p. 9-17, 2004.

PAGE, R. C. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. **J Period Re.**, v.26, p.230-242, 1991.

PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate methods for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v.20, p.7-14, 1982.

QIN, X.; SINGH, K. V.; WEINSTOCK, G. M.; MURRAY, B. E. Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. **Infect Immun**, v.68, n.5, p.2579-2586, 2000.

RAO, B. M.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiol Molec Biol Reviews**, v.62, n.3, p. 597-636, 1998.

ROCHA, M. M. N. P.; MOREIRA, J. L. B.; MENEZES, D. B.; et all. Estudo bacteriológico de lesões periapicais. **Revista Odontológica - Universidade de São Paulo**, v.12, n.3, p.215-223, 1998.

ROÇAS, I. N. Prevalência de patógenos orais putativos em infecções endodônticas primárias. **Dissertação** (Mestrado em Ciências-Microbiologia) Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. Rio de Janeiro, 2002.

ROLDÁN, S.; WINCKEL, E. G.; HERRERA, D.; et all. The effects of a new mouthrinse countaining chlorhexedine, cetylpyridium chloride and zinc lactate on the microflora of oral halitosis patients: a dual-centre, double-blind placebo- controlled study. **J Clin Periodontol**, v.30, n.5, p.427-34, 2003.

ROSLING, B.; HELLSTRÖM, M. K.; RAMBERG, P.; et all. The use of PVP-iodone as an adjunct to non-surgical treatment of chronic periodontitis. **J Clin Periodontol**, v.28, n.11, p.1023-23, 2001.

SASSONE, L. M.; FIDEL, R. A.; FIDEL, S. R.; et all. Antimicrobial activity of different concentrations of NaOCl and chlorhexidine using a contact test. **Braz Dent J**, v.14, n.2, p. 99-102, 2003.

SCHULTZ HAUDT, S.; DEWAR, M.; BIBBY B. G. Effects of hyalluronidase on human gingival epithelium. **Science**, v.117, p.653-5, 1953.

SEDDON, S. V.; SHAH, H. N. The distribution fo hydrolytic enzymes among Gram negative bacteria associated with periodontitis. **Microbiol Ecol Health Dis**, v.2, p.181-190, 1989.

SEGRETO, V. A.; COLLINS, E. M.; BEISWNGER, B. B.; et all. A comparison of mouthriness containg two concentrations of chlorhexidine. **J Periodontol Res**, v.21, n.16, p. 23-32, 1986.

SGADARI, C.; MONINI, P.; BARILLARI, G.; et all. Use of HIV protease inhibitors to block Kaposi's sarcoma and tumour growth. **Lancet Oncol** .v.4, n.9, p.537-47, 2003.

SHAH, H. N.; GHARBIA, S. E. Lysis of erythrocytes by the secreted cysteine proteinase of Porphyromonas gingivalis W83. **FEMS Microbiol Lett**, v.61, p. 213-218, 1989 a.

\_\_\_\_\_. Ecological events in subgingival dental plaque with reference to *Bacteroides* and *Fusobacterium* species. **Infection** v.17, p.264-268, 1989 b.

SIQUEIRA JUNIOR, J. F.; ROÇAS, I. N.; SOUTO, R.; et all. Microbiological evaluation of acute periradicular abscesses by DNA-DNA hybridization. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.92, p. 451-457, 2001.

SIQUEIRA JUNIOR, J. F.; UZEDA, M.; VAREJÃO, E. M. B. Sintomatologia clínica persistente. **RGO**, v.43, n.3, p.149-152, 1995.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D.; CUGINI, M. A.; et all. Microbial complexes in subgingival plaque. **J Clin Periodontol**, v.25, p.134-144, 1998.

SÖLER, P. Ö.; SÖLER, B. DNA probe detection of periodontopathogens in advanced periodontitis. **Scand J Dent Res**, v.101, p.363-70, 1993.

SORSA, T.; INGMAN, T.; SUOMALAINEN, M.; et all. Identification of proteases from periodontopathogenic bacteria as activators of latent human neutrophil and fibroblast-type interstitia collagenases. **Infect Immun**, v.60, p.11, p. 4491-4495, 1992.

SOUTO, R. Determinação da microbiota subgingival de pacientes com periodontite do adulto não tratada através de uma nova técnica de sonda de DNA: "Checkerboard DNA-DNA Hybridization". **Monografia** (conclusão de bacharelado), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000.

SUCHETT-KAYE, G.; DECORET, D.; BARSOTTI, O. Intra-familial distribution of *Fusobacterium nucleatum* strains in healthy families with optimal plaque control. **J Clin Periodontol**, v.26, p.401-104, 1999.

SUNDQVIST, G. Associations between microbial species in dental root canal infections. **Oral Microbiol Immunol**, v.7, p.257-262, 1992.

\_\_\_\_\_. Taxonomy, ecology and pathogenicity of root canal flora. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.78, p.522-530, 1994.

UENO, C. T. Detecção e caracterização de atividades proteolíticas e o seu papel no ciclo biológico de tripanosomatídeos isolados de plantas e insetos fitófagos. **Dissertação** (Mestrado em Microbiologia), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1996.

UITTO, V. J.; LARJAVA, H.; HEINO, J.; SORSA, T. A protease of *Bacteroides gingivalis* degrades cell surface and matrix glycoproteins of cultured gingival fibroblasts and induces secretion of collagenase and plasminogen activator. **Infect Immun**, v.57, n.1, p.213-218, 1989.

UZEDA, M. **Microbiologia Oral – Etiologia da Cárie, Doença Periodontal e Infecções Endodônticas**. Rio de Janeiro: Medsi, p. 33-55, 2002.

VINHOLIS, A. H.; FIGUEIREDO, L. C.; MARCANTONIO JÚNIOR, E.; et all. Subgingival utilization of a 1% chlorhexidine collagen gel to the treatment of periodontal pockets. A clinical and microbiological study. **Braz Dent J**, v.12, n.3, p.209-213, 2001.

XIE, H.; GIBBONS, R. J.; HAY, D. I. Adhesive properties of strains of *Fusobacterium nucleatum* of the subspecies *nucleatum*, *vincentii* and *polymorphum*. **Oral Microbiol Immunol**, v.6, p.257-263, 1991.

WAYMAN, B. E.; MURATA, S. M.; ALMEIDA, R. J.; FOWLWER, C. B. A bacteriological and histological evaluation of 58 periapical lesions. **J Endod**, v.18, p.4, p.152-155, 1992.

WALSH, K. A.; WILCOX, P. E. Serine protease. In: **Methods in Enzimology**. G.E. Perlmann & L.Lorand, v. XIX, New York: **Academic Press**, p. 31-226, 1970.

WEISS, S. J. Tissue destruction by neutrophils. **New England Journal of Medicine**, v.320, p. 365-376, 1989.

WYSS, C. Aspartame as a source of essential phenylalanine for the growth of oral anaerobe. **FEMS Microbiol Lett**, v.198, p.256-258, 1993.

## APÊNDICE

**CHARACTERIZATION OF PROTEOLYTIC ACTIVITIES OF  
ANAEROBIC BACTERIA *Fusobacterium nucleatum***

Alice Fayoko Ogawa, MD<sup>1</sup>, Tatiana de Arruda Campos Brasil de Souza, MD<sup>1</sup>, Milton de Uzeda, PhD<sup>2</sup>, José Vitor Jankevicius, PhD<sup>1</sup> and Shiduca Itow Jankevicius, PhD<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, 86051-970, Londrina, Paraná, Brasil

<sup>2</sup> Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

Corresponding author:

Shiduca Itow Jankevicius

Departamento de Microbiologia/CCB

Universidade Estadual de Londrina

CEP 86051-970

Londrina, Paraná, Brasil

e-mail: jankevici@sercomtel.com.br

**ABSTRACT**

The presence of proteolytic activities of the bacillus *Fusobacterium nucleatum*, was determined. The reactions were optimized in their pH, temperature, reaction time, enzyme source and substrate volume. The synthetic substrates  $\beta$ -naphthylamides (Cys-Na, Ser-Na, Leu-Na, Glu-Na, Lys-Na and BANA), carbobenzoxy L-tyrosine p-nitrophenylester (CTN), and natural substrate azoalbumin were used. The reaction of supernatant only occurred with Glu-Na. In living cells, the reaction occurred with Cys-Na, Ser-Na and Glu-Na, and with the cell lysates with Glu-Na, Leu-Na and CTN substrates. The optimal pH ranged from 6.0 to 7.5 in all reactions, except for CTN (pH 13), and the optimal temperature for all tests was between 30 and 40° C. The optimal reaction time was 60 minutes, except for Glu-Na with living cells (40 min.), with the cell lysates (20 min.), and CTN substrate (80 min). No activity was with azoalbumin. The protease inhibition detected metallo, serine, cysteine and aspartate proteases.

**Keywords:** *Fusobacterium nucleatum*, proteolytic enzymes, protease inhibitors, endodontics.  
root canal

## INTRODUCTION

*Fusobacterium nucleatum* is a Gram-negative strictly anaerobic bacteria and one of the most common bacterium at infections in humans and animals. According to Bolsrud (1), *F. nucleatum* is a pathogen found in the oral cavity, periodontitis, pulpal and periradicular abscesses, also, tonsillar abscesses, pyomyositis, septic arthritis, hepatic abscesses, skin ulcers, intrauterine infection, urinary tract infection, lung infection, pericarditis and endocarditis. Its frequency in the oral microbiota is 71.7% in periodontitis (2) and 48% in the endodontic canal (3) and has been related to acute inflammatory changes in the periodontitis (4,5) and pulpal and periapical infections (6,7,8). Its study grew in importance due to its synergism ability with other genera and species in mixed infections.

The ecologic distribution of *F. nucleatum* can be attributed to the nutritional differences present in different sites colonized. Amino acids and peptides are the first substrate for its growth (9,10). Periods of pathologic activity match the release of amino acids and peptides through the hydrolytic activity of both the host and the bacteria (11,12).

Several studies show that the protease released by *F. nucleatum* can degrade the main components of periodontal tissues, including collagen, fibronectin and laminin (5). The pathogenic bacterium proteases are virulence factors that can act as proteolytic activators of human procollagenases, degrade collagen fragments and take part in the destruction of the dental periodontic (13).

The host has natural defenses to block the action of proteases, being the inhibitors one of them, which would act in the defense of cells obstructing the action of enzymes in the tissue destruction.

The protease inhibitors rise great interest, in particular in the fields of parasitology and microbiology, since many proteases are reported in the parasite invasion and survival processes in the host (14,15).

The goal of this paper was to assess the intra and extra cellular proteolytic activities of the bacteria *F. nucleatum* and its inhibitors.

## MATERIALS AND METHODS

### Culture of *Fusobacterium nucleatum*

The ATCC 10.953 *F. nucleatum* stock was kindly provided by the Laboratório de Anaeróbios - Instituto de Microbiologia/Universidade Federal do Rio de Janeiro.

The culture was performed in medium TSB-PRAS (Soy Broth and Tryptase – Biorrás prepared pre-reduced) in presence of CO<sub>2</sub> at 36°C for 48 hours.

### Obtention of cells and culture supernatant

The bacterial cells ( $2 \times 10^{11}$ ) were centrifuged at  $3.86 \times 10^5$  g for 5 min at 4°C and resuspended in 1 to 3 mL of NaCl at 0,85%. The cell suspension and the culture medium supernatant were used for the study of the proteolytic activities. The cells were divided in aliquots, one part was used as whole cells, and the other was sonicated until total cell lysis, with microscope confirmation. The experiments were performed in duplicate with three repetitions.

### Enzymatic activities

To determine the enzymatic activities, the following synthetic substrates were used at 1mM concentration: L-cystine-DL-β-naphthylamide (Cys-Na), L-Leucyl β-naphthylamide (Leu-Na), N2 benzyl-DL-arginine β-naphthylamide (BANA), serine β-naphthylamide (Ser-Na), L-glutamyl-β-naphthylamide (Glu-Na), lysine-β-naphthylamide (Lys-Na) (SIGMA), and the

natural substrate azoalbumin at 1g% (SIGMA), for proteolytic activities determination, and to determine the esterase activity, carbobenzoxy-L-tyrosine-p-nitrophenylester (CITN) was used.

The method of Goldberg and Rutenburg (16) was used for the enzymatic activity determination on the synthetic amino acid  $\beta$ -naphthylamide, based on the substrate hydrolysis, with the release of  $\beta$ -naphthylamide which, as it reacted with N-1-naphil ethylene diamine di-HCl (chromogen reactant), produced a blue color. The blue-colored resulting product was measured at 580 nm wavelength.  $\beta$ -naphthylamide is a substrate for aminopeptidases. The esterase activity was tested with carbobenzoxy-L-tyrosine-p-nitrophenylester (CITN 4mM) as a substrate and with the methodology described by Walsh and Wilcox (17)

The Charney and Tomarelli (18) method determined the activity on azoalbumin. This method is based on the substrate hydrolysis, with the release of diazotized compound, generating a strong orange color, measurable at 440 nm wavelength

#### **Optimization of reactions**

The enzymatic activities for each substrate used had their conditions optimized regarding: pH (4.0 to 13.0), temperature (15 to 70°C), incubation time (10 to 120 minutes), enzyme source volume (supernatant: 100 to 3000  $\mu$ l, and cells: 10 to 100  $\mu$ l) and substrate volume (50 to 500  $\mu$ l)

#### **Total protein dosage**

The total protein dosage was performed according to the method of Bradford (19), employing bovine serum albumin (BAS) as standard protein solution.

#### **Action of inhibitors on the enzymatic activity**

The following inhibitors were tested: Leupeptin - serine and cysteine proteases inhibitor, N-Tosyl L-Phenylalanine Chloromethyl Kerone (TPCK 100  $\mu$ g/ml) inhibitor of chymotrypsin.

like and serine-protease; N- $\alpha$ -Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK 2mM) – trypsin, papain and serine-proteases inhibitor; O-Phenantroline (2mM) metallo-protease inhibitor; Iodoacetamide (1 mM) – cysteine-protease inhibitor; Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF 2 mM)-serine protease inhibitor; Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA 10mM) and Ethylene bis tetraacetic (EGTA) – metallo-protease inhibitor, Aprorubin (0.09  $\mu$ g/ml) – serine-protease inhibitor, Pepstain (1.0  $\mu$ g/ml) – aspartate-protease inhibitor, and several salts at 2mM concentration: Pb acetate, Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CuCl<sub>2</sub>, MnSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, CoSO<sub>4</sub>, CaCO<sub>3</sub>, HgCl<sub>2</sub>, Al(OH)<sub>3</sub> metallo-protease inhibitors.

The inhibitors were incubated with cells (living and lysate) or culture supernatants for 10 minutes under optimal conditions for each substrate studied and were then added to the corresponding substrate for determination of the enzymatic activity

## RESULTS

### Determination of optimal reaction conditions:

**pH effect:** When the synthetic substrates BANA and Lys-Na and the natural substrate azoalbumin were used, there was no chromogenic change in the reactions of analyzed samples comparing to control (without substrate), both in the supernatants, living cells and cell lysate, determining lack of proteolytic activities in the reactions. There was also no activity in the supernatants when Cys-Na, Ser-Na, Leu-Na and CTN substrates were used. Only when Glu-Na substrate was used with the supernatant there was intense chromogenic change. There was enzymatic activity when the living cells were used for the Cys-Na, Ser-Na and Glu-Na. There was chromogenic change in the sonication-lysates cells in Leu-Na and Glu-Na and CTN substrates. The pH range was between 6.0 and 8.0 for all determinations except CTN (Table 1).

**Temperature effect:** There was little variation in this item under optimal conditions, ranging from 30 to 40° for the studied samples (Table 1).

**Time effect:** Where there was proteolytic activity, there was a 60 minute linearity in reactions, except for Glu-Na synthetic substrate and CTN (Table 1).

**Enzyme source:** Reaction happened in the supernatants only when Glu-Na synthetic substrate was used. There was a variation of 90 µl for Glu-Na and 150 µl for Cys-Na and Ser-Na. Activity was optimal in the cell lysate when 150 µl for Leu-Na and 70 µl for Glu-Na were used (Table 1)

**Substrate volume:** There was a 300 µl uniformity in the living cells for all substrates, whereas there was variation in the cell lysate with 250 µl for Leu-Na and 400 µl for Glu-Na and CTN (Table 1)

**Enzymatic kinetics:** In the enzymatic kinetics, the living cells showed a maximum velocity with lower values (Cys-Na 0,2 mM, Ser-Na 0,16 mM, Glu-Na 0,5mM) than the cell lysates (Leu-Na 0,45mM, Glu-Na 1,5mM) with exception with CTN (0,005mM) and also a low Km in the supernatant with Glu-Na substrate (0,12mM).

**Inhibitor action:** Metallo-protease inhibitors showed significant activities, when Leu-Na, Cys-Na, Ser-Na and Glu-Na substrates were used, in decreasing order. Cysteine-protease inhibitors had higher activities: Cys-Na, Ser-Na, Leu-Na and Glu-Na, in decreasing order. Action was highest with serine-protease inhibitors when Cys-Na substrate was used, followed by Ser-Na, Leu-Na and Glu-Na. Aspartate protease inhibitors were quite significant in Cys-Na and Ser-Na substrates when living cells were used (Table 2)

## DISCUSSION

The enzyme dosage is always done through the measurement of its activity, which is assessed by the speed of the reaction catalyzed by the enzyme. Given the specificity of the

enzymes, this assessment is possible even in the presence of other proteins (20). Due to the wide range of existing proteases in microorganisms, many of them unespecific to the available substrates employed in its detection, the study of proteolytic activities of the bacterium's intra and extracellular proteolytic enzymes is quite complex. The use of synthetic and natural substrates is not enough to identify a protease, once a substrate can be degraded by several different proteases or a protease can degrade different substrates.

Experimental studies have shown that the abrupt drop in pH in the environment can significantly change the balance of oral microbiological communities, specially of the bacterium found in the periodontal pockets, and *F. nucleatum* is an example of it (21). The change in the environment pH can also significantly affect the enzyme profile and, consequently, the pathogenic potential of the bacteria such as *Bacteroides gingivalis* (now *Porphyromonas gingivalis*) which, in a pH around 7.0, corresponding to a healthy gum groove, show an enzymatic activity (hyaluronidase and collagenase) capable of degrading the connective tissue (22). In our experiment, with the pH range between 6.0 and 8.0 in the utilization of several substrates, being them within the possible pH variations in our organism, there was no significance difference.

The potential of cells, showed in the *F. nucleatum* samples, to degrade Cys-Na, Ser-Na, and Glu-Na substrates demonstrated surface aminopeptidases. It is possible that the degradation of these substrates was performed by distinct proteases, once the reaction optimization results varied widely. Leu-Na and Glu-Na substrates also showed aminopeptidases activities. The use BANA substrate as a diagnostics test to verify the presence of the bacteria *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* and *Bacteroides forsythus* in periodontitis, excluding *F. nucleatum* (23). The low ability of *F. nucleatum* to hydrolyze this substrate was confirmed by our study.

The optimal temperature around 30 and 40°C in all reactions of studied samples indicate better enzymatic activities around the human body temperature range.

The optimal time of 60 minutes in the reactions suggest the extended enzyme activity when in contact with the tissues on the acting site in the organism.

Through  $K_m$  determination, an important factor in the study of the enzymatic efficiency and in its potential, it is possible to show that the surface proteases of *F. nucleatum* have more efficient proteolytic activity than the intracellular proteases, which suggests that the living bacterial cells, regarding its enzymatic action, have greater pathogenicity because of its physical presence on the host's tissue.

A great number of substances, generally called inhibitors can reduce the enzymatic activity. Some of these substances are normal cell constituents, others are alien to the organism and its presence - either accidental or intentional - in the cells cause significant changes on its metabolism. Because the enzymatic action controls the microbial metabolism, the possibility to inhibit enzymatic reaction is an open field for pharmacological applications. The blocking of a single reaction deprives the organism of the product of that reaction, which would be the substrate of a subsequent reaction. The use of several inhibitors in our experiment, affecting in greater or lesser extent the enzymatic activity of *F. nucleatum*, confirms the effective action of some inhibitors, such as the ones which acted on metallo-proteases when they were used in reactions with L-ox-Na and Cys-Na. The metallo-proteases are detected by action of inhibitors such as EDTA, EGTA, orthophenanthroline and several ions. Blencowe & Morby (24) confirm the importance of the presence of ions in the physiology and virulence, both on structures and reactions of prokaryotes, in the revision of Zn ion. The presence of cysteine-proteases in the living cells was confirmed by the pre-incubation with iodoacetamide. The confirmation of serine-proteases is made by action of leupeptin, TPCK and FLCK inhibitors. The presence of aspartate-

protease is confirmed by action of pepstatin. Thus, the four proteases found in *F. nucleatum* with their proteolytic activities can promote individual pathologies, acting synergetically or antagonistically, depending on the inhibitors present in the oral cavity.

#### REFERENCES

1. Bolstad AI, Jensen HB, Barkk V. Taxonomy, biology and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *C Microb Rev* 1996;9(1):55-71.
2. Söler, PO, Söler, B. DNA probe detection of periodontopathogens in advanced periodontitis. *Scand J Dent Res* 1993;101:363-70.
3. Sundqvist, G. Taxonomy, ecology and pathogenicity of root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;78:522-3
4. Moore WE, Haldeman LV, Smiler RM, Hash DE, Burmester JA, Ranney RR. Bacteriology of severe periodontitis in young adult human. *Infect Immun* 1982;38:1137-1142
5. Holt SC, Bramanti TE. Factors in virulence expression and their role in periodontal disease pathogenesis. *Clin Rev Oral Biol Med* 1991; 2: 177-281
6. Kantz WF, Henry CA. Isolation and classification of anaerobic bacteria from intact pulp chambers of non vital teeth in man. *Arch Oral Biol* 1974;19:91-96
7. Oguztuzi B, Slec AM, Tanzer JM, Tangeland K. Predominant microflora associated with human dental periapical abscesses. *J Clin Microbiol* 1982;15:964-966
8. Trowbridge HO, Stevens BH. Microbiologic and pathologic aspects of pulpal and periapical disease. *Curr Opin Dent* 1992;3:85-92.
9. Gharbia SE, Shah HN. The uptake of amino acids from a chemically defined medium by *Fusobacterium* species. *Curr Microbiol* 1991;18:189-193
10. Gharbia SE, Shah HN. 1991 Utilization of aspartate, glutamate, and their corresponding peptides by *Fusobacterium nucleatum* subspecies and *Porphyromonas gingivalis*. *Curr Microbiol* 1989;22: 159-163

11. Seddon SV, Shah HN. The distribution of hydrolytic enzymes among Gram negative bacteria associated with periodontitis. *Microbiol Ecol Health Dis* 1989;2:181-190.
12. Shah HN, Gharbia SF. Lysis of erythrocytes by the secreted cysteine protease of *Porphyromonas gingivalis* W83. *FEMS Microbiol Lett* 1989;61:213-218.
13. Sorsa T, Ingman T, Suomalainen M, Haapasalo M, Kottinen YI. Identification of proteases from periodontopathogenic bacteria as activators of latent human neutrophil and fibroblast-type I-matrilysin collagenases. *Infect Immun* 1992;60(11):4491-4495.
14. Blundell LT, Laparte R, Wadeson FA, Hemmings MA, Hobart MP, Dantley FD, Wittle JP. The 3-D structures of HIV-1 proteinase and design of antiviral for the treatment of AIDS. *Trends Biochem Sci* 1990;15(11):425-529.
15. Mckenrow HI. The diversity of protease function in parasitic infections. *Ciência e Cultura* 1993;45(5):319-321.
16. Goldberg JA, Rutenberg MA. The colorimetric determination of leucine aminopeptidase in urine and serum of normal subjects and patients with cancer and other diseases. *Cancer* 1959;March-April, p. 283-291.
17. Walsh KA, Wilcox PE. Serine protease. In: "Methods in Enzymology". G.H. Perlmann & L.Lorand, eds 1970,p.31-226 VolXIX Academic Press, New York, London.
18. Charney J, Tomarelli RM. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *J Biol. Chem* 1947;171:501-506.
19. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye bindings. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.
20. Marzocco, A. Torres. BB. Enzimas, in *Bioquímica Básica*. 2ª Ed. Guanabara Koogan 1999; p. 59-88.
21. MacDermid AS, Mckee AS, Ellwood DC, Marsh PD. The effect of lowering the pH on the composition and metabolism of a community of nine oral bacteria grown in a chemostat. *J Gen Microbiol* 1986;132:1205-1214.

22. MacDermid AS, McKee AS, Marsh PD. Effect of environmental pH on enzyme activity and growth of *Bacteroides gingivalis* W50. *Infect Immun* 1988;56(5):1096-1100
23. Loesche WJ, Lopatin DE, Giordano J, Alcolonabo G, Hujzel P. Comparison of the benzoyl-DL-arginine-naphthylamide (BANA) test, DNA probes, and immunological reagents for ability to detect anaerobic periodontal infection due to *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Bacteroides forsythus*. *J Clin Microbiol*, 1992;30(2):427-33.
24. Blencowe DK, Morby AP. Zn(II) metabolism in prokaryotes. *FEMS Microbiol Reviews* 2002;27:291-311

**TABLE 1 – Effect of pH, temperature, incubation time, enzyme source and substrate volume for optimization of reaction**

Substrate	Supernatant				Living cells				Lysates cells					
	pH	Time (hr)	Enzyme source (U/ml)	Substrate volume (µl)	pH	Temp. (°C)	Time (min)	Enzyme source (U/ml)	Substrate volume (µl)	pH	Temp. (°C)	Time (min)	Enzyme source (U/ml)	Substrate volume (µl)
Cys-Na	--	--	--	--	7.5	40	60	150	500	--	--	--	--	--
Ser-Na	--	--	--	--	7.0	35	60	150	300	--	--	--	--	--
Leu-Na	--	--	--	--	--	--	--	--	--	7.0	40	60	150	250
Leu-Na	7.0	40	60	1600	7.0	40	60	90	500	6.5	35	30	20	400
Leu-Na	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
PABA	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Leu-Na	--	--	--	--	--	--	--	--	--	7.0	30	60	500	60
Leu-Na	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Reaction conditions of *Escherichia coli* collection sample on substrates in optimal pH, temperature, time, enzyme source and substrate volume. The substrates: L-cysteine- $\beta$ -naphthylamide (Cys-Na), L-serine- $\beta$ -naphthylamide (Ser-Na), L-leucine- $\beta$ -naphthylamide (Leu-Na), L-phenylalanine- $\beta$ -naphthylamide (Phe-Na), L-lysine- $\beta$ -naphthylamide (Lys-Na), 4-Nitrobenzyl-DL-tryptophan- $\beta$ -naphthylamide (NBNA) and carbobenzoxy-L-tryptophan- $\beta$ -naphthylamide (CBNA).

**TABLE 2 – Characterization of proteolytic enzymes in *Fusobacterium nucleatum* sample by using protease inhibitors. Result percentage, in relation to reaction without inhibitor as parameter of 100%**

Protease type	Inhibitors	Living cells						
		Supernatant	Living cells			Lysates cell		
		Glu-Na	Cys-Na	Ser-Na	Clu-Na	C/N	Leu-Na	Glu-Na
Serine protease inhibitor	Apronina	82,5	15,0	15,0	59,58	47,7	93,3	51,8
	TPCK	71,8	83,3	60,0	37,5	25,1	87,9	63,9
	TPCK	78,1	25,0	40,0	65,0	58,7	74,5	87,6
Serine cysteine protease inhibitor	Leupeptin	75,4	38,8	58,8	57,0	0,0	0,0	62,0
	PMSE	80,0	52,7	30,0	64,39	42,8	87,8	55,9
Cysteine protease inhibitor	iodoacetamide	78,1	57,0	88,9	45,36	87,3	0,0	49,3
	EDCA	79,3	25,0	34,4	49,7	0,0	55,1	79,1
	EDTA	79,6	44,4	79,3	61,4	52,6	0,0	69,1
	O-phenantroline	78,1	30,0	51,7	57,1	46,4	0,0	58,8
	Al <sup>3+</sup>	80,0	90,0	100,0	36,8	52,9	100,0	57,7
	Cu <sup>2+</sup>	78,3	15,0	58,0	45,7	52,9	100,0	50,0
	Co <sup>2+</sup>	83,2	86,1	31,0	27,3	75,4	100,0	24,8
	Cu <sup>+</sup>	81,0	77,0	31,0	48,7	37,7	0,0	21,8
	Fe <sup>2+</sup>	82,5	15,0	51,7	70,7	0,0	0,0	61,2
	Hg <sup>2+</sup>	78,6	51,1	51,7	57,6	68,1	100,0	16,5
Aspartic protease inhibitor	EDTA	78,1	15,0	31,0	62,4	45,6	0,0	48,1
	Pbs +	84,5	41,6	100,0	24,8	29,8	63,0	54,8
	Zn <sup>2+</sup>	81,5	33,3	86,2	21,9	45,0	45,0	40,0
	Pepsatin	86,7	1,0	19,0	63,4	34,5	95,1	55,0

The tested inhibitors were previously incubated with living cells, cell lysates and supernatant for 10 minutes and immediately after substrate addition the reaction went on as described in materials and methods. A value of 0.0 was attributed to the number of naphthylamide nanomoles formed per mg of protein relative to the tubes without addition of inhibitors and the results were calculated as a function of these values.

IN HIBITORS: TPCK, TLCK, Leupeptin, aproptin, PMSE, EDTA, EGTA, O-phenantroline, pepsatin, iodoacetamide and several ions (Al<sup>3+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>).